



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**RESPUESTA AL ESTRÉS Y CALIDAD BIOQUÍMICA POST-MORTEM DEL
CAMARÓN EN RELACIÓN A LA INCLUSIÓN DE SUBPRODUCTOS
PESQUEROS EN EL ALIMENTO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

ALAN BRYAN LICONA JAIN

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 18 del Mes de Agosto del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Respuesta al estrés y calidad bioquímica post-mortem del camarón en relación a la inclusión de subproductos pesqueros en el alimento"

Presentada por el alumno:

ALAN BRYAN LICONA JAIN

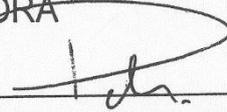
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



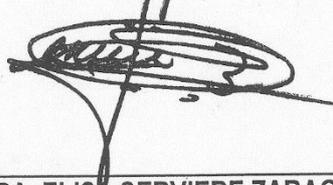
DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV
DIRECTOR DE TESIS



DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV
CO-TUTOR



DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-tutores

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Suplente

Dra. Laurence Stephanie Mercier

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

RESUMEN

La sostenibilidad de los cultivos a nivel mundial se ha visto amenazada por el incremento de los precios de la harina y el aceite de pescado utilizados comúnmente en la formulación de alimentos balanceados. Surge entonces la necesidad de impulsar la búsqueda de ingredientes alternativos que sustituyan de manera total las harinas y aceites de pescado, permitiendo reducir los costos de producción. Una alternativa a este problema es el uso de subproductos de pesquerías como son las vísceras de calamar y callo de hacha, los cuales cuentan con un alto contenido de HUFA (DHA, EPA y ARA). Sin embargo, estos ácidos grasos, son más susceptibles a oxidación generando productos de degradación que influyen de manera importante en el sabor y el olor de pescado y mariscos al perder su frescura (calidad post-cosecha). Por otro lado, el estrés juega un papel muy importante, especialmente durante la cosecha, donde se ha reportado que una exposición aguda o crónica al estrés en el cultivo de camarones impacta fuertemente la degradación del ATP y productos de degradación como el IMP y la hipoxantina, los cuales también están muy relacionados con la calidad post-cosecha, al influir sobre el sabor y el olor del producto. No obstante, se tiene reportado que el aporte de HUFA n-3 disminuye la susceptibilidad al estrés de peces y mariscos, lo cual tiene un potencial efecto benéfico en la calidad post-cosecha, en caso de influir en la utilización de ATP pos estrés.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de alimentos elaborados con subproductos pesqueros y la condición de estrés en la degradación de nucleótidos y la oxidación de lípidos post-mortem en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Durante 45 días, los camarones fueron sometidos a las siguientes condiciones de alimentación: dos alimentos experimentales elaborados con subproductos de calamar y almeja, un alimento de harina de sardina y un alimento comercial. Se evaluó el desempeño en cultivo en términos de supervivencia, ganancia en peso, consumo de alimento, tasa de crecimiento y factor de conversión alimenticia. Se evaluó el estado energético en la respuesta de escape (estrés inducido) de los camarones hasta el agotamiento, mientras que otro grupo se mantuvo sin estrés (control). Se designaron tres tiempos post-mortem: día cero congelando en nitrógeno líquido, día dos y cuatro manteniendo los camarones en hielo. Se evaluaron distintos indicadores del metabolismo energético (nucleótidos, fosfágenos y combustibles), así como el análisis de lípidos (composición de ácidos grasos, lípidos totales y pigmentos carotenoides) en músculo y hepatopáncreas.

La sustitución total de la harina de pescado en el alimento de camarón por subproductos de la pesca (vísceras de calamar y callo de hacha) ricos en HUFA, resultó en un mayor desempeño en cultivo de los camarones. El consumo de alimentos elaborados con subproductos también promovió una mayor capacidad de respuesta de escape tanto en términos comportamentales (41 contracciones del abdomen en un tiempo de 55s vs 23 coletazos en 34s para el alimento comercial) como en términos de estatus energético (carga energética adenílica de 0.9 y 0.55 y nivel de fosfato de arginina de 28 y 3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para los alimentos a base de callo de hacha y comercial, respectivamente). Contrariamente a lo

esperado no se detectó una disminución del contenido de ácidos grasos en por efecto de la condición de estrés y la condición post-mortem en los tejidos analizados, con lo que se descarta un posible daño oxidativo a lípidos. Se encontraron diferencias significativas únicamente por efecto del tipo de alimento, encontrando un mayor contenido de DHA, EPA y ARA en los alimentos de subproductos de calamar y callo de hacha.

En conclusión, el consumo de alimentos elaborados con harinas de vísceras de calamar y callo de hacha mostraron características satisfactorias e incluso superiores en los parámetros biológicos, nutricionales y energéticos, con respecto a un alimento convencional de laboratorio o comercial.

Palabras clave: Post-mortem, carga energética adenílica, *Litopenaeus vannamei*, respuesta de escape, subproductos pesqueros.

Vo. Bo.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, stylized strokes, positioned above a solid horizontal line.

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

ABSTRACT

The sustainability of global aquaculture has been threatened by the rising prices of fishmeal and fish oil commonly used in the formulation of balanced meals. Given the above, it has become necessary to encourage the search for alternative ingredients to replace total way the fish meal and oil, thereby reducing production costs. An alternative to this problem is the use of fishery products as are the viscera of squid and scallops, which have a high content of HUFA (DHA, EPA and ARA). However, these fatty acids are more susceptible to oxidation, resulting in degradation products that have an important influence on the taste and smell of seafood to lose its freshness (post-harvest quality). However, it is reported that the intake of n-3 HUFA decreases susceptibility to stress fish and shellfish, which has a potential beneficial effect on post-harvest quality. On the other hand, stress plays a very important role, especially during harvest, where it has been reported that acute or chronic exposure to stress in shrimp farming impacts the ATP and degradation products such as IMP and hypoxanthine, which they are closely related to the taste.

The aim of this study was to evaluate the effect of food made from fish by-products and the stress condition in the degradation of nucleotides and lipid oxidation post-mortem on the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Shrimp were cultured in fiberglass tanks of 60 L, in which four different foods were tested: two experimental food products made from squid and clam food sardine meal and a commercial feed. After 45 days in culture performance (survival, weight gain, feed intake, growth rate and feed conversion) were evaluated. For analysis of the energy state in the escape response, the shrimp were stimulated individually to perform a series of tail-flips to exhaustion while another group remained unstressed (control). Three post-mortem times were designated: Zero-day freezing in liquid nitrogen, keeping shrimp two or four days on ice until further analysis. Various indicators of energy metabolism (nucleotide phosphagens and metabolic fuels) as well as the analysis of lipids (fatty acid composition, total lipids and carotenoids) in muscle and hepatopancreas were evaluated.

The food consumption of squid and scallops viscera meal promoted greater physiological response in the escape response with 41 contractions of the abdomen in a time of 55s. This increase in physiological condition resulted in an increase of energy condition in term of energy charge and phosphagen; however, glycogen and lactate concentration were not affected, only the protein concentration and total lipids showed significant differences due to the stress condition. For its part, the shrimp fed viscera squid and scallops meal showed less degradation of nucleotides, have strong implications for the post-harvest quality (some freshness). Contrary to expectations not decreased fatty acid content in the effect of the stress condition and the condition in post-mortem tissues analyzed, with a potential oxidative damage to lipids is discarded. Significant differences were found only by effect of the food, finding a higher content of DHA, EPA and ARA in food products of squid and scallops viscera.

In conclusion, consumption of squid and scallops viscera meal showed satisfactory and even superior properties in biological, nutritional and energy parameters with respect to a conventional food or commercial laboratory.

Keywords: Post-mortem, adenylate energy charge, *Litopenaeus vannamei*, escape response, fisheries waste-products.

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mis padres
A mi sobrino Axxel, el pequeñin de la casa
A Yazmin, el amor de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, en especial al personal de Posgrado por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada con número de registro 492697.

A los proyectos: Ciencia básica CONACYT 101733 y FINNOVA 2011 03 173655.

Al Dr. Ilie Racotta por dirigir este trabajo, así como al comité tutorial Dra. Elena Palacios, Dr. Roberto Civera por sus correcciones, asesorías y apoyo.

A los técnicos de laboratorio, en especial a Olivia Arjona López por todas las facilidades otorgadas para los análisis realizados en el laboratorio de Metabolismo de Lípidos, así como en el análisis de metabolismo energético.

A Roberto Hernández Herrera por el apoyo técnico en los análisis en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica.

A Carlos Ceseña por el apoyo brindado durante los muestreos en el Laboratorio de Maduración y Reproducción de Crustáceos.

A Sandra de la Paz por el apoyo durante la realización del bioensayo en el Laboratorio de Nutrición Experimental.

A Ernesto Goytortúa por el apoyo en la elaboración de los alimentos experimentales.

A Eduardo Toyas por el gran apoyo otorgado en la colecta de materias primas, en la elaboración de alimentos experimentales y por toda su ayuda durante el bioensayo de crecimiento.

A mis compañeros del Laboratorio de Metabolismo Energético Saúl Zamora, Nannie Esperanza y Arlett Robles, por el entrenamiento, asesorías y facilidades brindadas durante el procesamiento de las muestras de nucleótidos.

A Yazmin Duran por su cariño, motivación y apoyo constante para realizar esta tesis.

A mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional.

A todas las personas que me apoyaron a lo largo de los bioensayos, muestreos y procesamiento de las muestras: Nannie Esperanza, Miguel Regalado, Yazmin Duran, Mónica Cabrera, Ranferi Gutiérrez.

A mis compañeros de laboratorio: Eduardo, Arlett, Saúl, Yazmin, Celene, Erika, Alessandra, Laura, Nannie, Miguel, Nairobi, Elisa, Rodriga.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Nutrición acuícola	3
2.1.1 Estado de harinas y aceites de pescado	3
2.1.2 Uso de subproductos pesqueros en alimentos balanceados para camarón .	5
2.2 Requerimientos de HUFA en camarón.....	6
2.3 Calidad Post-cosecha	7
2.3.1 Cambios relacionados con la fracción lipídica	7
2.3.2 Pigmentos carotenoides	8
2.4 El estrés.....	8
2.4.1 Papel de los HUFA en el estrés.....	9
2.4.2 Respuesta de escape.....	11
2.4.3 Estrés ante-mortem	12
2.4.4 Bioquímica post-mortem en camarón	14
2.4.5 Cambios post-mortem: catabolismo y cambios autolíticos del ATP	14
2.4.6 Oxidación de lípidos post-mortem	16
2.4.7 Defensas antioxidantes	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. HÍPOTESIS	21

6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Alimentos experimentales	22
6.1.1 Manejo de subproductos pesqueros para la elaboración de alimento.....	22
6.1.2 Elaboración de harinas experimentales	22
6.1.3 Elaboración de alimentos experimentales	22
6.2 Análisis químicos proximales	24
6.3 Diseño experimental	24
6.3.1 Tratamientos y desempeño en cultivo	24
6.4 Respuesta de escape y evaluación post-mortem	26
6.5 Cuantificación de nucleótidos y fosfágenos	28
6.5.1 Obtención y procesamiento de muestras (nucleótidos y fosfágenos)	29
6.5.2 Condiciones de HPLC para la cuantificación de nucleótidos	29
6.5.3 Preparación de estándares (nucleótidos)	29
6.5.4 Condiciones de HPLC para la cuantificación de Arg-P	30
6.6 Reservas, combustibles y metabolitos	30
6.6.1 Glucosa	30
6.6.2 Lactato	31
6.6.3 Glucógeno.....	32
6.6.4 Proteínas Totales	32
6.7 Análisis de lípidos	33
6.7.1 Determinación de ácidos grasos de los alimentos experimentales	33
6.7.2 Determinación de lípidos totales por gravimetría	34
6.7.3 Análisis de pigmentos carotenoides	34
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	35
8. RESULTADOS	36
8.1 Análisis químico proximal.....	36
8.2 Datos zootécnicos: desempeño en cultivo	36
8.3 Respuesta comportamental en la respuesta de escape	41

8.4 Metabolismo energético en la respuesta de escape.....	43
8.4.1 Degradación de nucleótidos (ATP)	43
8.4.2 ADP.....	46
8.4.3 AMP	48
8.4.4 IMP.....	51
8.4.5 Hipoxantina	53
8.5.1 Carga Energética Adenilica (CEA)	54
8.5.2 Fosfato de arginina (Arg-P)	57
8.6 Reservas, combustibles y metabolitos.	60
8.6.1 Glucosa.....	60
8.6.2 Lactato	61
8.6.3 Glucógeno.....	64
8.6.4 Proteínas totales	65
8.7 Análisis de lípidos	67
8.7.1 Lípidos totales en músculo de camarón.....	67
8.7.2 Lípidos totales en hepatopáncreas de camarón	68
8.8 Ácidos grasos	69
8.8.1 Ácidos grasos en músculo de camarón.....	69
8.8.2 Ácidos grasos en hepatopáncreas de camarón	70
8.9 Pigmentos.....	73
8.9.1 Pigmentos carotenoides en músculo.....	73
8.9.2 Pigmentos carotenoides en hepatopáncreas en camarón.	75
9. DISCUSIÓN	77
9.1 Desempeño en cultivo	77
9.2 Respuesta de escape.	80
9.2.1 Respuesta comportamental.....	80
9.2.2 Metabolismo energético en la respuesta de escape	82
9.3 Bioquímica post-mortem	86

9.3.1 Fosfato de arginina.....	86
9.3.2 Nucleótidos	87
9.3.3 Lípidos totales	93
9.3.4 Ácidos grasos.....	94
9.3.5 Pigmentos	96
10. CONCLUSIONES.....	99
11. LITERATURA CITADA	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Precios históricos de harinas de pescado (FAO, 2012).	3
Figura 2. Precios históricos de aceites de pescado (FAO, 2012).	4
Figura 3. Degradación de nucleótidos en camarón (Arai, 1966).	16
Figura 4. Esquema de la oxidación de HUFA (Halliwell, 1994).	17
Figura 5. Acción del tocoferol sobre peróxidos lipídicos y su regeneración en presencia de ascorbato y glutatión reducido (Salonen et al., 2003).	18
Figura 6. Instalaciones para bioensayo de crecimiento de camarón.	24
Figura 7. Toma de parámetros y mantenimiento del sistema.	25
Figura 8. Sistema de cultivo en taras para el grupo estrés.	27
Figura 9. Sistema de canastas para grupo control.	28
Figura 10. Efecto de los diferentes alimentos experimentales elaborados con subproductos pesqueros sobre la supervivencia (A) y el peso final (B) de juveniles de <i>L. vannamei</i> al cabo de 45 días de experimento.	39
Figura 11. Efecto de los alimentos experimentales sobre A) alimento consumido, B) factor de conversión alimenticia, y C) tasa de crecimiento en <i>L. vannamei</i> al cabo de 45 días de experimento.	40
Figura 12. Número de flexiones abdominales en camarón <i>L. vannamei</i> mediante respuesta de escape hasta un estado de agotamiento.	41
Figura 13. Tiempo de respuesta en camarón <i>L. vannamei</i> en respuesta de escape hasta un estado de agotamiento.	42
Figura 14. Concentración de ATP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	44
Figura 15. Efecto interactivo de las variables A) alimento-tiempo, B) alimento condición, y C) interacción alimento-tiempo sobre la concentración de ATP en músculo de camarón.	45
Figura 16. Concentración de ADP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	47

Figura 17. Efecto de las variables: A) tiempo post-mortem B) interacción tiempo post-cosecha-condición sobre la concentración de ADP en el músculo de camarón.....	47
Figura 18. Concentración de AMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos..	49
Figura 19. Efecto de los factores A) tiempo post-mortem, B) alimento, y C) interacción tiempo-alimento sobre la concentración de AMP en el músculo de camarón.....	50
Figura 20. Concentración de IMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	51
Figura 21. Efecto de los factores: A) Alimento y B) tiempo post--mortem, sobre la concentración de IMP en el músculo de camarón.	52
Figura 22. Concentración de hipoxantina ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones, con cuatro alimentos.	53
Figura 23. Efecto del factor tiempo post-mortem sobre la concentración de hipoxantina en el músculo de camarón..	54
Figura 24. Carga energética adenílica en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	55
Figura 25. Efecto de las variables: A) tiempo post-mortem y B) condición de estrés, sobre la carga energética adenílica en el músculo de camarón. ...	56
Figura 26. Concentración de Arg-P ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	58
Figura 27. Efecto de las variables: A) condición, B) tiempo post-cosecha, y C) interacción tiempo-condición, sobre la concentración de Arg-P en el músculo de camarón.....	59
Figura 28. Concentración de glucosa en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos..	60

Figura 29. Efecto del tiempo post-mortem sobre la concentración de glucosa	61
Figura 30. Concentración de lactato en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	61
Figura 31. Efecto interactivo de las variables A) alimento-tiempo, B) alimento condición, y C) tiempo-condición sobre la concentración de lactato en músculo de camarón.	63
Figura 32. Concentración de glucógeno en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	64
Figura 33. Concentración de proteínas totales en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	65
Figura 34. Efecto de la condición sobre la concentración de proteínas totales en el músculo de camarón.	66
Figura 35. Concentración de lípidos totales (g/100g) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.	67
Figura 36. Efecto de la condición sobre la concentración de lípidos totales en el músculo de camarón.	68
Figura 37. Concentración de lípidos totales (g/100g) en hepatopáncreas de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro diferentes alimentos.	69
Figura 38. Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en músculo de camarón.	74
Figura 39. Efecto de las variables: A) condición y B) tiempo post-cosecha, sobre la concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en el músculo de camarón.	74
Figura 40. Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en hepatopáncreas de camarón.	76
Figura 41. Efecto del factor condición sobre la concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas de camarón.	76

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Efecto de un estresor ante-mortem (actividad física) sobre la concentración de sustratos energéticos en condición post-mortem.....	13
Tabla II. Formulación de los diferentes alimentos experimentales	23
Tabla III. Composición química proximal de los alimentos.	37
Tabla IV. Desempeño en cultivo de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> ..	38
Tabla V. Tabla de interacciones en la concentración de ATP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	44
Tabla VI. Tabla de interacciones en la concentración de ADP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	46
Tabla VII. Tabla de interacciones en la concentración de AMP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	48
Tabla VIII. Tabla de interacciones en la concentración de IMP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	52
Tabla IX. Tabla de interacciones en la concentración de hipoxantina en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	53
Tabla X. Tabla de interacciones en la carga energética adenílica en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	55
Tabla XI. Tabla de interacciones en la concentración de Arg-P en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	58
Tabla XII. Tabla de interacciones en la concentración de glucosa en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	60
Tabla XIII. Tabla de interacciones en la concentración de lactato en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	62
Tabla XIV. Tabla de interacciones en la concentración de glucógeno en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	64
Tabla XV. Tabla de interacciones en la concentración de proteínas totales en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores. ...	65
Tabla XVI. Tabla de interacciones en la concentración de lípidos totales en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores. ...	67
Tabla XVII. Ácidos grasos (% en relación al total de ácidos grasos) en el músculo de camarón.....	71

Tabla XVIII. Ácidos grasos (% en relación al total de ácidos grasos) en hepatopáncreas de camarón	72
Tabla XIX. Tabla de interacciones en la concentración de pigmentos en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.	73
Tabla XX. Tabla de interacciones en la concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.....	75

1. INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de la acuicultura en las últimas décadas ha provocado un incremento en la demanda de harina y aceite de pescado, para la formulación de alimentos balanceados (Fraga et al., 2010). La sostenibilidad de los cultivos a nivel mundial se ha visto amenazada por el incremento de los precios de estas materias primas, teniendo en cuenta que el alimento es el costo operacional más elevado de esta industria, de ahí la necesidad de impulsar la búsquedas de ingredientes alternativos que permitan reducir los costos de producción (Barrows et al., 2007).

La búsqueda de ingredientes de bajo costo y alta calidad, e.g. un alto contenido de ácidos grasos altamente polinsaturados, o HUFA por sus siglas en inglés, en la elaboración de alimentos para organismos acuáticos, es de importancia fundamental (Villareal et al., 2004; Fraga et al., 2010; Guillaume et al., 2010; Sealey y Hardy, 2011). El uso de subproductos derivados de la industria pesquera, para la alimentación de especies acuáticas, constituye un aspecto de gran interés en la formulación de alimentos y a su vez, una alternativa para la disminución de los costos de cultivo por concepto de alimentación (Fraga et al., 1996).

Los residuos de la industria pesquera no destinados para el consumo humano, así como las vísceras de especies que se pescan en cantidades considerables, representan una alternativa como aporte de HUFA, especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA por sus siglas en inglés) y docosahexaenoico (DHA por sus siglas en inglés). Estos ácidos grasos son de suma importancia en la nutrición de peces marinos y crustáceos, dado que son ácidos grasos esenciales, constituyentes de las membranas celulares, y por lo tanto, cruciales para el correcto funcionamiento y estructura (Sargent et al., 2002).

Durante el periodo post-cosecha, se presenta una pérdida del número de nutrientes en los tejidos de los productos acuícolas, entre estos destacan la degradación de nucleótidos adenílicos, oxidación de vitaminas y lípidos, pigmentos y proteínas. El principal problema encontrado en el proceso post-

cosecha está relacionado directamente con la calidad del producto al momento de la cosecha, la cual se pierde continuamente durante el proceso post-mortem durante el almacenaje (Haard, 1992; Losada et al., 2006).

En crustáceos los trabajos relacionados con el manejo (manipulación) durante el cultivo y calidad post-cosecha son escasos. Sin embargo, al igual que en los peces, factores como la calidad química y nutricional de los alimentos pueden afectar fuertemente no solo el crecimiento y desarrollo de los camarones en cultivo, sino también su calidad desde el punto de vista comercial (Haard, 1992).

Se sabe que los niveles de inclusión de HUFA en la dieta tienen un efecto directo sobre la salud de las especies cultivadas; se ha reportado una reducción en la susceptibilidad al estrés en organismos alimentados con dietas enriquecidas con HUFA mejorando la condición fisiológica (Palacios et al., 2004).

El estrés juega un papel muy importante en el cultivo de crustáceos, especialmente durante la cosecha. Estudios recientes revelan que una exposición aguda o crónica al estrés en el cultivo de camarones tiene un fuerte impacto en las moléculas energéticas como ATP y subproductos, los cuales están muy relacionados con una cualidad de gran importancia en los productos acuícolas como el sabor (Mercier et al., 2006; Gornik et al., 2008; 2010).

El objetivo principal de este trabajo es contribuir al conocimiento de los fenómenos post-mortem en crustáceos cultivados, específicamente decápodos, así como a esclarecer el papel que juega el estrés y la influencia de alimentos enriquecidos con ácidos altamente insaturados DHA y EPA, en la degradación de lípidos y nucleótidos durante el proceso post-mortem del camarón.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nutrición acuícola

2.1.1 Estado de harinas y aceites de pescado

El rápido crecimiento de la acuicultura ha provocado un incremento en la demanda de harinas y aceites especialmente de pescado, para la formulación de alimentos balanceados. En 2010, se destinaron 20.2 millones de toneladas para fines no alimentarios, de los que un 75% (15 millones de toneladas) se redujo a harina y aceite de pescado. En la última década, la demanda por la harina y el aceite de pescado ha ido en aumento. La producción de harina de pescado alcanzó su máximo histórico en 1994 con 30.2 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) y ha seguido una tendencia fluctuante desde entonces, debido a la reducción de las capturas de anchoveta, disminuyendo hasta 15 millones de toneladas para el año 2010. En cuanto al aceite de pescado, la mejora de los desembarques y el acceso a las materias primas contribuyeron a incrementar la producción de aceite de pescado en 2011. A pesar de algunas variaciones, los precios de la harina y el aceite de pescado siguen siendo elevados, alcanzando valores de 1,800 USD/tonelada en el 2012 (Figuras 1 y 2) (FAO, 2012).



Figura 1. Precios históricos de harinas de pescado (FAO, 2012).



Figura 2. Precios históricos de aceites de pescado (FAO, 2012).

Entre las principales harinas y grasas utilizadas en alimentos acuícolas figuran las harinas y aceites de pescado entero, de subproductos de pescado y mariscos y harinas y aceites de fito y zooplancton. Aunque algunos tipos de zooplancton marino pueden usarse como ingredientes de alimentos para la acuicultura, solo se explota comercialmente el Krill antártico (*Euphausia superba*) con un total de 118,124 toneladas en el 2007, el cual comparado con los 17.9 millones de toneladas de pescado, producto de la pesca de captura marina, resulta poco viable como sustituto total. Sin embargo, se ha propuesto un posible uso de la harina de zooplancton empleándose en cantidades relativamente menores, como ingrediente bioactivo o atrayente en alimentos acuícolas o para larvas de peces. La harina y el aceite derivados del pescado o del marisco entero capturado en el medio silvestre, incluida la captura incidental, constituyen actualmente las principales fuentes de proteínas y lípidos de origen acuático disponibles para los alimentos (FAO, 2012).

La harina de pescado se elabora a partir de pescado entero o de restos de pescado, utilizando un alto número de especies para la producción de harina y aceite de pescado. Sin embargo, las especies pelágicas pequeñas, en particular, la anchoveta, son las que se emplean principalmente para su transformación; el volumen de harina y aceite de pescado producido en el mundo oscila anualmente en función de las variaciones de las capturas de estas especies (Tacon et al., 2011).

Se calcula que en la actualidad se utilizan alrededor de 6 millones de toneladas de recortes y desechos de pescado comestible para la producción de harina y aceite de pescado. De acuerdo con estimaciones realizadas por la Organización Internacional de la harina y el aceite de pescado, aproximadamente el 25 % de la producción de harina de pescado (1.23 millones de toneladas) procede de subproductos pesqueros en el 2008 y 36% en 2010. No se dispone de información precisa sobre el porcentaje de la producción mundial de harina y aceite de pescado que se elabora a partir de residuos del procesamiento de productos acuícola, aunque es probable que se trate de un volumen importante de residuos de peces cultivados (FAO, 2012).

Las razones de este aumento cabe atribuir las al rápido crecimiento experimentado en el sector de la acuicultura de peces de escama marinos y crustáceos, así como a la ausencia de fuentes alternativas rentables de lípidos comestibles que sean ricos en HUFA, incluidos el EPA y el DHA (Rana et al., 2009).

2.1.2 Uso de subproductos pesqueros en alimentos balanceados para camarón

En el pasado, los subproductos de la pesca, incluidos los desechos, se consideraban de bajo valor, o como un problema que había de eliminarse de la forma más conveniente o descartarse. En los dos últimos decenios, se ha registrado una mayor concientización en el plano mundial acerca de los aspectos económicos, sociales y ambientales de la utilización óptima de los subproductos de la pesca y de la importancia de reducir los descartes y las pérdidas en las fases posteriores a la captura (almacenamiento, elaboración y distribución). La utilización de los subproductos de la pesca se ha convertido en una industria importante en varios países; cada vez se presta más atención a la manipulación de los subproductos de forma controlada, segura e higiénica (FAO, 2012).

En México, el aprovechamiento de los recursos pesqueros es una actividad que genera desarrollo económico y social en el país. Baja California Sur es el tercer estado de mayor producción pesquera a nivel nacional y es el principal productor de calamar gigante (42.5% del total nacional) con una captura de 50 mil

toneladas en el año 2002 y de callo de hacha (52.2% del total nacional) con 250 mil toneladas en el año 2008 (CONAPESCA, 2011).

Con respecto al contenido de ácidos grasos en las materias prima, las almejas contienen alrededor de 15% de EPA en las vísceras (Arjona et al., 2008). Por otra parte, el calamar contiene en su manto hasta 35% de DHA (Drazen et al., 2009). Sin embargo, las vísceras de callo de hacha, así como la de calamar carecen de valor en el mercado, por lo que son desechadas. Estos desechos equivalen al 18% del peso total del animal en el caso del calamar y hasta un 60% para el callo de hacha. Considerando los altos volúmenes de producción pesquera para ambos recursos, resulta evidente el uso potencial de vísceras de calamar, así como de una gran variedad de almejas, como una alternativa para la obtención de productos de alto valor nutricional, principalmente HUFA n-3.

2.2 Requerimientos de HUFA en camarón

Los productos marinos son considerados una fuente rica de HUFA omega-3 (n-3), los cuales son ampliamente conocidos por su efecto benéfico en la salud. Entre los mariscos, los crustáceos como el camarón juegan un importante papel en la nutrición y salud humana, debido a que sirven como una fuente rica de proteínas, vitaminas, calcio y HUFA n-3 (Bragagnolo y Rodríguez-Amaya, 2001; Heu et al., 2003; Sirot et al., 2008).

Los HUFA como el ácido araquidónico (ARA), el EPA y el DHA son considerados como esenciales en los camarones peneidos. Los camarones, al igual que en la mayoría de los crustáceos marinos, tienen una capacidad limitada para sintetizar HUFA a partir del ácido linoléico (18:2n-6) y el ácido linolénico (18:3n-3). Por lo anterior, y como en la mayoría de los organismos marinos, los HUFA deben suministrarse en la dieta (Sargent et al., 2002).

Una dieta con n-3 HUFA juega un importante papel en la nutrición de peces y crustáceos, proporcionando ácidos grasos esenciales que son vitales constituyentes de las membranas celulares, y son necesarios para la estructura y normal funcionamiento de la membrana. Diversos estudios han reportado que el aceite de peces marinos (rico en EPA y DHA) es la mejor fuente de lípidos

para la elaboración de alimentos balanceados en camarón (Lim et al., 1997; González-Félix et al., 2002).

2.3 Calidad Post-cosecha

La aceptación de los productos marinos depende en gran medida de que sean seguros para el consumidor, tengan buena calidad nutricional, además del sabor, olor y textura. Sin embargo, durante y después del proceso de cosecha, estos productos se encuentran sujetos a reacciones que pueden modificar su calidad alimentaria, provocando una baja aceptación en el mercado (Haard, 1992).

2.3.1 Cambios relacionados con la fracción lipídica

El contenido de grasas de los pescados y mariscos es muy variable y, puede variar dependiendo de la especie, de la edad, del estado nutricional y del desarrollo gonadal, entre otros factores (Love, 1975; Hazel, 1979; Brown, 1986; Contreras-Guzmán, 2002).

En la mayoría de las especies pesqueras los depósitos de grasa consisten principalmente en ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) con un alto grado de insaturaciones (HUFA), tales como el DHA y EPA (Stansby y Hall, 1967; Haard, 1992; Huss, 1995). Sin embargo, se ha visto que el alto contenido de HUFA puede tener efectos negativos a nivel celular, debido al proceso de peroxidación. La peroxidación de los HUFA resulta en la producción de agentes tóxicos a las células si no se cuenta con un eficiente mecanismo de protección antioxidante. Por lo tanto, una elevada inclusión de estos ácidos grasos en la dieta puede conducir a procesos degradativos de la calidad por procesos oxidativos de los lípidos, especialmente durante el periodo de almacenaje en el cual se intensifica la oxidación, característico en procesos post-mortem.

Aunque muy poco se conoce acerca de la peroxidación de EPA y DHA en camarones peneidos, en peces se ha reportado que pueden llegar a afectar las propiedades de las membranas celulares y mitocondriales en el músculo (Kjaer et al., 2008; Todorcevic et al., 2009; Ostbye et al., 2009).

2.3.2 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son pigmentos solubles en grasas, también conocidos como lipocromos, y son uno de los grupos de pigmentos naturales marinos más importantes. A pesar de su distribución universal y su extensa abundancia en una variedad de animales acuáticos, los carotenoides son sintetizados *de novo* solamente por plantas y algunos microorganismos. Por lo tanto, los animales dependen de su suplemento en el alimento exógeno para cubrir sus requerimientos nutricionales y metabólicos (Bell et al., 2003; Bransden et al., 2005; Villalta et al., 2005).

La mayoría de los crustáceos contienen carotenoides, en alguna combinación, en el caparazón, así como en los ojos, sangre, huevos, hepatopáncreas y ovarios. Los pigmentos aislados de varias clases de crustáceos son usualmente la astaxantina, beta-caroteno, equineonona y cantaxantina. Diversos estudios han establecido que el carotenoide más importante en exoesqueleto y órganos internos en crustáceos es la astaxantina (Tanaka et al., 1976). El papel de los carotenoides en la nutrición de crustáceos consiste en proteger a las células de los compuestos oxidantes y peroxidantes (Kurshize et al., 1990). La reactividad de los carotenoides con radicales libres y estados de excitación del oxígeno, está igualmente bien documentada, indicando su papel como antioxidantes naturales efectivos (Meyers y Latscha, 1997). La presencia de un gran número de dobles enlaces hace a los carotenoides muy sensibles a la oxidación, especialmente en reacciones de fotooxidación con el oxígeno singlete. También se oxidan en presencia de lipoxigenasas, pero no de forma directa, sino por reacción con los hidroperóxidos. Las reacciones de oxidación dan lugar en todos los casos a la pérdida del color (Woodall et al., 1997; Carranco-Jáuregui et al., 2001).

2.4 El estrés

La captura, el manejo, el confinamiento y el transporte son prácticas comunes de la acuicultura, las cuales inducen una respuesta fisiológica de estrés tanto en peces como en crustáceos (Barton et al., 2000; Davis, 2004; Jentoft et al., 2005). Se sabe que los organismos responden a estos estresores, por un fenómeno llamado síndrome de adaptación general (GAS, por sus siglas en inglés) (Barton

et al., 2000). En crustáceos, el efecto primario del GAS involucra un incremento de la actividad de la hormona hiperglucémica bajo condiciones estresantes, resultando en cambios secundarios tales como el incremento de los niveles de glucosa y cambios en ciertas enzimas metabólicas y finalmente resulta en efectos terciarios, los cuales se manifiestan como cambios en el rendimiento fisiológico en todo el organismo (Wendelaar Bonga, 1997).

Dependiendo de la intensidad, así como de la duración de exposición ante un agente estresor, la respuesta de estrés se puede considerar crónica o aguda. Cuando el estímulo estresor se presentan en forma prolongada en el tiempo (días a semanas), la respuesta al estímulo se conoce como estrés crónico. Por el contrario, cuando los estímulos son puntuales (de minutos a horas), la respuesta se considera como estrés agudo (Pickering, 1993).

Durante el cultivo de camarón, diferentes variaciones ambientales y procedimientos de manejo realizados comúnmente resultan de una condición de estrés, por lo que se consideran agentes estresores. Algunos de los agentes estresores reportados son la alta concentración de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000), hipoxia (Pérez-Rostro et al., 2004), salinidad (Hurtado et al., 2007) y temperatura (Pascual et al., 2003). Además del estrés que puede ser provocado por factores ambientales, se tiene registro del estrés inducido durante el manejo; entre estos estresores destacan la ablación del pedúnculo ocular, extracción del espermátforo, el proceso mismo de captura, cosecha, y a largo plazo, el cultivo a altas densidades (Newman, 2000; Perazzolo et al., 2002; Nga et al., 2005).

2.4.1 Papel de los HUFA en el estrés

Se tiene ampliamente documentado que la suplementación de HUFA en el alimento de camarones peneidos produce mejores resultados de crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés por cambios ambientales, siendo la temperatura y salinidad los parámetros más estudiados (Xu et al., 1994; Kontara et al., 1997; Wouters et al., 1997; González-Félix et al., 2002).

Recientemente, se han propuesto los HUFA como moléculas capaces de modular o atenuar la respuesta de los organismos ante distintas condiciones

desfavorables (Calder, 2001). Un ejemplo de estos ácidos grasos es un eicosanoide derivado del ARA, la prostaglandina PGE2. Se ha demostrado que la administración de ARA produce incrementos en los niveles de PGE2 y una mejor respuesta al estrés (Bell et al., 1996).

En peces se sabe que el incremento en la producción de PGE2 en organismos suplementados con ARA, regula la síntesis de cortisol a través del eje hipófisis-hipotálamo, lo que resulta en una mejor respuesta al estrés agudo, que se traduce en una mayor supervivencia de las larvas. Koven et al. (2001) encontraron una baja mortalidad en larvas de dorada (*Sparus aurata*) sujetas a estrés por manipulación, al ser alimentadas con rotíferos enriquecidos con ARA, comparados con aquellos que no fueron suplementados con ARA. En otro estudio realizado por Koven et al. (2001), larvas de pez alimentadas con suplemento de ARA mostraron una mayor resistencia al estrés agudo por manipulación, pero al mismo tiempo fueron más susceptibles al estrés crónico inducido por fluctuaciones diarias en la salinidad, comparadas con larvas alimentadas con dietas bajas en ARA.

Sin embargo, hasta la fecha se tienen pocos registros del efecto de suministrar HUFA en el alimento, en la resistencia al estrés en camarones peneidos. Palacios et al. (2004) encontraron una mayor supervivencia en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sujetos a estrés por salinidad, al ser alimentados con nauplios de *Artemia* con diferentes niveles de inclusión de HUFA, lo cual se atribuyó a un incremento de la respuesta de mecanismos osmoreguladores, particularmente la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa presente en las branquias. Esto está basado en la hipótesis de que el enriquecimiento de los alimentos con HUFA puede afectar la composición de ácidos grasos en las membranas de los tejidos, especialmente en branquias, modulando así la actividad de las enzimas asociadas a las membranas.

Si bien se observó un incremento en la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, no está del todo claro si el incremento también es resultado de una mejor condición fisiológica a su vez derivado de un mejor estatus nutricional. A la fecha se encuentra muy poco estudiado el efecto de los HUFA sobre el estrés por

manipulación en camarones peneidos. Una excepción es el estudio realizado por Mercier et al. (2009), en el cual se probó el enriquecimiento de alimentos con diferentes niveles de HUFA, encontrando que el alimento con altos niveles de HUFA contrarrestó parcialmente el efecto negativo del estrés por manipulación, medido a través de la supervivencia de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*. Aguilar et al. (2012), probaron el incremento de ARA en el alimento de juveniles de *L. vannamei* cultivados a altas densidades, encontrando una disminución de la respuesta al estrés durante el muestreo, así como incrementos en la respuesta del sistema inmune, tales como el tiempo de coagulación y el estallido respiratorio.

2.4.2 Respuesta de escape

La respuesta de escape es un comportamiento común de organismos acuáticos y componentes críticos de las interacciones predador-presa, dado que permite minimizar la probabilidad de ser capturado (Arnott et al., 1998). Sin embargo, también puede presentarse en respuesta a sustancias nocivas, al alimentarse (Wine y Krasne, 1972) o durante el proceso de muda (Dehn et al., 1985).

Muchos crustáceos de la clase Malacostraca como langostinos, langostas y camarones poseen un abdomen elongado que pueden utilizar para propulsar al animal a través del agua mediante un poderoso nado o "tail-flip" en inglés. El tail-flip o respuesta de escape consiste en una serie de flexiones abdominales repetitivas seguidas de una extensión lo que provoca la propulsión del organismo en sentido opuesto al estímulo estresor (Arnott et al., 1998).

La respuesta comportamental de la respuesta de escape ha sido propuesta como un modelo para simular los eventos que ocurren durante una cosecha tradicional con atarraya a pie de estaque en un cultivo de camarón. Este modelo consiste en el conteo total de flexiones abdominales que realiza un organismo, así como el tiempo en que llega a un estado de agotamiento fisiológico (Thébault et al., 1994; Yu et al., 2009).

El músculo abdominal de crustáceos decápodos involucrados en las respuestas rápidas de escape, comprende principalmente fibras del tipo rápidas que están bioquímicamente adaptadas para una actividad metabólica interna. Estas fibras en el músculo de crustáceos son generalmente similares en estructura y

propiedades metabólicas a las fibras del tipo rápidas de vertebrados (Beis y Newsholme, 1975; Gornik et al., 2008). Para satisfacer las demandas de energía de la respuesta de escape y una gran variedad de procesos fisiológicos, se requiere de la utilización de energía anaeróbica (glucólisis anaerobia) (Ellington, 1983). La disminución de nucleótidos (ATP), la acumulación de lactato por glucólisis anaerobia y el agotamiento de glucógeno, son algunas de las respuestas metabólicas típicas durante la actividad física interna como la respuesta de escape (Paterson, 1993; Hervant et al., 1999), dado que la mayor parte de la energía se genera por vía anaeróbica. Morris y Adamczewska (2002), mostraron que un breve periodo de ejercicio en el cangrejo *Gecarcoidea natalis*, agota las reservas de fosfato de arginina (Arg-P), consume glucógeno y resulta en la acumulación de lactato en el músculo.

Gäde (1984) evaluó el efecto de la respuesta de escape mediante flexiones abdominales hasta el agotamiento fisiológico sobre el metabolismo energético en el cangrejo *Orconectes limosus*, encontrando disminución de la carga energética adenílica (CEA), aumento en la concentración de lactato en músculo y una disminución de la Arg-P. Esto concuerda con lo reportado para diversos crustáceos en los que se ha investigado los efectos de la respuesta de escape en los principales combustibles y reservas metabólicas (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Morris y Adamczewska, 2002).

2.4.3 Estrés ante-mortem

Existen numerosos estudios sobre el deterioro y los efectos de almacenamiento en el músculo de crustáceos (Sidhu et al., 1974; Stroud et al., 1982; Shimada et al., 2000; Mendes et al., 2001; Aubourg et al., 2007), sin embargo es poco conocida la vía por la cual los agentes estresores ante-mortem cambian la bioquímica post-mortem y por lo tanto la calidad de los productos cultivados. Se ha reportado en diversos estudios realizados sobre peces y crustáceos, los cuales son usados como fuente de alimento, la influencia y el papel que juegan los agentes estresores ante-mortem en el curso de los eventos post-mortem.

En un estudio realizado por Gornik et al. (2010) en la langosta *Nephrops norvegicus*, se evaluó el efecto de la aplicación de cuatro agentes estresores

(actividad física, emersión, inanición e infección con un parásito), encontrando cambios significativos en la concentración de diversos metabolitos. De manera general, se puede observar una disminución de la CEA, como consecuencia de la disminución de la concentración del ATP, aunado al incremento de ADP y AMP, así como el agotamiento de la reserva de Arg-P. Con respecto a los metabolitos se encontró una disminución del glucógeno, así como un aumento en la concentración de lactato en músculo. Estos autores concluyeron que la aplicación de un agente estresor ante-mortem influencia de manera importante el curso de los eventos post-mortem, como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Efecto de un estresor ante-mortem (actividad física) sobre la concentración de diversos sustratos energéticos en condición post-mortem.

METABOLITO	ANTE-MORTEM		POST-MORTEM (24HRS)		
	Basales	Ejercitados	Basales	Ejercitados	
ARG-P	38.54	4.79	5.0	0	*
GLUCÓGENO	83.60	58.75	20	20	
LACTATO	5.96	34.47	80	110	
ATP	3.53	2.68	1.5	1.0	
ADP	0.93	2.28	1.5	2.0	*
AMP	0.25	2.07	4.0	6.0	*
IMP	Nd	Nd	2.0	3.0	
HIPOXANTINA	Nd	Nd	Nd	Nd	
CEA	0.86	0.57	0.20	0.20	

*Estadísticamente diferente al control; Unidades expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1}$ músculo. Arg-P: fosfato de arginina; CEA: carga energética adenílica; ATP: Adenosin Trifosfato; ADP: Adenosin difosfato; AMP: Adenosin Monofosfato; IMP: Inosin Monofosfato. Tomado de Gornik et al., 2010.

2.4.4 Bioquímica post-mortem en camarón

Tras la captura y muerte del camarón, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno y de toda una serie de nutrientes celulares. El sistema mitocondrial deja de funcionar en todas las células y el ATP disminuye gradualmente por la acción de diversas ATPasas, algunas propias de las proteínas contráctiles y otras de los sistemas de membrana. Una pequeña cantidad de ATP es re-sintetizado temporalmente por la conversión de la Arg-P en arginina y la transferencia del fosfato al ADP (Nazir y Magar, 1963; Iwamoto et al., 1987). Posteriormente tiene lugar la glucólisis anaerobia, acumulándose lactato como producto final, con la concomitante disminución del pH muscular (Love, 1979; Haard, 1992; Huss, 1995).

Distintos estudios indican que el contenido de glucógeno, la velocidad de degradación y consecuentemente el pH final del músculo varía según la especie, el tipo de músculo, el estado nutricional del organismo, la condición gonadal y el grado de agotamiento al momento de la muerte (Huss, 1995).

2.4.5 Cambios post-mortem: catabolismo y cambios autolíticos del ATP

El ATP es convertido, por reacciones de desfosforilación, primero en adenosina difosfato (ADP) y posteriormente en adenosina monofosfato (AMP). El AMP es a su vez desaminado a inosin monofosfato (IMP) y este se degrada a inosina (HxR) e hipoxantina (Hx) (Saito et al., 1959; Ehira et al., 1986).

En general, esta degradación procede de la misma forma en las especies marinas, sin embargo, en invertebrados marinos la ruta de degradación de los nucleótidos no ha sido claramente descrita. Diversos estudios proponen para estos organismos un mecanismo alternativo, que considera una secuencia de desfosforilaciones hasta adenosina (Ade), posteriormente se degrada a HxR e Hx y en algunos casos puede formarse xantina y ácido úrico (Saito et al., 1959; Arai, 1966; Hiltz y Dyer, 1973; Sakaguchi et al., 1990) (Figura 3).

En el periodo post-mortem en camarón, las moléculas de ATP se hidrolizan rápidamente hasta IMP por la acción de enzimas endógenas (Tarr, 1966; Okuma et al., 1992). La posterior degradación a HxR e Hx es lenta y participan enzimas

autolíticas y microbianas (Ryder et al., 1993). Distintos estudios han determinado que la velocidad de estas reacciones enzimáticas varía entre especies (Ryder, 1985; Sakaguchi et al., 1990), con el tipo de músculo (Obatake et al., 1988), con la condición biológica (sexo, estadio gonadal, etc.) (De Vido de Mattio et al., 1992, 2001) y condiciones de almacenamiento (Surette et al., 1988).

La concentración de los metabolitos de degradación de ATP durante el almacenamiento en hielo de distintos productos pesqueros, ha sido ampliamente utilizada como indicadores biológicos del grado de frescura (Saito et al., 1958; Ehira y Uchiyama, 1973; Yokoyama et al., 1994). Se ha demostrado que el IMP es el principal responsable del aroma y del sabor del pescado fresco; incluso en Japón es usado como un agente saborizante (Kuninaka et al., 1964).

Es bien sabido que los aminoácidos y nucleótidos que son componentes esenciales en los productos cárnicos, pescados y mariscos, contribuyen de gran manera a las propiedades organolépticas de los productos. La característica de sabor de estas sustancias es llamada "umami" en japonés. El umami es un sabor característico impartido por el glutamato y por los 5'ribonucleótidos como el IMP y juegan un papel importante en el realce del sabor, palatabilidad y aceptabilidad de los alimentos (Yamaguchi et al., 1971).

Por el contrario, la Hx imparte un sabor amargo típico del pescado en deterioro (Hughes y Jones, 1966). Saito et al (1959), fueron los primeros en desarrollar un índice para el análisis de la calidad del pescado basados en las concentraciones de todos los productos de degradación de ATP, dicho índice es conocido como el valor K. Otros índices no tan difundidos son el valor H, basado en la formación de Hx (Loung et al., 1991) y el índice G que da mayor importancia a la formación de HxR (Burns y Ke, 1985).

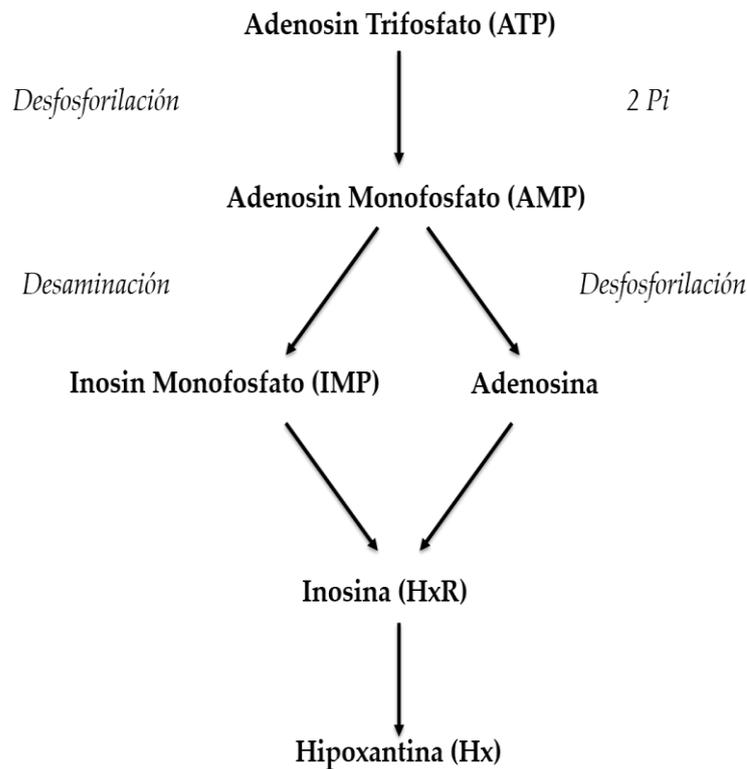


Figura 3. Degradación de nucleótidos en camarón (Arai, 1966).

En crustáceos vivos predomina la concentración de ATP, ADP y AMP, el balance entre estos metabolitos es un importante factor en la regulación del metabolismo celular que puede ser descrito o representado por la “carga energética adenilica” y que representa otro índice para determinar la condición fisiológica del organismo ($CEA = [ATP] + \frac{1}{2} [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$). En condición post-mortem la carga energética va a variar de la cantidad de ATP que el organismo tenía al momento de la muerte y está en función de la condición fisiológica y los agentes estresores a los que haya estado expuesto, así como al método de captura y las condiciones de almacenamiento.

2.4.6 Oxidación de lípidos post-mortem

Las modificaciones más importantes que tienen lugar en la fracción lipídica, durante el almacenamiento post-mortem en los productos acuícolas están relacionadas con procesos de hidrólisis y reacciones de oxidación (Deng, 1978; Ladikos y Lougovois, 1990). Ambas reacciones son de gran importancia para la vida útil de estos productos, ya que dan como resultado distintas sustancias, las

cuales algunas tienen sabores y olores desagradables (rancidez) y otras pueden contribuir a cambios en la textura (Haard, 1992; Huss, 1995). Los HUFA presentes en los lípidos del pescado son oxidados mediante un mecanismo autocatalítico dando hidroperóxidos, compuestos inodoros e insípidos (Ladikos y Lougovois, 1990) (Figura 4).

Estos hidroperóxidos continúan degradándose formándose aldehídos, cetonas, alcoholes, pequeños ácidos carboxílicos y alcanos que originan un extenso espectro de olores y en algunos casos decoloración (Fujii et al., 1989). Estas reacciones autocatalíticas pueden ser aceleradas por calor, luz (especialmente luz UV) y diversas sustancias orgánicas e inorgánicas (tales como Cu y Fe).

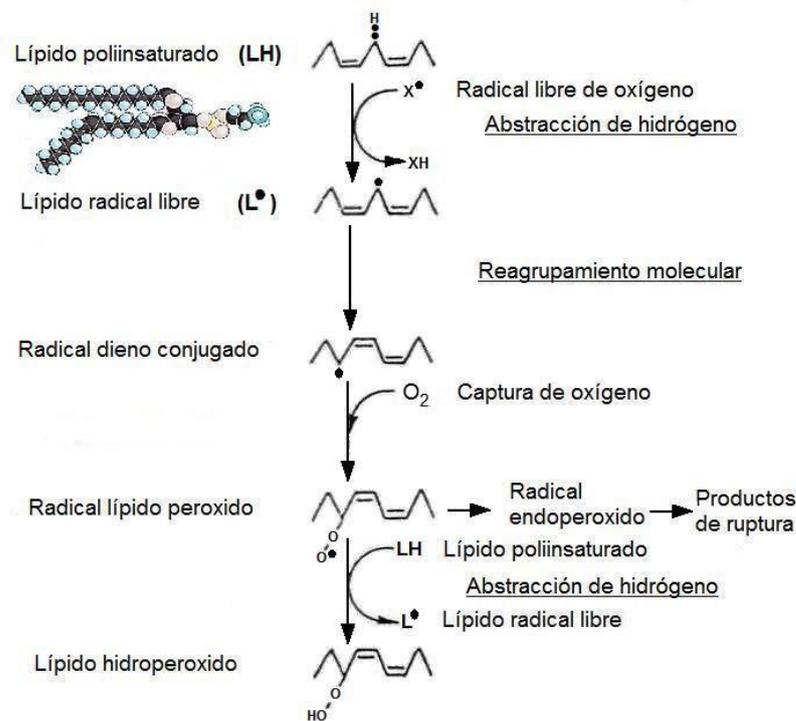


Figura 4. Esquema de la oxidación de HUFA (Halliwell, 1994).

2.4.7 Defensas antioxidantes

La célula posee mecanismos de protección dirigidos contra los productos de la oxidación lipídica. La acción de la enzima glutatión peroxidasa, reduce los hidroperóxidos en las membranas celulares a compuestos hidroxílicos. Esta reacción requiere un suministro de glutatión reducido y por lo tanto cesa cuando el organismo muere y la sustancia se agota en la célula. Las membranas también contienen un compuesto fenólico, alfa-tocoferol (Vitamina E), el cual es considerado como el más importante antioxidante natural. El tocoferol puede donar átomos de hidrógeno a los radicales L· o LOO·. Se asume que el radical tocoferil resultante reacciona con el ácido ascórbico (Vitamina C) en la interfase lípido/agua regenerándose la molécula de tocoferol (Figura 5) (Salonen et al., 2003).

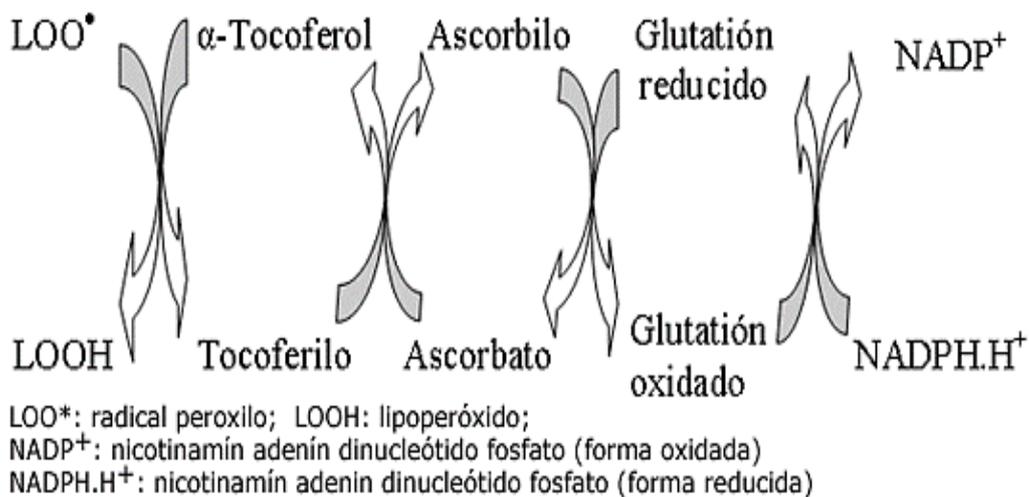


Figura 5. Acción del tocoferol sobre peróxidos lipídicos y su regeneración en presencia de ascorbato y glutatión reducido (Salonen et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés juega un papel muy importante en el cultivo de crustáceos, especialmente durante la cosecha. Se ha reportado que una exposición aguda al estrés en el cultivo de camarones tiene un fuerte impacto en metabolismo del ATP y hacia productos de degradación como el IMP y la hipoxantina, los cuales, al igual que los lípidos peroxidados, están muy relacionados con la calidad post-cosecha.

En condiciones de cultivo se pueden controlar algunos factores dietarios, los cuales pueden influir sobre la calidad alimentaria de los productos al momento de la cosecha como sería el enriquecer los camarones con un mayor contenido de HUFA n-3. Se tiene reportado que el aporte de HUFA n-3 disminuye la susceptibilidad al estrés de peces y mariscos, lo cual resulta un efecto benéfico en la calidad post-cosecha.

Sin embargo, debido a la creciente demanda de piensos acuícolas empleados en la elaboración de alimentos balanceados como la harina y el aceite de pescado, ha generado un incremento en los costos de producción. Por lo tanto, resulta esencial la sustitución total de la harina y aceite de pescado por alimentos elaborados con subproductos de productos pesqueros ricos en estos ácidos grasos, en productos de alto valor comercial en el mercado como es el camarón.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto interactivo del estrés por manipulación y alimentos experimentales elaborados con subproductos pesqueros con alto contenido de HUFA n-3 sobre la bioquímica post-mortem del camarón, específicamente en los productos de la respuesta de estrés y el análisis de daño lipídico.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto que tiene el suministro de alimentos ricos en HUFA y el estrés por manipulación en la respuesta de estrés.
- Determinar el efecto que tiene el suministro de alimentos ricos en HUFA y el estrés por manipulación en la degradación post-mortem del ATP.
- Determinar el efecto que tiene el suministro de alimentos ricos en HUFA y el estrés por manipulación en la oxidación de lípidos

5. HÍPOTESIS

La aplicación de una condición de estrés tendrá un efecto acelerador sobre degradación post-mortem de nucleótidos que será atenuado por el suplemento de HUFA en el alimento. Sin embargo, el uso de alimentos elaborados a partir de subproductos pesqueros de calamar y almeja, ricos en HUFA, promoverá la oxidación de lípidos en diferentes tejidos del camarón durante el proceso post-mortem. Los resultados a obtener serán de importancia para que se tomen ciertas precauciones que permitan optimizar la vida de anaquel.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Alimentos experimentales

6.1.1 Manejo de subproductos pesqueros para la elaboración de alimento

El calamar *Dosidicus gigas* fue capturado en febrero del 2012 en la bahía de la Paz B.C.S., a bordo del barco experimental BIP II perteneciente al CIBNOR. Una vez capturada se mantuvo dentro de la bodega del barco en congelación a -15 °C, transportadas y almacenadas a -18°C en el laboratorio de nutrición experimental en las instalaciones del CIBNOR.

Las vísceras de callo de hacha (*Pinna rugosa* y *Atrina maura*) fueron donadas por pescadores de Puerto San Carlos B.C.S. en junio del 2012. Las muestras fueron colectadas en bolsas plásticas negras y almacenadas en hielo durante su transporte y almacenadas en un congelador a -18°C en el CIBNOR.

6.1.2 Elaboración de harinas experimentales

Las materias primas (vísceras de calamar y callo de hacha) se descongelaron y se pesaron en lotes de 1 kg y se colocaron dentro de un colador de acero inoxidable y se cocieron en agua a 100°C en una olla con capacidad de 80 litros por 5 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en charolas plásticas dentro de un horno de aire (VWR International, Cornelius, OR, USA) a 60°C por 24h. Las vísceras cocidas y secas se pasaron por un molino para obtener partículas pequeñas y se pulverizaron en un molino de café. Ya pulverizadas las vísceras se pasaron por un tamiz de 250 µm y se almacenaron en bolsas de plástico en refrigeración a 5°C hasta su utilización.

6.1.3 Elaboración de alimentos experimentales

Se elaboraron tres alimentos experimentales en la planta de alimentos experimentales del CIBNOR siguiendo el método descrito por Civera y Guillaume 1989. Los alimentos se formularon para hacer una sustitución al 100% de la harina y aceite de pescado y ser isoproteicos, variando solo el contenido de lípidos; la formulación se realizó usando el software Nutrition y los niveles de inclusión de los diferentes ingredientes pueden observarse en la tabla II.

Los ingredientes sólidos que se utilizaron fueron molidos y pasados a través de un tamiz de 250 µm mezclándose primero los macro ingredientes secos: harina experimental (sardina, calamar o callo de hacha), harina integral de trigo y grenetina en una mezcladora por 15 minutos. Se hicieron las premezclas de los micro ingredientes (vitamina C, cloruro de colina, premezclas de vitaminas y minerales) y se incorporaron a los macro ingredientes mezclando por 15 min.

La pasta resultante fue pasada a través de un molino de carne en dos ocasiones, la primera en forma rápida y la otra más lentamente por un dado de 2.7 mm de diámetro cortando los pellets manualmente y colocándolos sobre charolas para secar en un horno a 60°C por 24 h. Posteriormente se almacenaron en bolsas de plástico en refrigeración a 5°C y se destinó una muestra de cada alimento para determinar su composición química proximal y contenido de lípidos.

Tabla II. Formulación de los diferentes alimentos experimentales

INGREDIENTES	ALIMENTOS EXPERIMENTALES		
	Laboratorio	Callo de hacha	Calamar
<i>H. de pescado</i>¹	32	-	-
<i>H. experimental</i>²	-	32	32
<i>H. integral de trigo</i>³	42.18	29.38	31.48
<i>Pasta de soya</i>⁴	17.5	30	28.20
<i>Ácido algínico</i>⁵	2.00	2.00	2.00
<i>Lecitina de soya</i>⁶	2.50	2.50	2.50
<i>Vitaminas</i>⁷	1.80	1.80	1.80
<i>DSP</i>⁸	1.20	1.20	1.20
<i>Minerales</i>⁹	0.50	0.50	0.50
<i>Cloruro de colina</i>¹⁰	0.20	0.20	0.20
<i>Vitamina C</i>¹¹	0.10	0.10	0.10
<i>BHT</i>¹²	0.2	0.2	0.2
Total	100	100	100

¹Harina comercial de Sardina Monterrey, Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México. ²Elaboradas en el Laboratorio de Nutrición Acuícola, CIBNOR. ³Central de Abastos de La Paz, B.C.S., México. ⁴Promotora Industrial Acuasistemas, S.A. de C.V. La Paz, B.C.S., México. ⁵Sigma-Aldrich 180947-05031-1, St. Louis, MO, EUA. ⁶Restaurant vegetariano Rey Sol, La Paz, B.C.S., México. ⁷VITCRU1301: Acetato de vitamina A, 15000 IU; D3, 7500 IU; E, 400 mg; K₃, 20 mg; Tiamina monohidrato, 150 mg; riboflavina, 100 mg; piridoxina HCl, 50 mg; ácido pantoténico, 100 mg; niacina, 300 mg; biotina, 1 mg; inositol, 500 mg; ácido fólico, 20 mg; cianocobalamina, 0.1 mg. ⁸Fosfato dibásico de Sodio, SIGMA-ALDRICH # cat. S0876, Sigma Co. St. Louis, MO, EUA. ⁹MINCRU1301, 62% agente activo (g/kg alimento): MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.09; KCl, 0.5; MnCl₂·4H₂O, 0.0234; CuCl₂·2H₂O, 0.005; KI, 0.5; CoCl₂·6H₂O, 0.0025. ¹⁰35% agente activo, ICN # cat. ICN101386 ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EUA.

6.2 Análisis químicos proximales

Los ingredientes que se utilizaron en la formulación de alimentos experimentales, así como los alimentos ya elaborados, se analizaron en el laboratorio de Bromatología del CIBNOR, para conocer su contenido en proteína, extracto etéreo, humedad, fibra cruda, energía y cenizas por métodos de gravimetría según la A.O.A.C (1995).

6.3 Diseño experimental

Juveniles de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* provenientes de los laboratorios de acuicultura Marh se llevaron a las instalaciones del laboratorio de Nutrición Acuícola en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (CIBNOR) en la ciudad de la Paz, Baja California Sur, México.

6.3.1 Tratamientos y desempeño en cultivo

El sistema de cultivo donde se realizó el bioensayo se encuentra instalado en el laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR. Para la realización de este experimento se montó un sistema intensivo que consistió de 16 tanques de fibra de vidrio de 60 L de capacidad en los cuales se colocaron 10 organismos por acuario (Figura 6). El número de acuarios se dividió en cuatro tratamientos: Alimento laboratorio (con 100% harina de pescado y sin aceite de pescado), Alimento de vísceras de calamar, alimento de vísceras de callo de hacha y alimento comercial de la marca Purina (35% de proteína).



Figura 6. Instalaciones para bioensayo de crecimiento de camarón.

Las condiciones para el funcionamiento óptimo del sistema fueron de 80% de recambio diario por acuario, fotoperiodo de 12 horas luz, temperatura de 27 ± 0.5 °C mantenida por medio de un calentador sumergible de titanio, salinidad de 40 ‰ y 6 mg/L de oxígeno disuelto.

Los organismos de 0.6 gramos fueron alimentados a saciedad aparente mediante 2 raciones diarias (10:00 y 17:00 h) durante 45 días de experimento. Al inicio del bioensayo se proporcionó el 10% de la biomasa total del acuario y a partir del segundo día se corrigió dicha cantidad tomando como referencia la cantidad de alimento residual estimada por apreciación visual cada día.



Figura 7. Toma de parámetros y mantenimiento del sistema.

Diariamente se realizó el mantenimiento y monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de los acuarios; el monitoreo consistió en tomar lecturas de temperatura y oxígeno disuelto con un oxímetro, al igual que la medición de la salinidad con un refractómetro. El mantenimiento se realizó mediante la disminución del nivel de agua de los acuarios en un 80% para realizar la estimación del alimento residual, conteo de los organismos y ocurrencia de mudas. Posteriormente se procedió a retirar el alimento y heces con la ayuda de un sifón, finalizando con el llenado de los acuarios (Figura 7).

Se realizaron 3 biometrías para determinar el peso de los organismos a los 15, 30 y 45 días con el uso de una balanza digital. Con los datos zootécnicos

generados a partir de este bioensayo se evaluaron diversos criterios biológicos con las siguientes formulas:

Sobrevivencia

$$\text{Sobrevivencia } S = \frac{N_f}{N_i} \times 100$$

Donde **NF** es el número final de organismos y **Ni** es el número inicial de organismos.

Tasa de crecimiento

$$\text{Tasa de crecimiento porcentual } TC = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$$

Donde **Pf** es el peso final del organismo y **Pi** es el peso inicial del organismo.

Alimento consumido

$$\text{Alimento Consumido (mg/organismo/día)} = \frac{\text{Alimento total consumido}}{N_i + N_f/2 \times \text{tiempo (días)}}$$

Donde **Ni** es el número de organismos iniciales y **NF** el número de organismos finales.

6.4 Respuesta de escape y evaluación post-mortem

Al final de la evaluación del desempeño en cultivo, se tomaron un total de 144 organismos (36 por tratamiento) en estadio de muda C-D0 mediante la verificación de los urópodos en el microscopio, según el método descrito por Promwicorn et al., 2004 . Para cada uno de los tratamientos se aplicaron 2 condiciones de muestreo: estrés y controles (no estresados).

Para el grupo estrés se implementó un sistema de cultivo que consistió de 18 taras plásticas de 80 L de capacidad. Las condiciones experimentales se mantuvieron a una temperatura de 27 °C, oxígeno disuelto de 6 mg/L y salinidad de 40‰ (Figura 8).



Figura 8. Sistema de cultivo en taras para el grupo estrés.

En cada una de las taras se colocó un organismo un día antes del muestreo, con un periodo de ayuno de 18 h. Al cabo de ese tiempo se indujo una condición de estrés por manipulación, el cual consistió en la persecución del organismo aplicando un estímulo constante cerca del rostro mediante un tubo de PVC. Para evaluar el número de flexiones típicas de la respuesta de escape del camarón, se tomó video del organismo hasta que dejó de presentar este reflejo (agotamiento), lo cual también permitió evaluar el tiempo en el cual se llegó a dicho agotamiento.

Para el grupo control se implementó un sistema de canastas hechas de malla con recubrimiento plástico. Las canastas se colocaron en un tanque circular de plástico con una capacidad de 800L (Figura 9). Las condiciones experimentales se mantuvieron a una temperatura de 27 °C, oxígeno disuelto de 6 mg/L y salinidad de 40‰. En cada una de las canastas se colocó un organismo un día antes de ser muestreados con un periodo de ayuno de 18 h. Para el muestreo de los camarones del grupo control, se tomó una canasta y se destapó teniendo cuidado de no perturbar al organismo. La captura del organismo se realizó capturándolo rápidamente con la mano tomando las precauciones necesarias para evitar el estrés.



Figura 9. Sistema de canastas para grupo control.

Inmediatamente después del muestreo, se introdujo al organismo a un contenedor con nitrógeno líquido para evaluar la condición fisiológica del organismo en el caso del tiempo cero o en agua hielo para las determinaciones a los dos y cuatro días post-mortem. Los organismos sacrificados se embolsaron y etiquetaron de manera individual.

Las muestras del tiempo cero se conservaron en nitrógeno líquido durante el periodo de muestreo y posteriormente se almacenaron en un ultra congelador a -80°C para su posterior análisis. Para las muestras de los tiempos post-mortem, estas se mantuvieron en hielo dentro de un cuarto frío hasta cumplir el tiempo destinado para su muestreo (2 o 4 días post-mortem). Posteriormente se sacaron las muestras del hielo y se almacenaron a -80°C .

6.5 Cuantificación de nucleótidos y fosfágenos

La cuantificación se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (modelo 1100, Agilent Technologies) de fase reversa de intercambio iónico según el método descrito por Moal et al. (1989). Se utilizó un protocolo implementado por Robles-Romo et al. (2013) para la medición de nucleótidos por HPLC y se utilizó el protocolo implementado por Viant et al. (2001) para la medición de Arg-P.

6.5.1 Obtención y procesamiento de muestras (nucleótidos y fosfágenos)

Se obtuvo un extracto de músculo del primer segmento abdominal sin exoesqueleto y sin descongelarse, este se homogenizó en un homogenizador criogénico (MM400) (2 min a 25 rpm): El polvo criogénico obtenido se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml, se mantuvieron en CO₂ durante el muestreo y se almacenó a -80°C, hasta su procesamiento.

En caso del músculo, el polvo fue pesado (100 a 150 mg) y colocado en ácido tricloroacético (1.5 ml TCA 0.5M) frío. Las muestras de músculo fueron homogenizadas en un polytron Sentry por 30 s a 2000 rpm en tubo de ensayo (13 x 100 mm) y centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4°C. Se recuperaron 0.5 ml del sobrenadante que fue neutralizado con 1.3 ml de una mezcla de trietilamina y diclorometano (1:5), agitándose con vortex 30 s.

Se volvió a centrifugar (5 min a 2000 g a 4°C), se midió el pH, el cual no debe ser menor a 6; en caso contrario se agregó una proporción mayor de la mezcla con respecto a la muestra para neutralizar el pH. Se recuperaron 4 alícuotas de 50 ml que se almacenaron a -80 °C para la cuantificación posterior de nucleótidos y fosfato de arginina por HPLC.

6.5.2 Condiciones de HPLC para la cuantificación de nucleótidos

La cuantificación se realizó por HPLC de fase reversa utilizando una columna Hyperclone ODS (C18) 3 µm 150 x 4.6 mm (PHENOMENEX No. Cat 00F-4356-EO), utilizando una fase móvil 0.15 M de NaH₂PO₄, 0.003 M de tetrabutilamonio, al 8% de metanol y ajustado a pH de 6 con NaOH 5 N, el tiempo de corrida fue de 20 min a un flujo de 0.8 ml/min. Se utilizó un detector UV con una longitud de onda fija de 254 nm.

6.5.3 Preparación de estándares (nucleótidos)

Se preparó una solución madre de cada nucleótido (ATP, ADP, AMP, IMP, GTP y GDP) en una concentración aproximada de 0.5 mg ml⁻¹ utilizando agua miliQ. A partir de esta se realizó una dilución 1:100 con buffer (fase móvil) obteniéndose así una solución diluida de cada nucleótido de 5 µg ml⁻¹. Posteriormente se realizó una mezcla de nucleótidos a partir de estas soluciones diluidas. Para

finalizar se tomó una alícuota 100 µl de la mezcla anterior en viales ámbar y se almacenaron a -20 °C, esto viales son los que se inyectan en cada corrida.

6.5.4 Condiciones de HPLC para la cuantificación de Arg-P

A partir del mismo extracto utilizado para la cuantificación de los nucleótidos, se cuantificaron por HPLC los niveles de Arg-P siguiendo las indicaciones descritas por Viant et al. (2001). La cuantificación se realizó por HPLC de fase reversa utilizando una columna SphereClone NH₂O 5 µm 250 x 4.6 mm, marca PHENOMENEX, utilizando una fase móvil 20 mM de K H₂ PO₄ (pH 2.6)-acetonitrilo (72:28), el tiempo de corrida fue de 22 min a un flujo de 1 ml/min. La identificación y el cálculo de la concentración se realizaron con base en un estándar de Arg-P (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se utilizó un detector UV con una longitud de onda fija de 205 nm.

6.6 Reservas, combustibles y metabolitos

Para realizar los análisis bioquímicos de músculo se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido del primer segmento abdominal. El tejido fue disectado sobre una placa fría para evitar su descongelamiento y nuevamente se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis, una vez pesados fueron liofilizados durante 24 horas. A continuación se calculó el porcentaje de humedad y se procedió a hidratar y homogenizar las muestras con agua desionizada en un homogeneizador fast-prep24 durante 20s para obtener un extracto crudo. Posteriormente se realizaron las determinaciones bioquímicas, se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976), glucógeno, lactato, glucosa y lípidos totales según Racotta y Hernández-Herrera (2000).

6.6.1 Glucosa

Para la determinación de glucosa, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP). Este método se basa en la oxidación enzimática de la glucosa en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina dando un colorante

rojo violeta (absorbancia máxima a 490 nm) que es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra y que fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 12.5, 5, 50 y 100 mg dl⁻¹.

Para el análisis se tomó 20 µl del extracto crudo de músculo o 20 µl de estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregó 200 µl de solución reactiva, se incubaron 30 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 490 nm.

6.6.2 Lactato

La cuantificación de lactato se realizó por medio de una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX, No. catálogo LC 2389). En este método el ácido láctico reacciona en presencia de oxígeno y por medio de la reacción catalizadora por la lactato oxidasa se produce piruvato + peróxido de hidrogeno, este último compuesto reacciona con 4-clorofenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa dando lugar a un compuesto colorido (quinoneimina), el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra y que fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 1.25, 2.5, 10, 20 y 40 mg dl⁻¹.

En el análisis de lactato en músculo, se tomaron 0.3 ml del extracto crudo de cada muestra y se mezclaron con 0.3 ml de TCA al 20 % en tubos eppendorf, con la finalidad de precipitar proteínas que interfiere en la medición. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendor 5810 R). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. Posteriormente se extrajeron 20 µl de muestra o 20 µl de estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregaron 200 µL de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 540 nm.

6.6.3 Glucógeno

Para la determinación de glucógeno, se tomaron 0.3 ml de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.3 ml de TCA al 20 % en tubos eppendorf, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Eppendor 5810 R). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios.

El glucógeno se determinó por el método de antrona (Van Handel, 1965), para muestras pequeñas. Para la extracción de glucógeno del sobrenadante de TCA, se tomaron 0.1 ml del sobrenadante de cada muestra, se le añadieron 2 ml de etanol para precipitar el glucógeno.

Las muestras se centrifugaron a 3600 rpm y se eliminó todo el etanol, con pipeta y se evaporó en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM) a 70 °C, una vez hecho lo anterior se resuspendió el glucógeno con 0.1 ml de agua destilada. Posteriormente, a cada tubo de muestra y de la curva tipo, se le agregaron 1 ml de solución de antrona 0.1 % diluida en H₂SO₄ al 72 %. Las preparaciones anteriores se calentaron a 90°C a baño María durante 5 minutos. Por último, se enfriaron, también a baño María, y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm.

Curva tipo: La solución estándar de glucógeno contiene 5 mg ml⁻¹, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 µl de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg ml⁻¹de glucógeno.

6.6.4 Proteínas Totales

Para determinar las proteínas de las muestras, se utilizó el método de Bradford (1976). Este método se basa en la reacción de los grupos amino libres con el azul Cromassie en presencia de ácido fosfórico y metanol. El complejo formado por la proteína y el colorante provoca un desplazamiento en la absorción máxima del colorante desde 465 a 595 nm. La absorción es proporcional a la concentración de proteína de manera lineal desde 1 µg a 140µg usando una solución reactiva comercial (BioRad #500-0006).

Para muestras de tejidos, se utilizó una alícuota de 10 μl del homogeneizado la cual fue diluida con 90 μl de NaOH 0.1N durante 120 minutos, posteriormente se tomaron 10 μl de la dilución, se colocaron en un tubo de vidrio limpio y se agregó un mililitro de reactivo de Bradford, se deja la reacción 5 minutos y se leyó en un espectrofotómetro BIORAD 550 a una absorbancia de 595 nm.

Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2 mg ml^{-1} de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg ml^{-1} de proteína y se utilizó solución salina como blanco.

6.7 Análisis de lípidos

6.7.1 Determinación de ácidos grasos de los alimentos experimentales

Se realizó una disección del segundo segmento abdominal y se tomaron 100 mg de músculo. Se les agregó 6 ml de solución Folch (cloroformo: metanol, 2:1), 10 μl de BHT (butilhidroxitolueno) como antioxidante a una concentración de 0.5 mg/ml, 10 μl de 23:0 (ácido tricosanoico) como estándar interno a una concentración de 2 mg/ml y se guardaron dentro de un congelador a -20°C por 24 horas; transcurrido el tiempo se sonicaron por 15 minutos (sonicador BRANSON 2510, Danbury, USA). El extracto lipídico obtenido se separó en dos alícuotas, una de ellas se evaporó a sequedad en un evaporador centrífugo al vacío (JOUAN RCT90, Saint-Herblain, Francia). Se agregó 1 ml de BF_3 al 14% a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de hexano y se realizaron de 2 a 3 lavados con 1 ml de agua destilada para eliminar impurezas y separar la fracción de agua conteniendo las impurezas del hexano con los metil ésteres de ácidos grasos (FAME). Las muestras fueron centrifugadas a $720 \times g$ a 5°C por 5 minutos (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) en cada lavado. Posteriormente, se congeló el agua a -20°C por 24 horas y se recuperó la fase de hexano que contiene los FAME y se transfirió a un vial ámbar de 2 ml y se almacenaron a -20°C hasta su inyección en el cromatógrafo

Los FAME se analizaron en un cromatógrafo (Agilent Technologies 6890N) con detector FID; utilizando una columna capilar DB-23 (50% Cianopropil-50% metilpolisiloxano) de 30 m de longitud x 0.25 μm de espesor de película x 0.25

mm de diámetro interno utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 0.8 ml/min, una rampa de temperatura de 110–220°C. La identificación de FAME se realizó comparando el tiempo de retención de la muestra con una mezcla de estándares comerciales (SIGMA) y la cuantificación en base al estándar interno (23:0) de la muestra.

6.7.2 Determinación de lípidos totales por gravimetría

Se colocaron tubos de 10 ml en un horno de temperatura controlada a 80°C por 24 horas, hasta alcanzar un peso constante. Se colocaron los tubos en un desecador y se dejaron enfriar 1 h, después se registró el peso de cada uno de los tubos. Se agregaron 2 ml del extracto lipídico de las muestras (obtenido por el método de Folch) y se pasó por micro-columnas en pipetas Pasteur rellenas de sílice hidratado al 6%, eluyendo con 10 ml de solución Folch (cloroformo: metanol 2:1) evaporando a sequedad con nitrógeno. Se colocaron los tubos nuevamente en el horno de a 30°C de temperatura por 24 horas y se pesaron los tubos con el extracto lipídico.

6.7.3 Análisis de pigmentos carotenoides

Se tomaron 3 ml del extracto lipídico obtenido con solución Folch. Posteriormente se realizó una purificación en micro-columnas Pasteur. Utilizando un evaporador de solventes las muestras ya eluidas se evaporaron a 3 ml. Se separó 1 ml para la determinación de pigmentos totales y se procedió a evaporar a sequedad con nitrógeno gaseoso (N₂) e inmediatamente se re-suspendieron en acetona grado HPLC. Finalmente las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda (470, 665 y 666 nm).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis fueron realizados con el programa STATISTICA (versión), utilizando un nivel de significancia del 95% ($P < 0.05$). Inicialmente, se verificó que todos los datos presentaran una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y que sus varianzas fueran homogéneas (prueba de Bartlett). En los casos donde alguna de estas condiciones no se cumplió, los datos fueron transformados y probados nuevamente.

Se realizó un Análisis de Varianza unifactorial considerando únicamente el efecto del tipo de alimento sobre los parámetros evaluados en el caso de las variables del desempeño en cultivo, así como para la respuesta de escape donde se evaluó el número de coletazos y el tiempo de respuesta.

Con la finalidad de evaluar la influencia del estrés ante-mortem sobre la degradación de nucleótidos y el daño a lípidos post-mortem, se realizó un análisis trifactorial. Con este análisis se pretende evaluar el efecto combinado de los 3 factores sobre las distintas variables, considerando al estrés ante-mortem como el primer factor, el tipo de alimento consumido como el segundo factor y el tiempo post-mortem como el tercer factor. En los casos donde se presentaron diferencias significativas, se procedió a la comparación de medias individuales por medio de pruebas a posteriori de Tukey. Cuando se encontraron efectos significativos de dos o más factores, se muestran las medias globales, indicando las diferencias significativas entre ellas.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis químico proximal

En el análisis químico proximal de los cuatro diferentes alimentos se encontraron valores muy similares de proteína, fibra cruda, cenizas y extracto libre de nitrógeno (ELN). Con respecto al extracto etéreo de los alimentos, que representan la cantidad de lípidos totales en los alimentos experimentales, se encontró una mayor concentración de lípidos en el alimento elaborado con subproductos de calamar (8.73%) (Tabla III).

8.2 Datos zootécnicos: desempeño en cultivo

La inclusión de harinas de subproductos pesqueros mostró un efecto significativo sobre el resto de los alimentos en los parámetros zootécnicos evaluados en este estudio (Tabla IV). Al final del experimento, se encontraron diferencias significativas en el peso final de los organismos ($P < 0.05$), destacando los camarones alimentados con subproductos de callo de hacha (5.6 g) y calamar (6.5 g) alcanzando los mayores pesos en relación al alimento comercial.

Se observaron diferencias significativas en la supervivencia acumulada al final del experimento ($P < 0.05$), encontrando una menor supervivencia del grupo de camarones del alimento comercial (77%), comparada con el resto de los tratamientos donde se presentaron supervivencias mayores al 95% (Figura 10). Además, se encontraron diferencias significativas para los parámetros de tasa de crecimiento ($P < 0.01$), alimento consumido ($P < 0.01$), así como para el factor de conversión alimenticia ($P < 0.05$), donde los camarones alimentados con vísceras de calamar registraron un desempeño mayor en cada uno de los parámetros antes mencionados (Figura 11).

Tabla III. Composición química proximal de los alimentos.

	<i>Hacha</i>	<i>Calamar</i>	<i>Laboratorio</i>	<i>Comercial</i>
<i>Humedad</i>	9.06	9.20	9.01	6.93
<i>Proteína</i>	38.54	38.06	35.60	38.96
<i>Extracto etéreo</i>	5.23	8.73	5.97	7.68
<i>Fibra cruda</i>	1.23	1.23	1.63	4.49
<i>Cenizas</i>	9.84	6.84	10.13	12.12
<i>ELN</i>	45.1	45.1	46.6	36.7
<i>Energía (cal/g)</i>	4146.58	4409.64	4079.62	4277.62

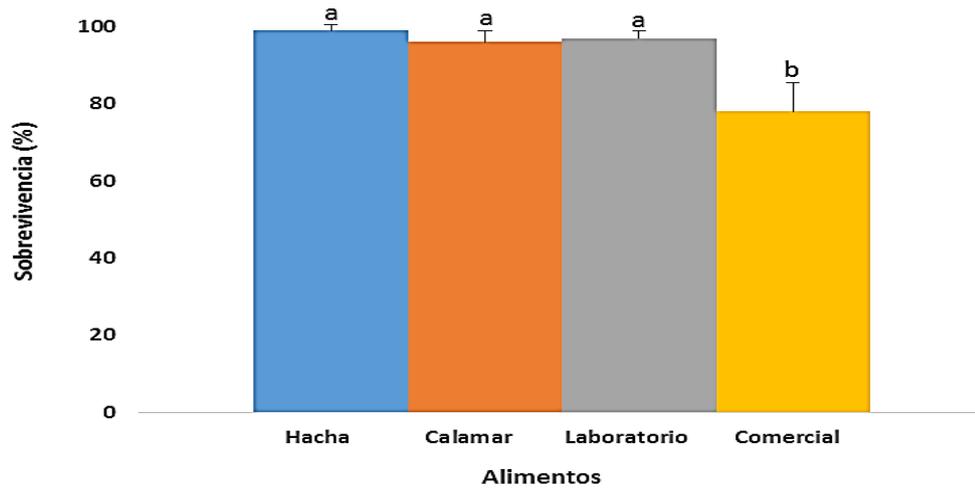
*Valores expresados en porcentajes en base seca, excepto humedad. ELN: extracto libre de nitrógeno.

Tabla IV. Desempeño en cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

	LABORATORIO	COMERCIAL	HACHA	CALAMAR	VALOR P
Sobrevivencia	96.7 ± 1.8 ^a	77.5 ± 7.5 ^b	98.6 ± 1.4 ^a	95.7 ± 3.0 ^a	P<0.05
Peso final	3.35 ± 0.08 ^c	3.26 ± 0.22 ^c	5.67 ± 0.12 ^b	6.55 ± 0.18 ^a	P<0.01
Tasa de crecimiento	951 ± 19.3 ^c	937 ± 61.6 ^c	1666 ± 35.2 ^b	1908 ± 50.7 ^a	P<0.01
Alimento consumido	0.10 ± 0.003 ^c	0.08 ± 0.003 ^c	0.16 ± 0.005 ^b	0.22 ± 0.005 ^a	P<0.01
FCA	1.58 ± 0.02 ^a	1.31 ± 0.06 ^b	1.40 ± 0.015 ^b	1.63 ± 0.04 ^a	P<0.05

Los resultados se reportan como medias ± error estándar para cada uno de los diferentes alimentos probados en el experimento. El valor de P indica el grado de significancia del Anova de 1 vía, P<0.05 indica diferencia significativa y p<0.01 diferencia altamente significativa. Las diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos.

A) Supervivencia



B) Peso final

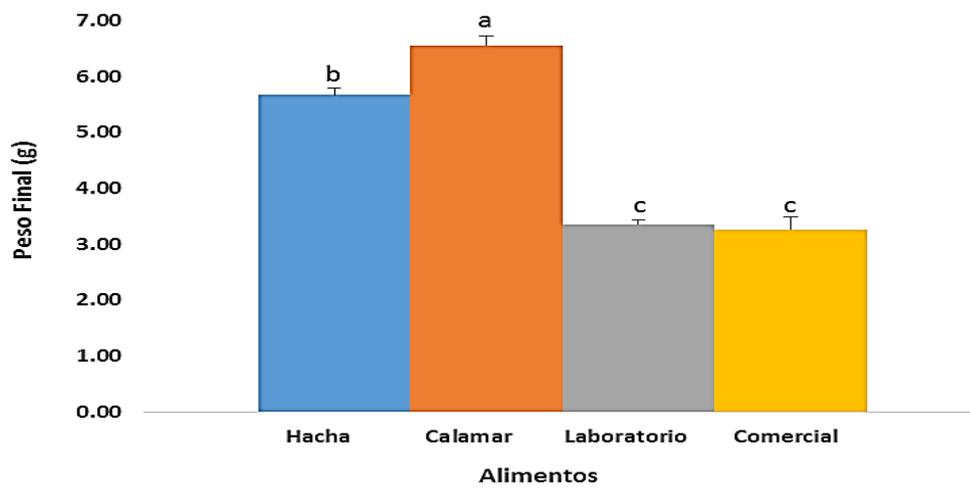
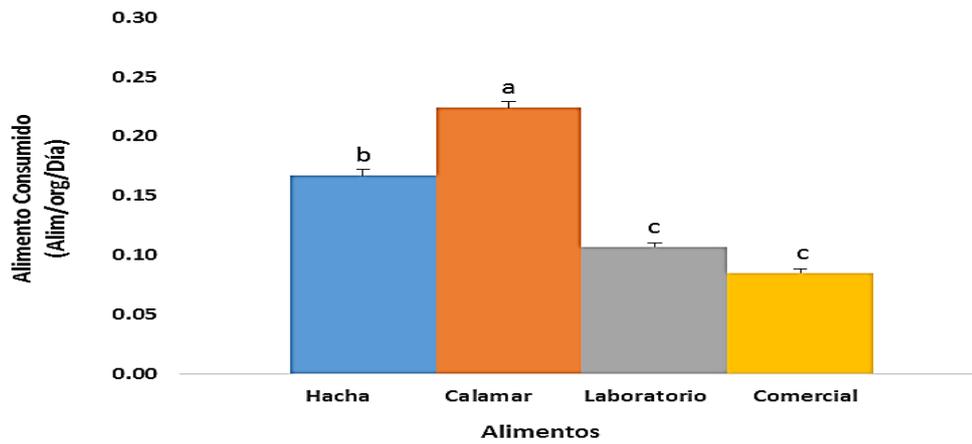
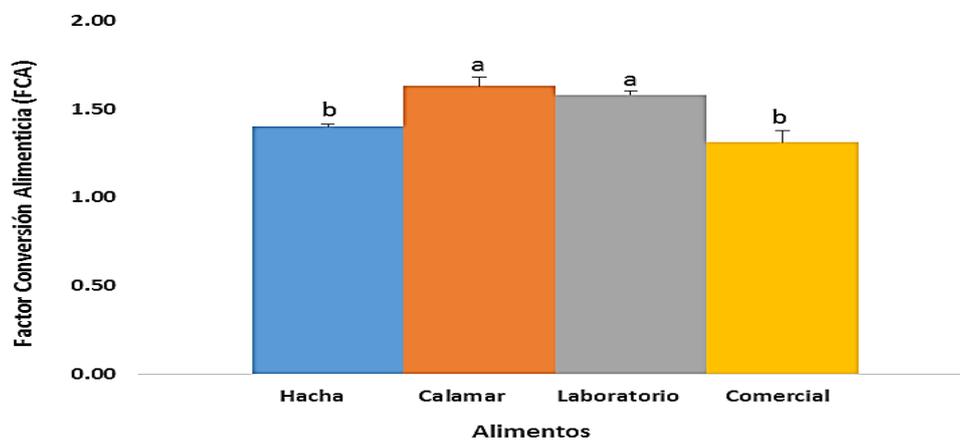


Figura 10. Efecto de los diferentes alimentos experimentales elaborados con subproductos pesqueros sobre la supervivencia (A) y el peso final (B) de juveniles de *L. vannamei* al cabo de 45 días de experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

A) Alimento consumido



B) Factor de conversión alimenticia (FCA)



C) Tasa de crecimiento

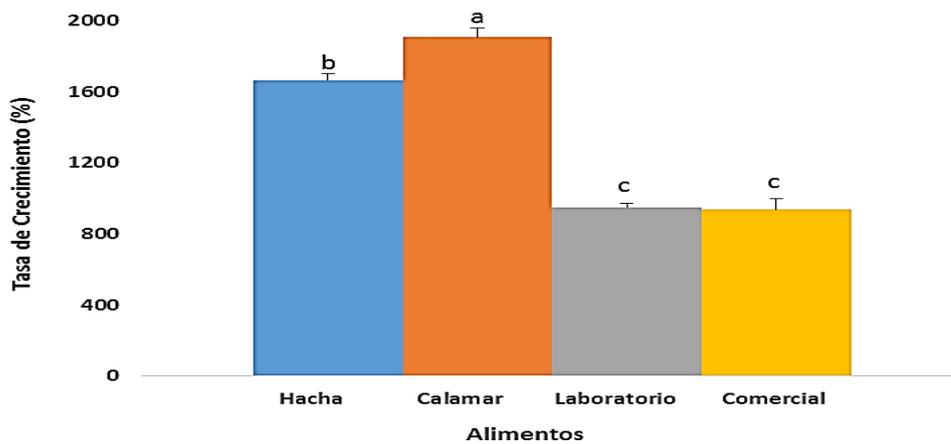


Figura 11. Efecto de los alimentos experimentales sobre A) alimento consumido, B) factor de conversión alimenticia, y C) tasa de crecimiento en *L. vannamei* al cabo de 45 días de experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

8.3 Respuesta comportamental en la respuesta de escape

La evaluación de la respuesta comportamental, los camarones alimentados con subproductos mostraron una mayor capacidad de respuesta, registrando un promedio de 38-41 flexiones abdominales (coletazos), comparado con los organismos alimentados con el tratamiento comercial o alimento laboratorio en base a pescado, los cuales presentaron una menor capacidad de respuesta con 23-27 coletazos (Figura 12). Se encontraron diferencias significativas para el número de flexiones abdominales realizadas en la respuesta de escape, al igual que para el tiempo de respuesta ($P < 0.05$).

Con respecto al tiempo en el cual se presentó la respuesta de escape, éste fue mayor para los camarones alimentados con subproductos de callo de hacha, con un tiempo promedio de 55 segundos hasta alcanzar el agotamiento fisiológico. Por el contrario el menor tiempo que se mantuvo la respuesta resultó para los organismos del tratamiento comercial y de laboratorio con un tiempo de 34 segundos (Figura 13).

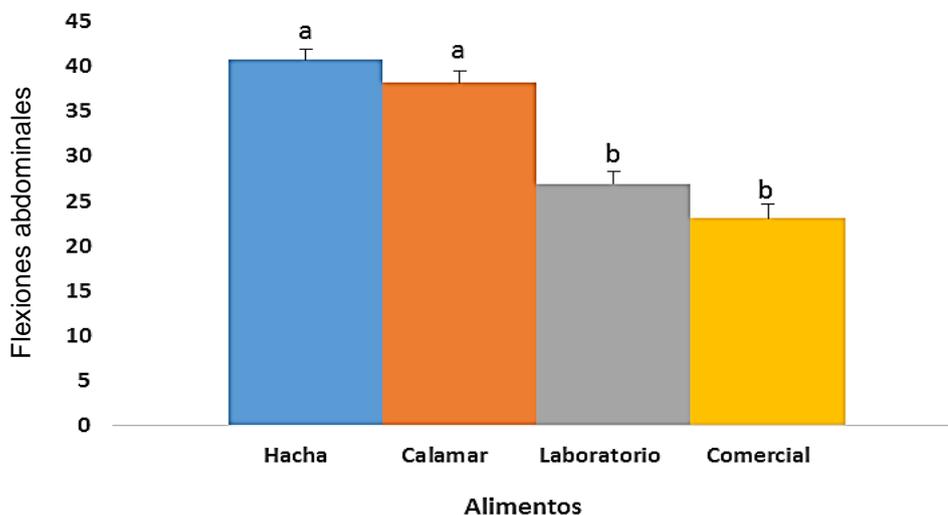


Figura 12. Número de flexiones abdominales en camarón *L. vannamei* mediante respuesta de escape hasta un estado de agotamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

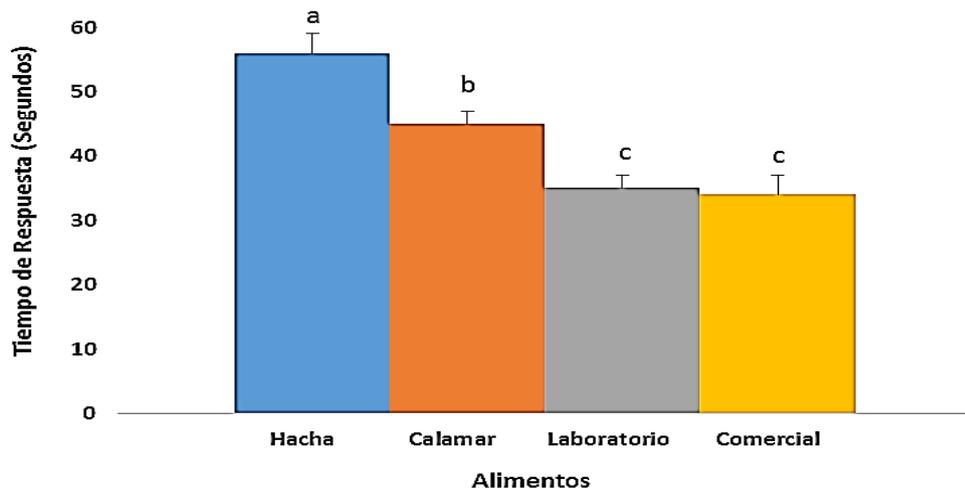


Figura 13. Tiempo de respuesta en camarón *L. vannamei* en respuesta de escape hasta un estado de agotamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

8.4 Metabolismo energético en la respuesta de escape

8.4.1 Degradación de nucleótidos (ATP)

Se encontraron diferencias significativas para la concentración de ATP en músculo de camarón para los factores tiempo post-mortem y tipo de alimento consumido, así como para la interacción de los factores tiempo post-mortem-Alimento (Tabla V) (Figura 14). De manera general se observó una mayor concentración de ATP en los organismos de la condición control, en particular en los camarones alimentados con callo de hacha al tiempo cero (2.5 mg g^{-1}).

Se observó una relación inversa en la concentración de ATP con respecto del tiempo post-mortem, donde a medida que transcurre el tiempo post-mortem, la concentración de ATP disminuye. La mayor concentración de ATP se registró en los organismos del tiempo cero ($4 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$), mientras que para el día dos post-mortem la concentración de ATP cae considerablemente ($0.16 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) y se mantiene baja hasta el cuarto día (Figura 15a).

Con respecto al efecto del tipo de alimento consumido en la concentración de ATP, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.01$), registrando la mayor concentración de ATP en los camarones alimentados con vísceras de callo de hacha, siendo estos últimos los que presentaron la mayor concentración de ATP ($2.2 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) (Figura 15b).

Se encontraron diferencias significativas para el efecto por la interacción tiempo post-mortem-alimento para la concentración de ATP en músculo de camarón ($P < 0.05$). Se encontró una mayor concentración de ATP en los camarones del tiempo cero post-cosecha, destacando dentro de ese grupo los organismos alimentados con vísceras de callo de hacha con una concentración de ($5.37 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$). En los tiempos dos y cuatro post-mortem las concentraciones de ATP en músculo de camarón se mantuvieron bajas para todos los alimentos. (Figura 15c).

Tabla V. Tabla de interacciones en la concentración de ATP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	**
Tiempo post-mortem	**
Estrés	NS
A x T	**
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

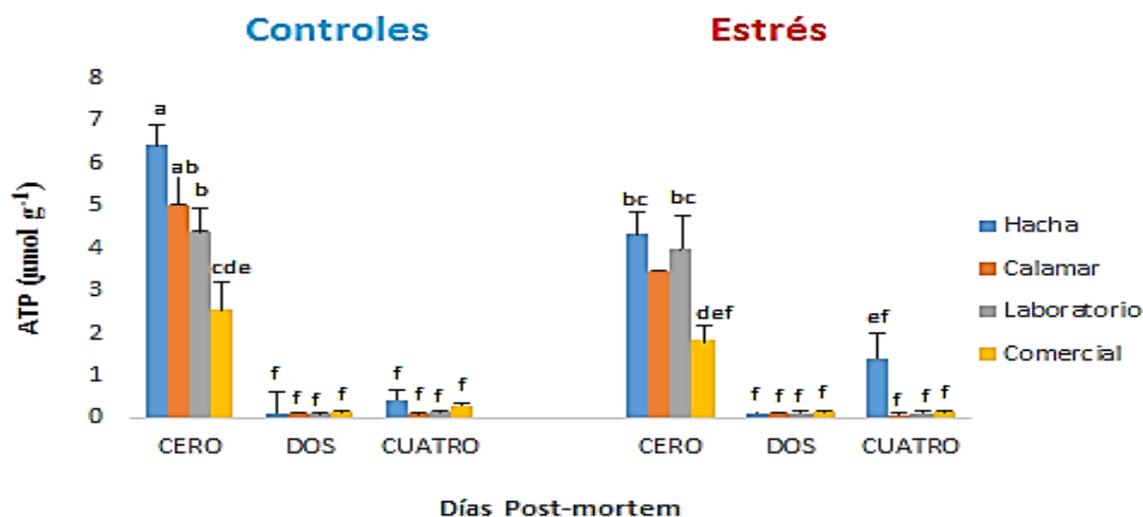
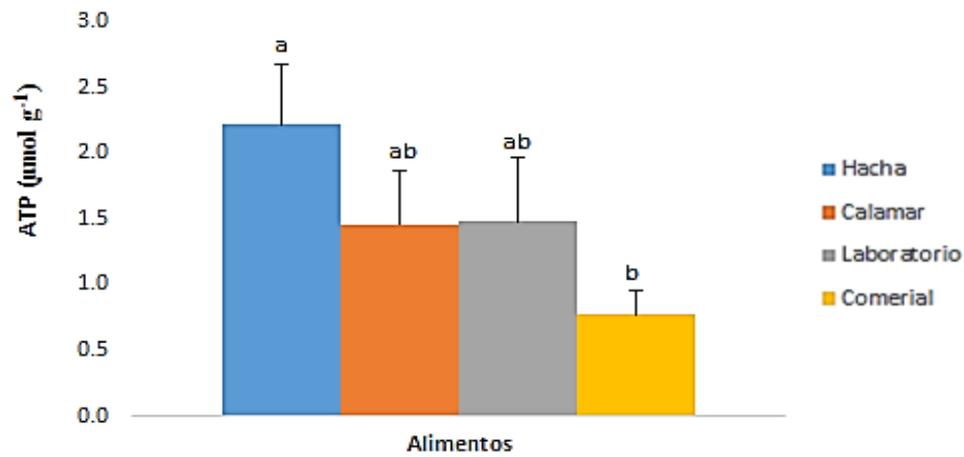
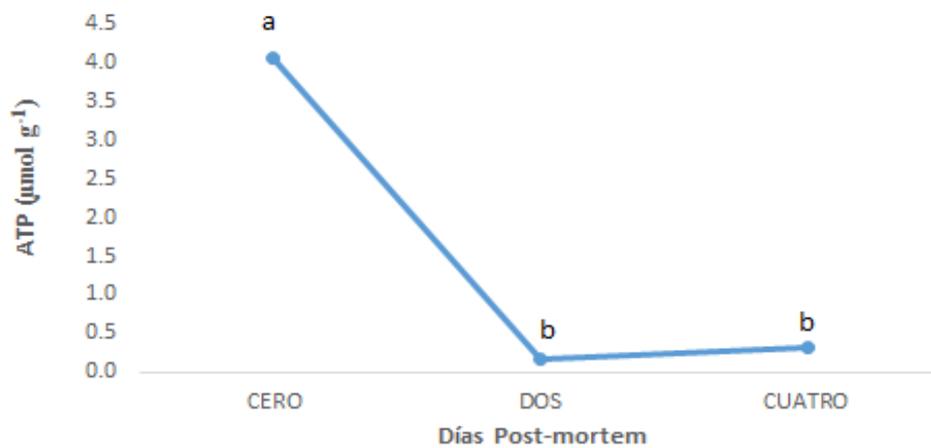


Figura 14. Concentración de ATP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

A) Alimento



B) Tiempo post-mortem



C) Interacción tiempo post-mortem - alimento

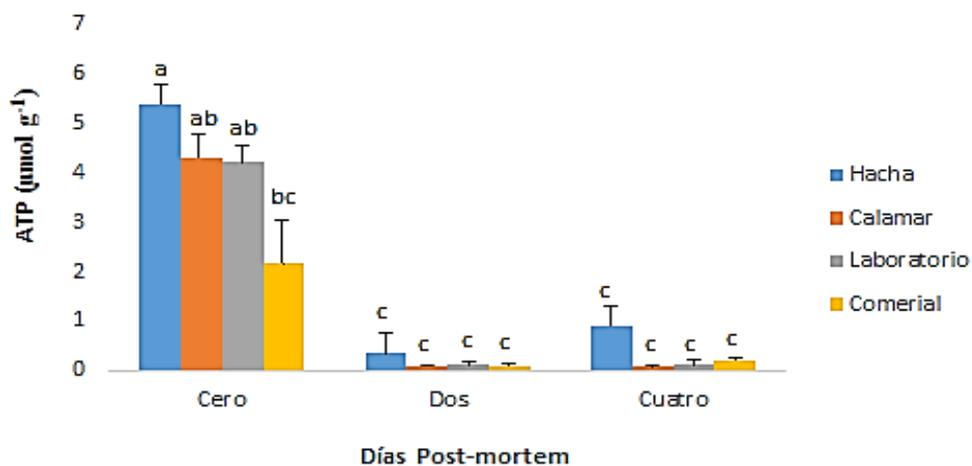


Figura 15. Efecto interactivo de las variables A) alimento-tiempo, B) alimento condición, y C) interacción alimento-tiempo sobre la concentración de ATP en músculo de camarón. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

8.4.2 ADP

Se encontraron diferencia significativa para la concentración de ADP en músculo para las variables tiempo post-mortem, así como para la interacción de los factores tiempo-condición ($P < 0.01$) (Tabla VI). Se encontraron diferencias significativas para el factor tiempo post-mortem en la concentración de ADP en el músculo de camarón, registrando una mayor concentración de ADP para el tiempo cero post-mortem ($2.6 \mu\text{mol g}^{-1}$). Para el día dos del tiempo post-mortem, la concentración de ADP disminuyó alcanzando concentraciones de $0.8 \mu\text{mol g}^{-1}$, las cuales se mantuvieron hasta el día cuatro post-mortem (Figura 16).

La interacción en la condición de tiempo y estrés, se observó un incremento de ADP en organismos estresado ($3.1 \mu\text{mol g}^{-1}$), mientras que en los organismos de la condición control la concentración de ADP fue de $2.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 17).

Tabla VI. Tabla de interacciones en la concentración de ADP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

<i>Factores</i>	<i>Significancia</i>
<i>Alimento</i>	NS
<i>Tiempo post-mortem</i>	**
<i>Estrés</i>	NS
<i>A x T</i>	NS
<i>A x E</i>	NS
<i>T x E</i>	**
<i>A x T x E</i>	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

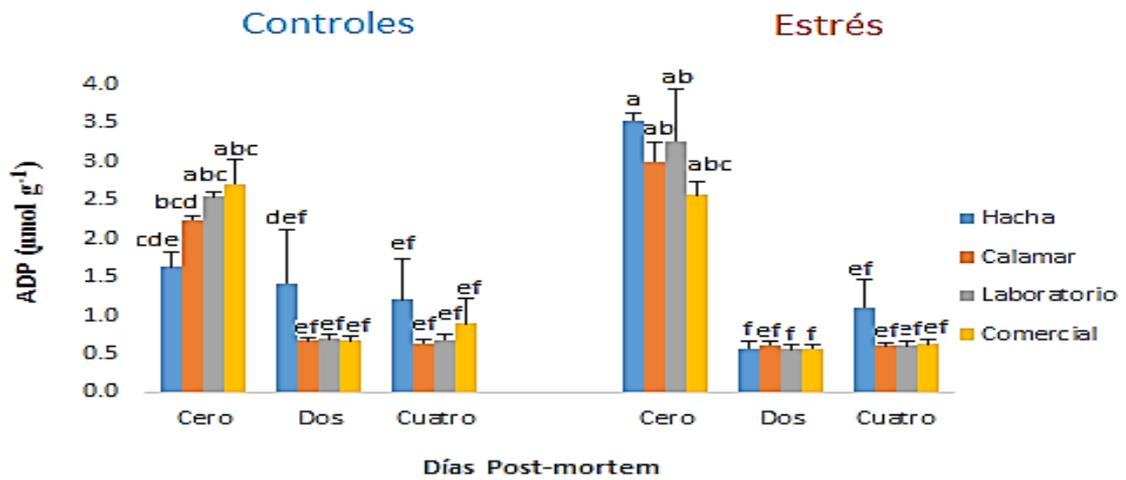
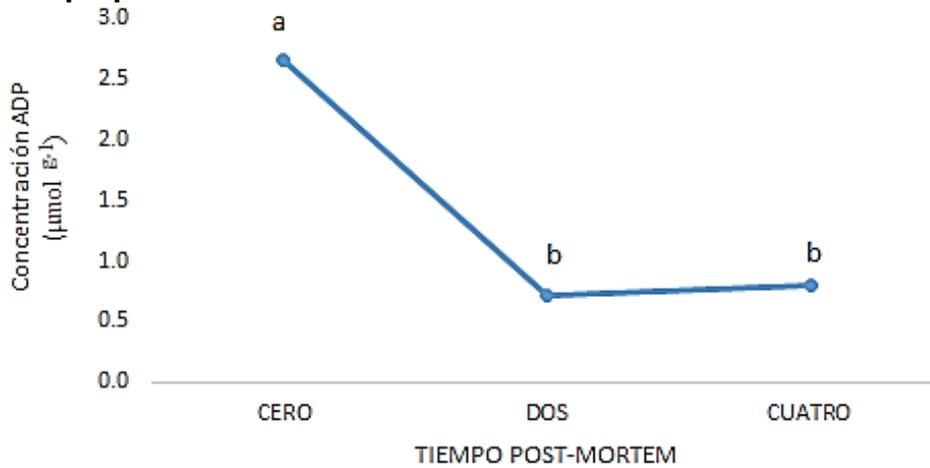


Figura 16. Concentración de ADP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

A) Tiempo post-mortem



B) Interacción tiempo post-mortem – condición de estrés

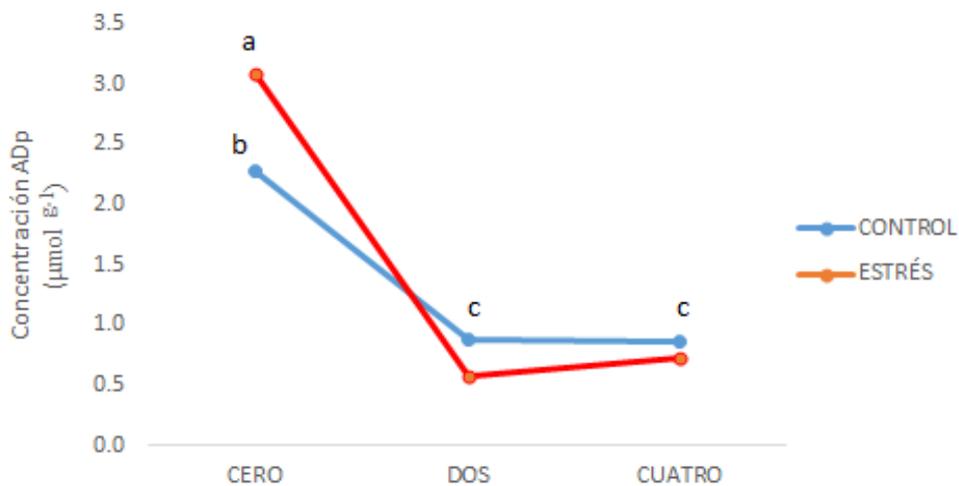


Figura 17. Efecto de las variables: A) tiempo post-mortem B) interacción tiempo post-cosecha-condición sobre la concentración de ADP en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos.

8.4.3 AMP

Se encontraron diferencias significativas para el factor tiempo post-mortem sobre la concentración de AMP en músculo de camarón (Tabla VII), observándose un incremento considerable en la concentración de AMP del tiempo cero al día dos post-mortem, donde se registró la máxima concentración de AMP ($4.5 \mu\text{mol g}^{-1}$), el cual comienza a disminuir con el transcurso del tiempo post-mortem (Figura 18 y 19a).

Por otra parte, el efecto del tipo de alimento consumido en la concentración de AMP en el músculo presentó diferencias significativas ($P < 0.01$), observándose una concentración más baja de AMP en los camarones alimentados con el tratamiento comercial con respecto del resto de los alimentos, los cuales presentaron una concentración de AMP muy similar (Figura 19b)

Para la interacción de los factores tiempo-alimento, se registró un incremento en la concentración de AMP del tiempo cero al día dos post-mortem, acumulándose mayormente en los alimentos elaborados con subproductos de calamar y callo de hacha, mientras que fue menor con el alimento comercial e intermedia con el alimento laboratorio (Figura 19c).

Tabla VII. Tabla de interacciones en la concentración de AMP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	**
Tiempo post-mortem	**
Estrés	NS
A x T	**
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

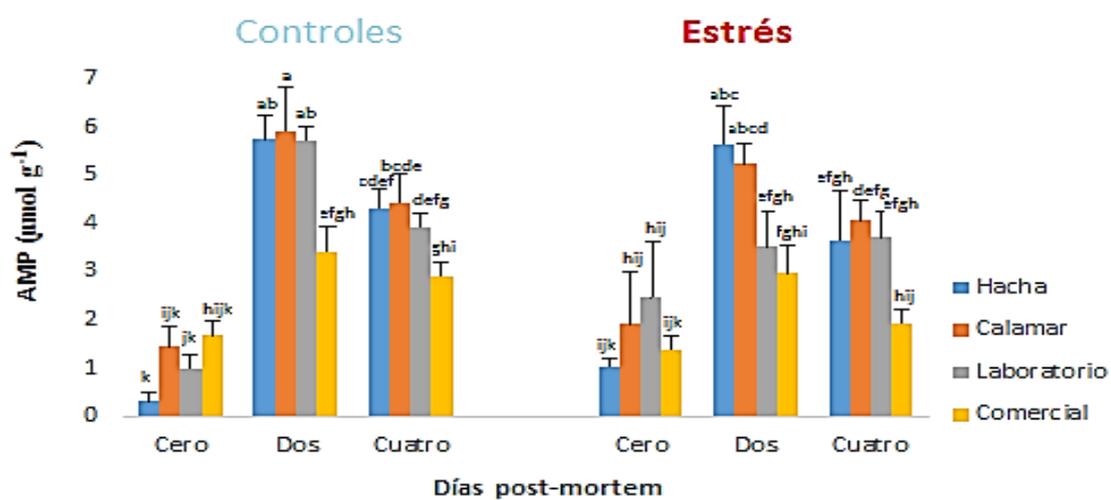
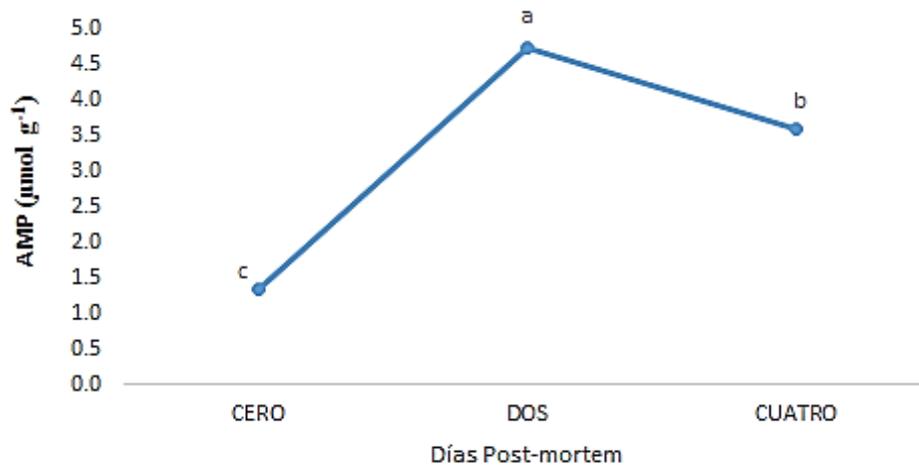
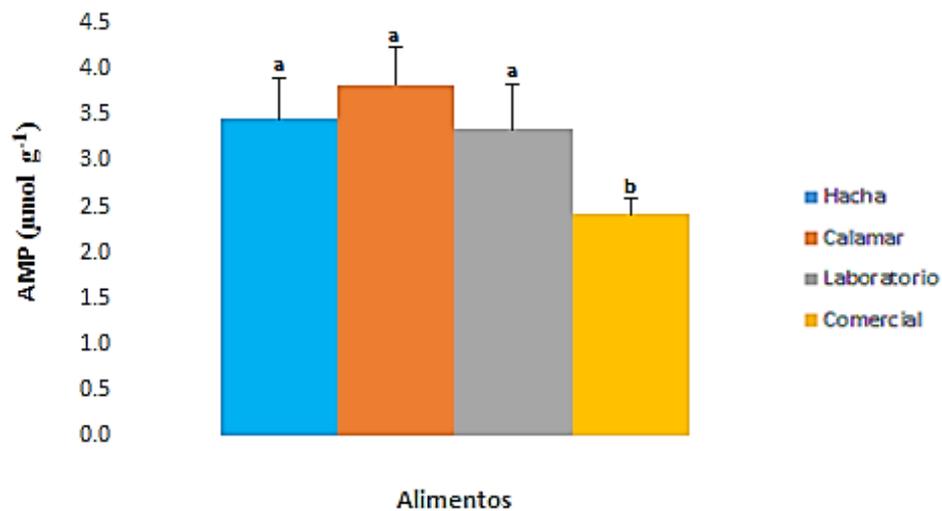


Figura 18. Concentración de AMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

A) Tiempo post-mortem



B) Alimento



C) Interacción tiempo post-mortem - alimento

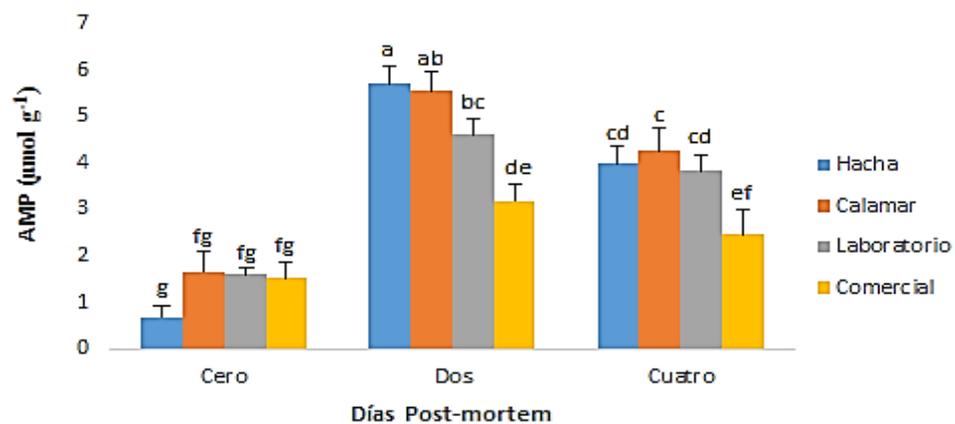


Figura 19. Efecto de los factores A) tiempo post-mortem, B) alimento, y C) interacción tiempo-alimento sobre la concentración de AMP en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos.

8.4.4 IMP

La concentración de IMP en músculo presentó diferencias significativas para los factores: tiempos post-mortem ($P < 0.01$) y tipo de alimento consumido ($P < 0.01$) (Tabla VIII). Se puede observar que las concentraciones de IMP se incrementaron con relación a lo encontrado en el tiempo cero, siendo el tiempo 4 post-mortem donde se obtuvo la mayor concentración de IMP (Figura 20 y 21).

Se encontraron diferencias significativas para la concentración de IMP en el músculo de camarón por efecto del tipo de alimento consumido ($P < 0.01$), registrando una mayor concentración de IMP en organismos del alimento elaborado con vísceras de calamar y el alimento comercial (Figura 21).

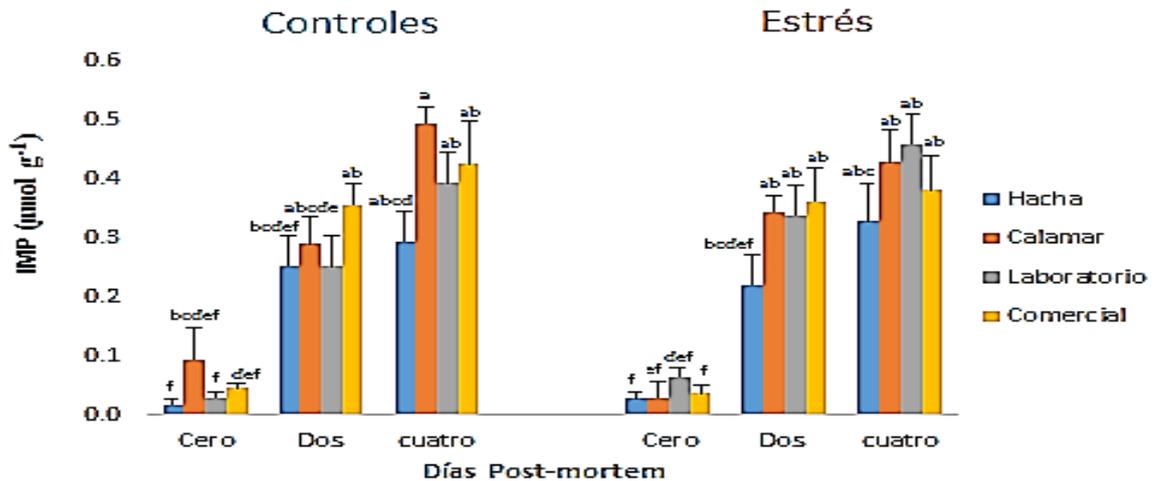


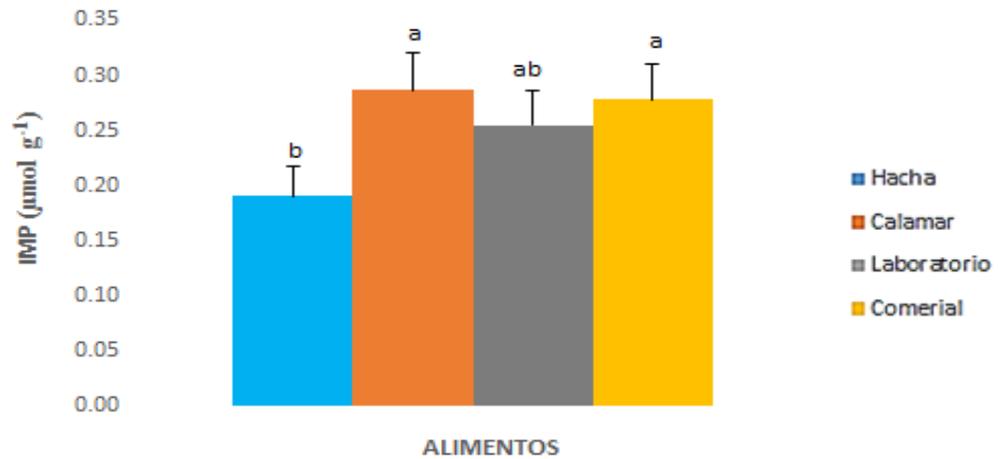
Figura 20. Concentración de IMP ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos.

Tabla VIII. Tabla de interacciones en la concentración de IMP en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	*
Tiempo post-mortem	**
Estrés	NS
A x T	NS
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

A) Alimento



B) Tiempo post-mortem

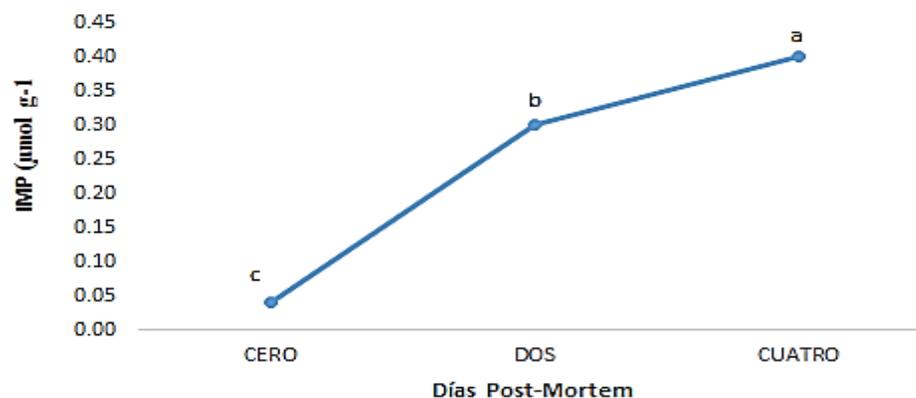


Figura 21. Efecto de los factores: A) Alimento y B) tiempo post-mortem, sobre la concentración de IMP en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos

8.4.5 Hipoxantina

La concentración de hipoxantina en músculo de camarón presentó diferencias significativas únicamente por efecto del tiempo post-mortem ($P < 0.01$) (Tabla IX). La concentración de hipoxantina presentó una relación directa con el tiempo post-mortem, encontrando bajas concentraciones de este metabolito en camarones recién cosechados ($0.05 \mu\text{mol g}^{-1}$), el cual continuó acumulándose en los 4 días posteriores a la cosecha alcanzando concentraciones de $0.92 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figuras 22 y 23).

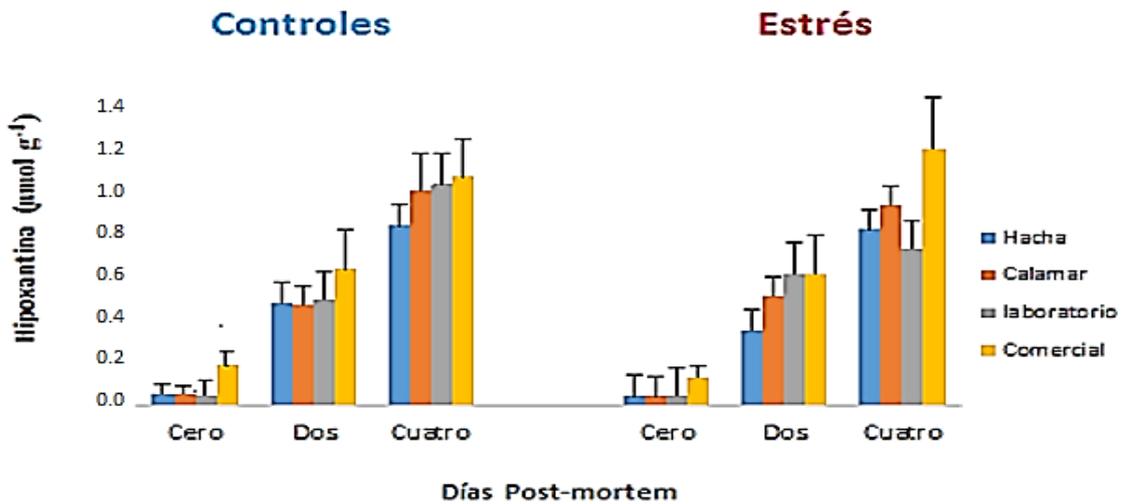


Figura 22. Concentración de hipoxantina ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones, en cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla IX. Tabla de interacciones en la concentración de hipoxantina en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

<i>Factores</i>	<i>significancia</i>
<i>Alimento</i>	NS
<i>Tiempo post-mortem</i>	**
<i>Estrés</i>	NS
<i>A x T</i>	NS
<i>A x E</i>	NS
<i>T x E</i>	NS
<i>A x T x E</i>	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

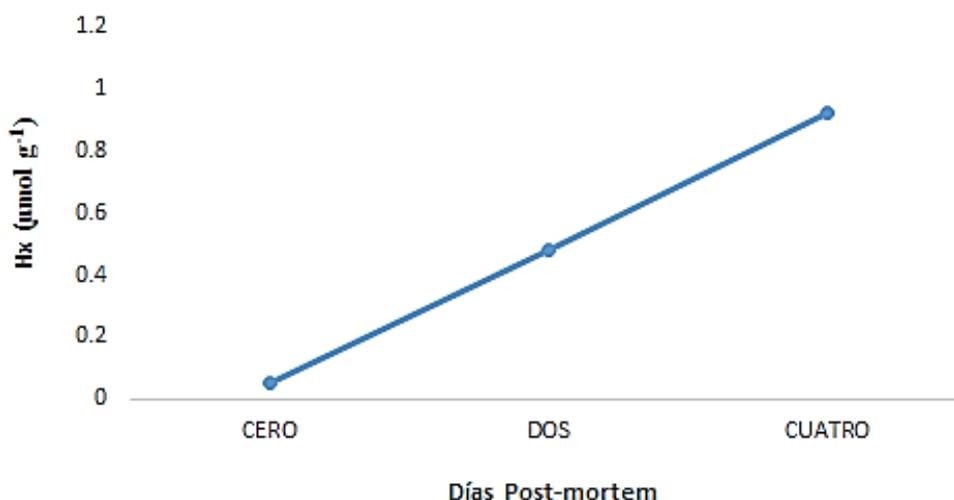


Figura 23. Efecto del factor tiempo post-mortem sobre la concentración de hipoxantina en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos.

8.5.1 Carga Energética Adenilica (CEA)

Se registraron diferencias significativas en los niveles de la carga energética adenilica en músculo de camarón por efecto del tiempo post-mortem ($P < 0.01$); así como por efecto de la condición de estrés ($P < 0.01$) (Tabla X). Los valores de la carga energética se encontraron más altos en los camarones de la condición control en relación al estrés, donde el grupo que fue alimentado con vísceras de callo de hacha, presentaron una mayor carga energética que el resto de los alimentos (Figura 24).

Con respecto al efecto del tiempo post-mortem sobre los niveles de la carga energética en músculo, se observó una diferencia muy marcada en los valores de la CEA entre los diferentes tiempos post-mortem, encontrando valores de 0.65 para los camarones del tiempo cero (recién cosechados), mientras que para los tiempos dos y cuatro post-mortem los valores obtenidos fueron muy bajos, oscilando alrededor de 0.1 (Figura 25). El efecto de la condición de estrés por manipulación en la carga energética en músculo de camarón presentó diferencias significativas, registrando una disminución del 35% de la CEA en organismos sometidos a estrés por manipulación, con respecto del grupo de la condición control (Figura 25).

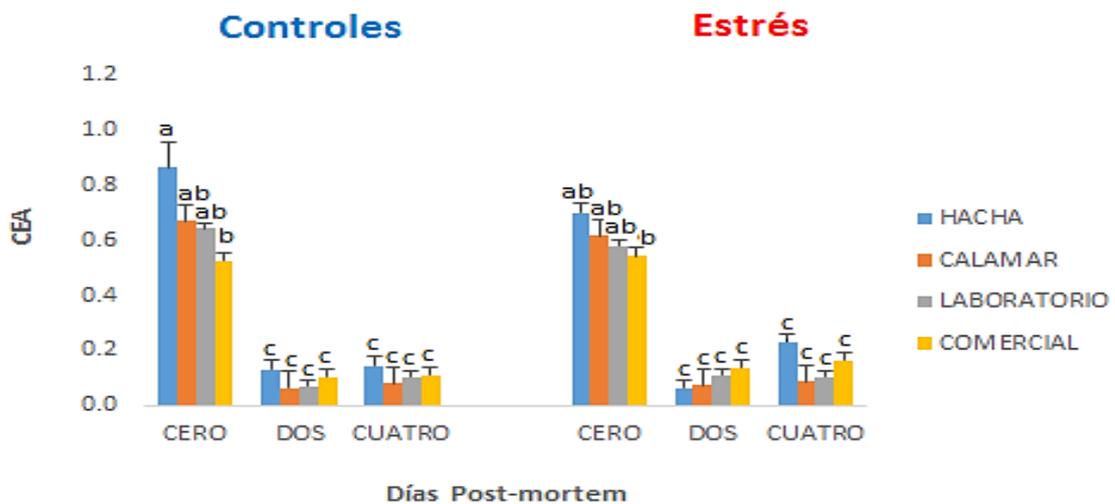


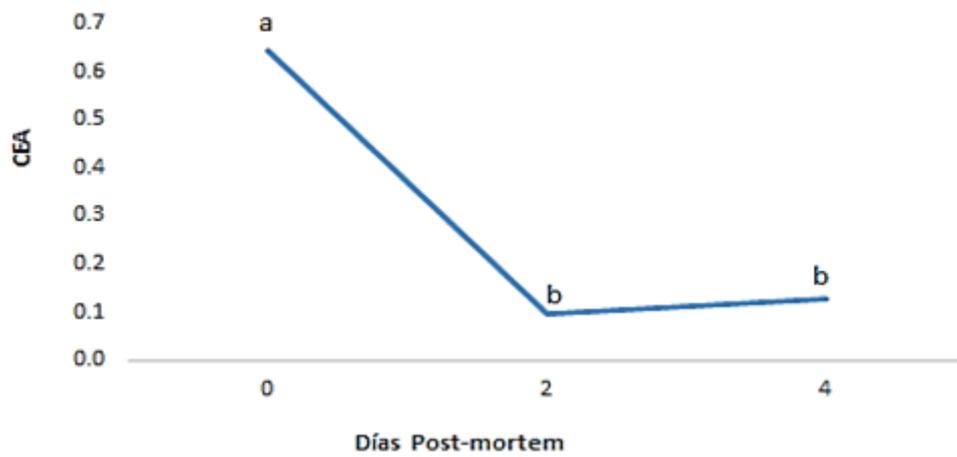
Figura 24. Carga energética adenínica en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla X. Tabla de interacciones en la carga energética adenínica en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	**
Estrés	**
A x T	NS
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

A) Tiempo post-mortem



B) Condición de estrés

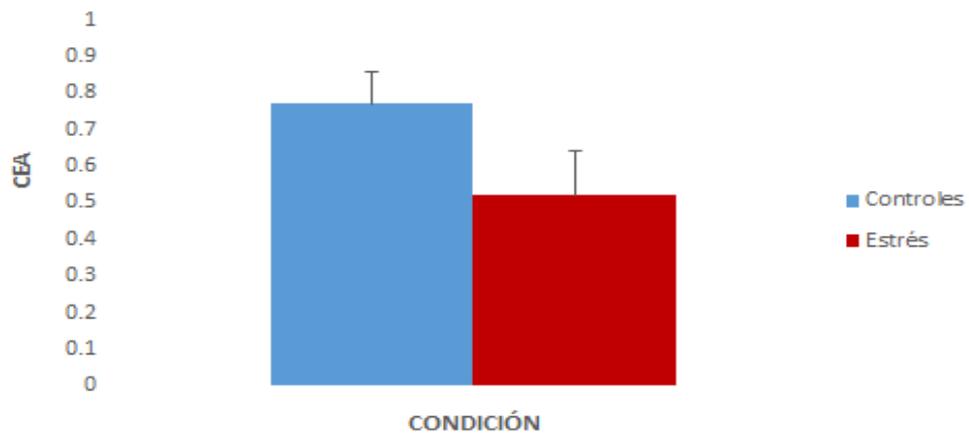


Figura 25. Efecto de las variables: A) tiempo post-mortem y B) condición de estrés, sobre la carga energética adenínica en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

8.5.2 Fosfato de arginina (Arg-P)

Se encontraron diferencia significativa en la concentración de Arg-P en músculo de camarón por efecto del tiempo post-mortem, condición de estrés, así como para la interacción tiempo-condición ($P < 0.01$) (Tabla XI). De manera particular la concentración de Arg-P se acumuló de manera considerable en los organismos alimentados con vísceras de callo de hacha en la condición control, alcanzando concentraciones de $28 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 26).

Se encontró diferencia significativa de la concentración de Arg-P en músculo de camarón por efecto de la condición de estrés, donde en el grupo de organismos que no fueron sometidos a una condición de estrés (controles) presentaron una concentración de Arg-P elevada, alcanzando concentraciones de $10 \mu\text{mol g}^{-1}$, mientras que los camarones del grupo estrés no superaron los $2 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 27a).

Se registraron diferencias significativas por el factor tiempo post-mortem en la concentración de Arg-P en músculo de camarón, se registró la máxima concentración de este fosfágeno en el tiempo cero post-mortem, es decir en organismos recién cosechados con concentraciones de $7 \mu\text{mol g}^{-1}$, la cual disminuyó considerablemente con el transcurso del tiempo post-mortem (Figura 27b). Con respecto a la interacción de los factores tiempo post-mortem y condición de estrés, se observó en los camarones de la condición control una mayor concentración de Arg-P en músculo de camarones recién cosechados (día cero post-mortem), seguido de una caída en la concentración de Arg-P en los días posteriores a la cosecha. Por otra parte los camarones de la condición estrés presentaron una baja concentración de Arg-P desde el día cero y se mantuvo de igual forma a los días posteriores a la cosecha (Figura 27c).

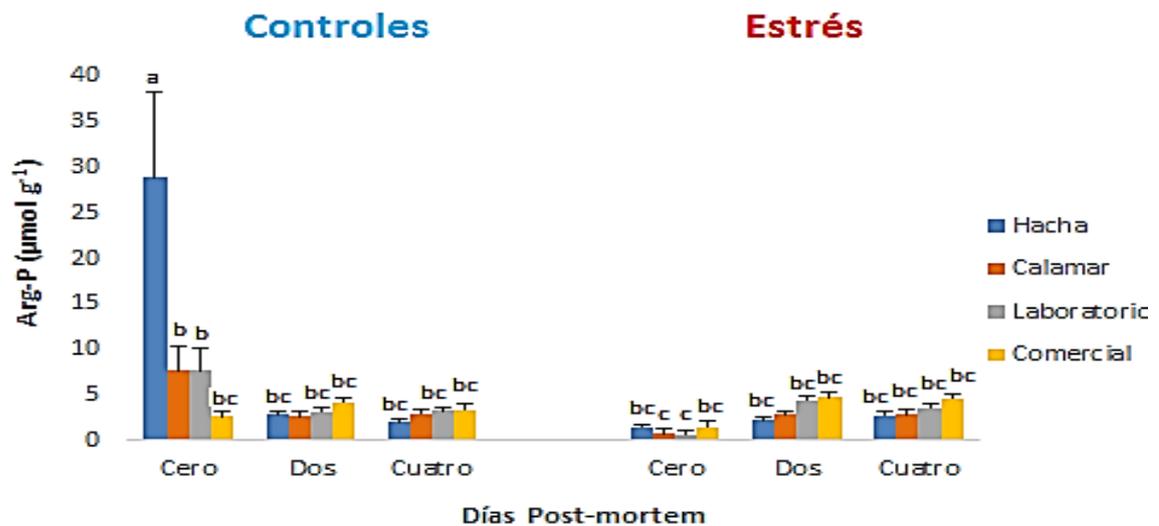


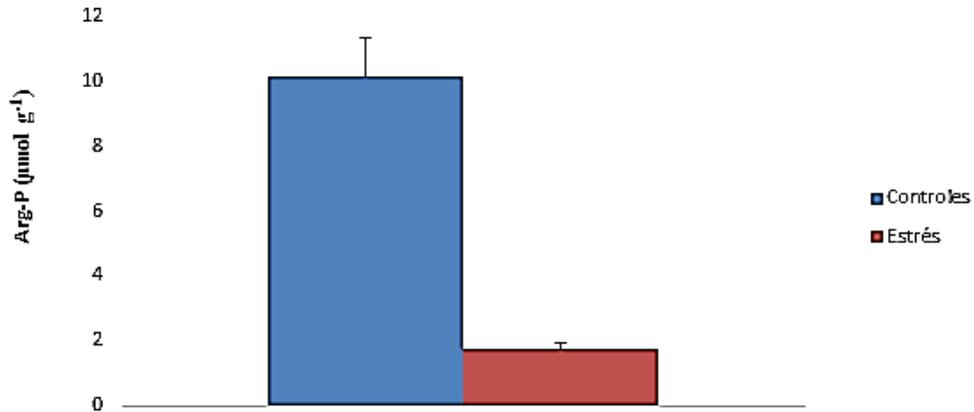
Figura 26. Concentración de Arg-P ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla XI. Tabla de interacciones en la concentración de Arg-P en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

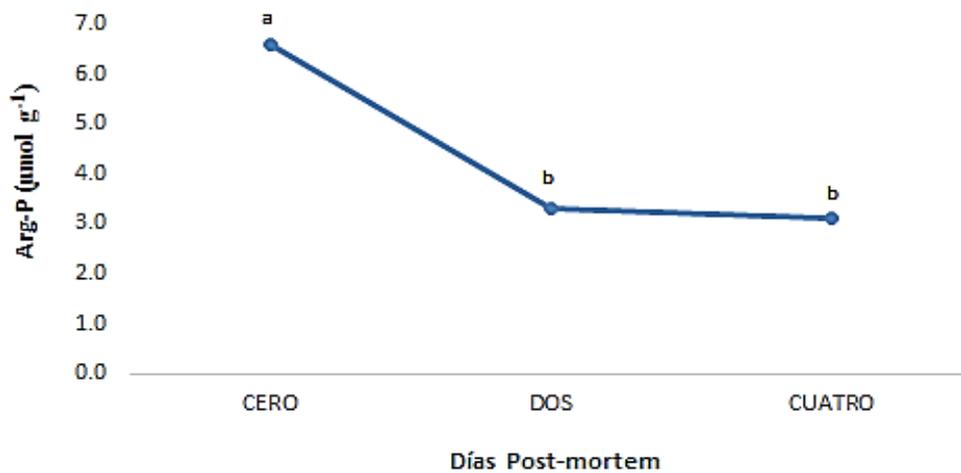
Factores	Significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	**
Estrés	**
A x T	NS
A x E	NS
T x E	**
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

A) Condición de estrés



B) Tiempo post-mortem



C) Interacción tiempo post-mortem – condición de estrés

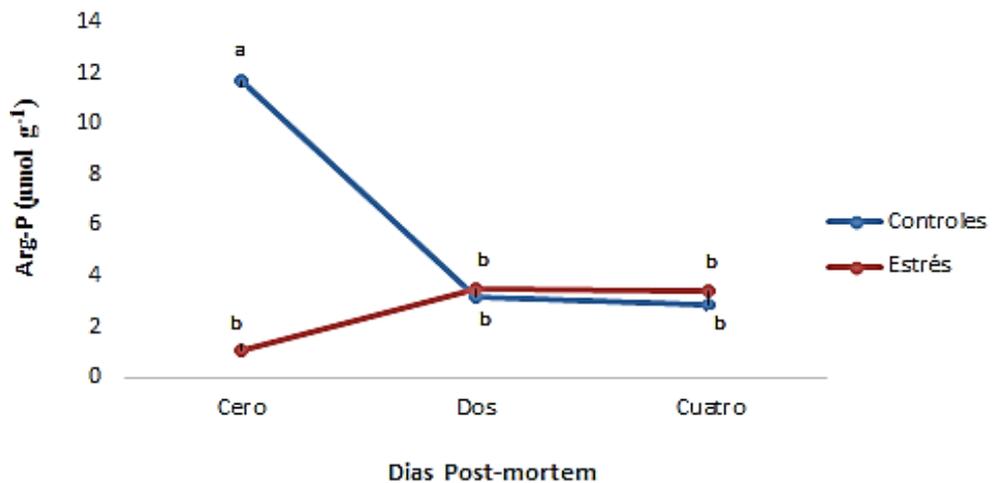


Figura 27. Efecto de las variables: A) condición, B) tiempo post-cosecha, y C) interacción tiempo-condición, sobre la concentración de Arg-P en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

8.6 Reservas, combustibles y metabolitos.

8.6.1 Glucosa

La glucosa en el músculo de camarón presentó diferencias significativas únicamente por efecto del factor tiempo post-mortem ($P < 0.01$) (Tabla XII). La concentración de glucosa en músculo mostró un incremento con el aumento del tiempo post-mortem, registrándose una concentración inicial al tiempo cero de 5 mg/g, la cual continuó acumulándose hasta los 7.5 mg g⁻¹ para el tiempo cuatro post-mortem (7.5 mg g⁻¹) (Figura 28 y 29).

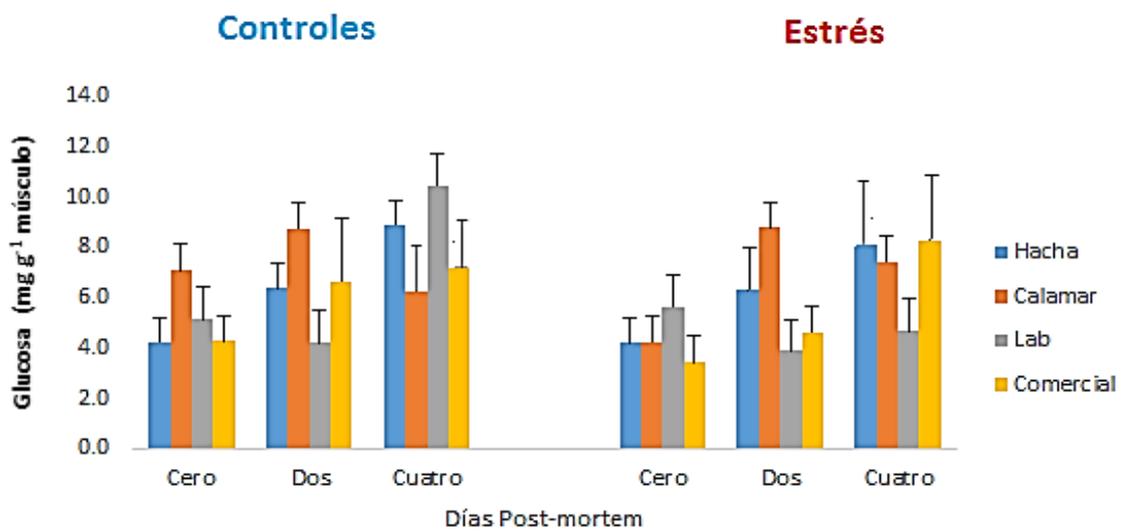


Figura 28. Concentración de glucosa en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla XII. Tabla de interacciones en la concentración de glucosa en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	**
Estrés	NS
A x T	NS
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

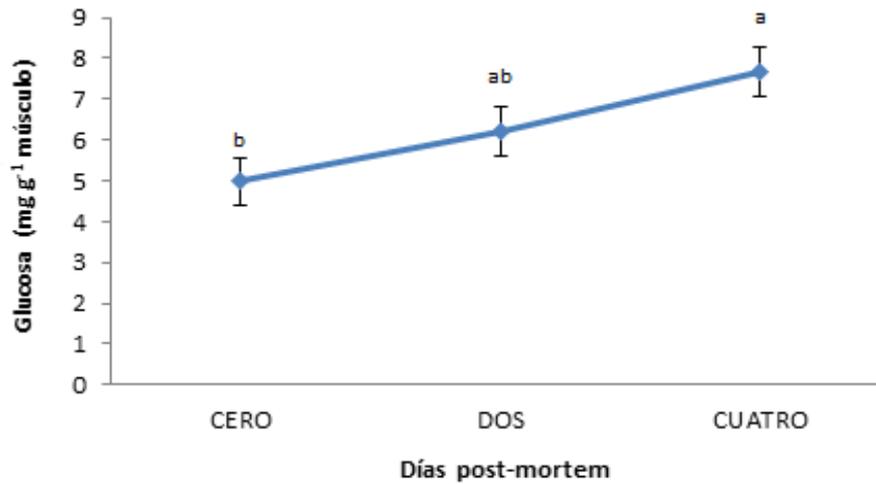


Figura 29. Efecto del tiempo post-mortem sobre la concentración de glucosa. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

8.6.2 Lactato

El lactato en músculo de camarón no mostraron diferencias significativas por el efecto independiente de las variables analizadas en el presente estudio (alimento, condición de estrés y tiempo post-mortem) (Tabla XIII), sin embargo se encontraron diferencias significativas mediante la interacción de los factores alimento y condición de estrés ($P < 0.05$), alimento y tiempo post-cosecha ($P < 0.01$), así como para la interacción del tiempo post-cosecha y la condición de estrés ($P < 0.01$) (Figura 30).

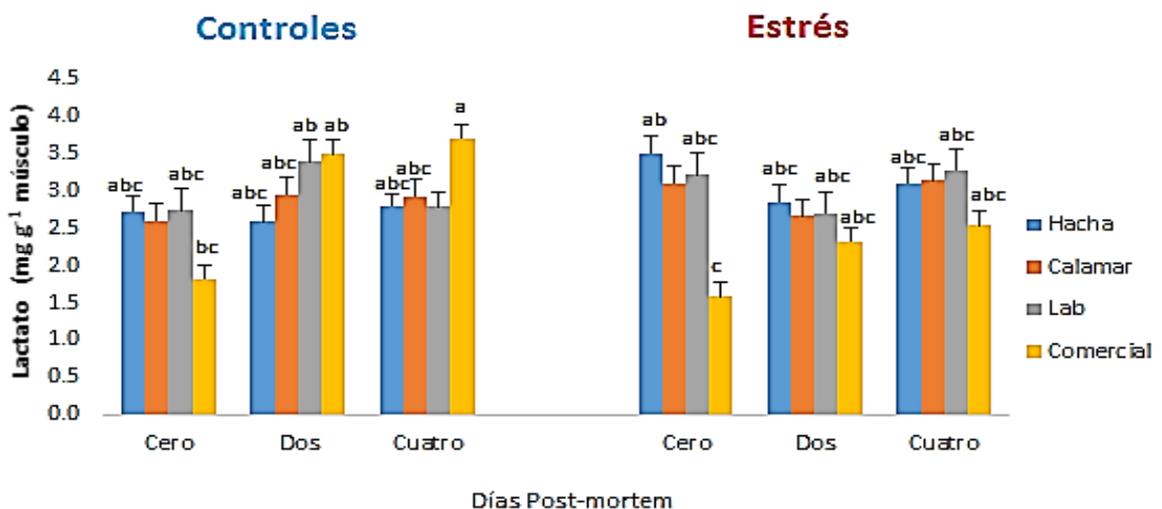


Figura 30. Concentración de lactato en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla XIII. Tabla de interacciones en la concentración de lactato en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

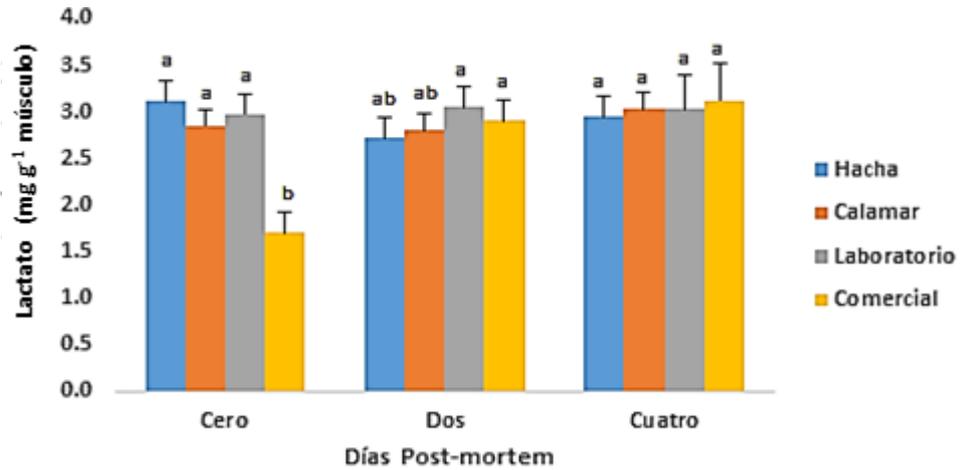
Factores	significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	NS
Estrés	NS
A x T	*
A x E	**
T x E	*
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

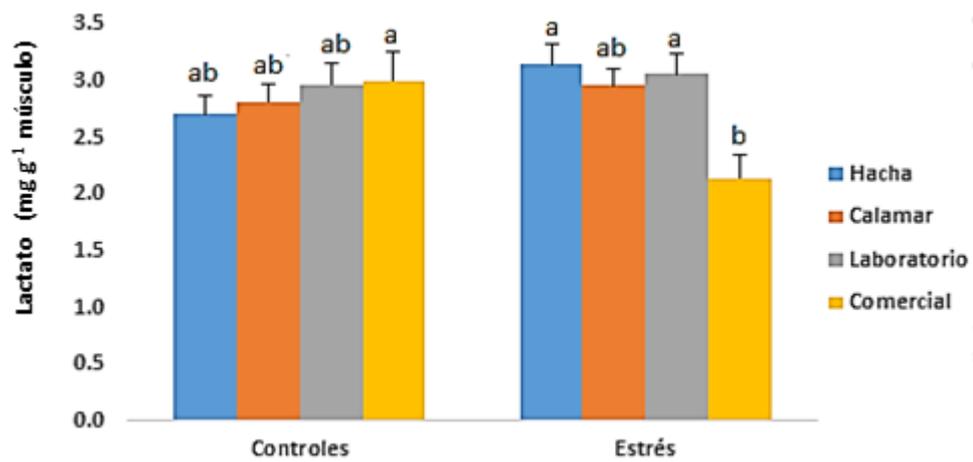
En cuanto al efecto interactivo del alimento y el tiempo post-mortem, se registró una baja concentración de lactato en el tiempo cero en los camarones alimentados con el tratamiento comercial (1.69 mg g^{-1}), mientras que para el resto de los alimentos la concentración obtenida de lactato fue muy similar cercano a los 3 mg g^{-1} (Figura 31a).

Con respecto a la interacción al alimento y la condición de estrés en la concentración de lactato en músculo de camarón, se presentó una menor concentración de este metabolito en el grupo de camarones del tratamiento comercial sometidos a una condición de estrés (2.14 mg g^{-1}) (Figura 31b). La interacción de los factores tiempo post-mortem y condición presentó diferencias significativas, donde se observó un incremento en la concentración de lactato en músculo con el paso del tiempo post-mortem, la cual fue más evidente para los organismos de la condición control. En ambos casos la mayor acumulación de lactato en músculo se presenta al día cuatro post-mortem (3.1 mg g^{-1}) (Figura 31c).

A) Interacción tiempo post-mortem- alimento



B) Interacción condición de estrés- alimento



C) Interacción condición de estrés-tiempo post-mortem

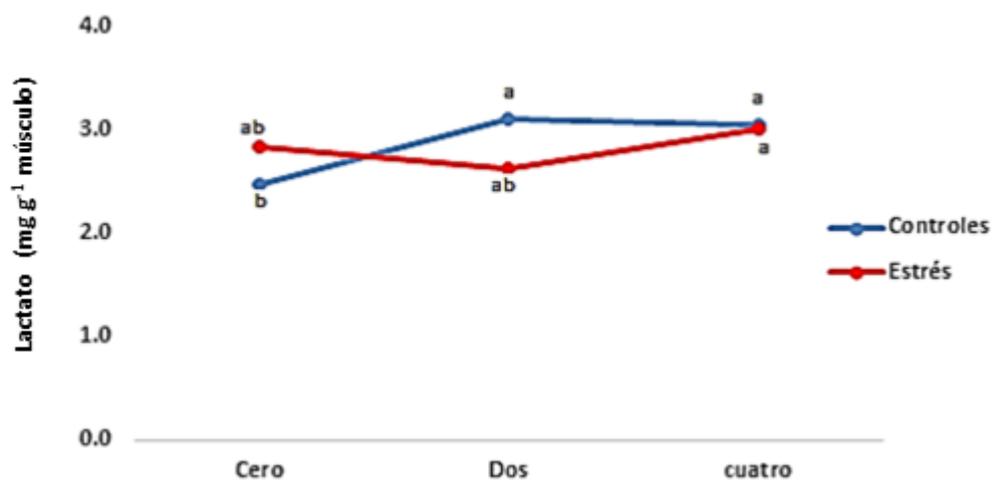


Figura 31. Efecto interactivo de las variables A) alimento-tiempo, B) alimento condición, y C) tiempo-condición sobre la concentración de lactato en músculo de camarón. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

8.6.3 Glucógeno

El glucógeno en músculo de camarón no mostró diferencias significativas por el efecto independiente de las variables analizadas en el presente estudio (alimento, condición de estrés y tiempo post-mortem) (Tabla XIV), así como para el efecto por la interacción entre factores. De manera general, pese a no encontrarse diferencias significativas, se encontró una mayor concentración de glucógeno en los organismos sometidos a una condición de estrés (Figura 32).

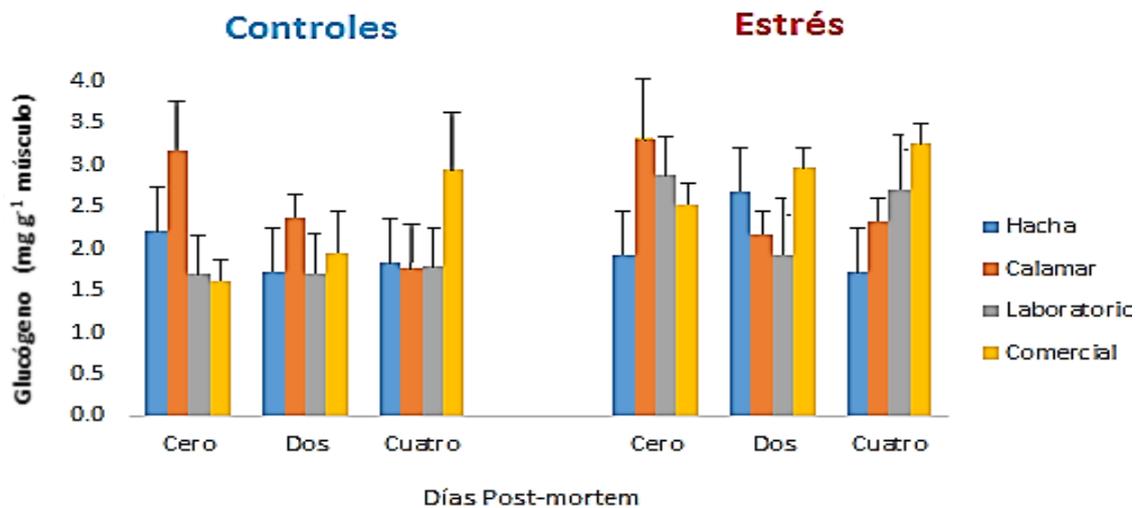


Figura 32. Concentración de glucógeno en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla XIV. Tabla de interacciones en la concentración de glucógeno en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	NS
Estrés	NS
A x T	NS
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A=Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS=no significativo.

8.6.4 Proteínas totales

Se registraron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en músculo de camarón únicamente por efecto del factor condición de estrés ($P < 0.01$) (Tabla XV). La concentración de proteínas totales en músculo de camarón fue superior 180 mg g^{-1} , en los organismos que no fueron sometidos a una condición de estrés por manipulación (condición control) con respecto de los camarones estresados (135 mg g^{-1}) (Figura 33 y 34).

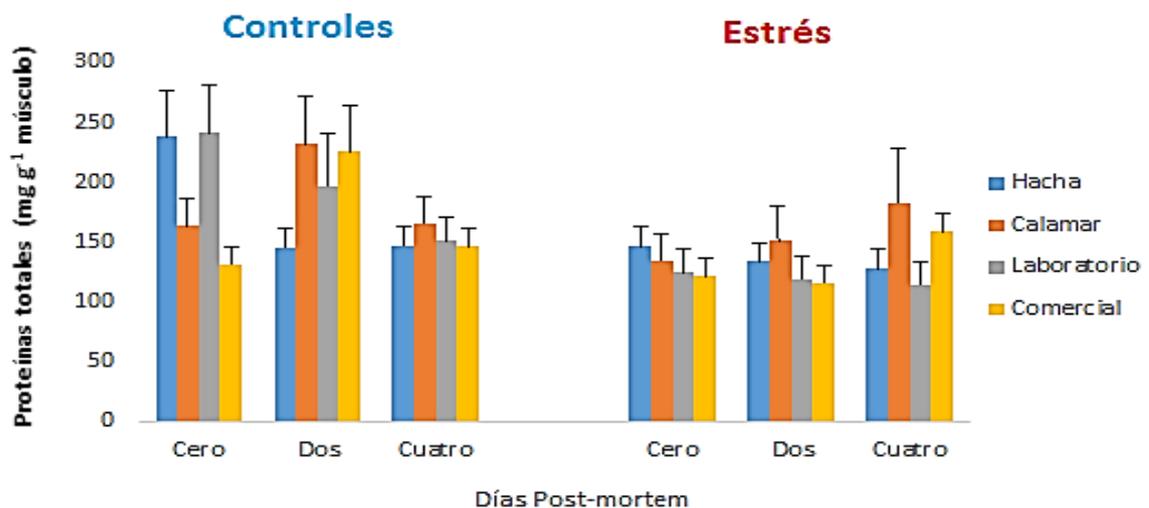


Figura 33. Concentración de proteínas totales en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla XV. Tabla de interacciones en la concentración de proteínas totales en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

Factores	Significancia
Alimento	NS
Tiempo post-mortem	NS
Estrés	**
A x T	NS
A x E	NS
T x E	NS
A x T x E	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

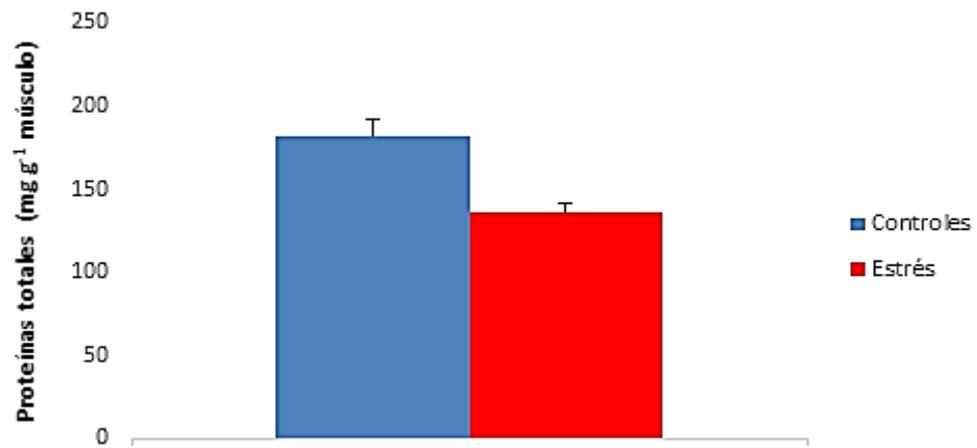


Figura 34. Efecto de la condición sobre la concentración de proteínas totales en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

8.7 Análisis de lípidos

8.7.1 Lípidos totales en músculo de camarón

Se observaron diferencias significativa en la concentración de lípidos totales en el músculo de camarón, únicamente para el factor condición de estrés ($P < 0.05$) (Tabla XVI).

Tabla XVI. Tabla de interacciones en la concentración de lípidos totales en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

<i>Factores</i>	<i>significancia</i>
<i>Alimento</i>	NS
<i>Tiempo post-mortem</i>	NS
<i>Estrés</i>	*
<i>A x T</i>	NS
<i>A x E</i>	NS
<i>T x E</i>	NS
<i>A x T x E</i>	NS

A=Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS=no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencia altamente significativa ($P < 0.01$).

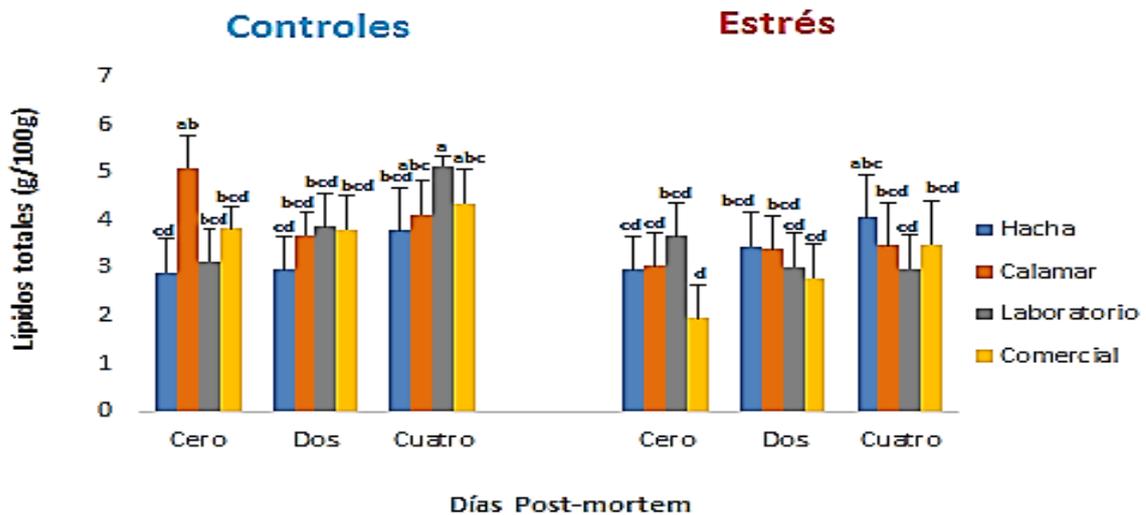


Figura 35. Concentración de lípidos totales (g/100g) en músculo de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro alimentos. Letras diferentes indican diferencia significativa en los tratamientos.

Se registraron diferencias significativas para el factor condición en la concentración de lípidos totales en músculo de camarón, encontrando que los organismos que no fueron sometidos a una condición de estrés (controles) presentaron una mayor concentración de lípidos totales en músculo (3.8 g/100g), con respecto a los organismos del grupo estrés (3.0 g/100g) (figura 36).

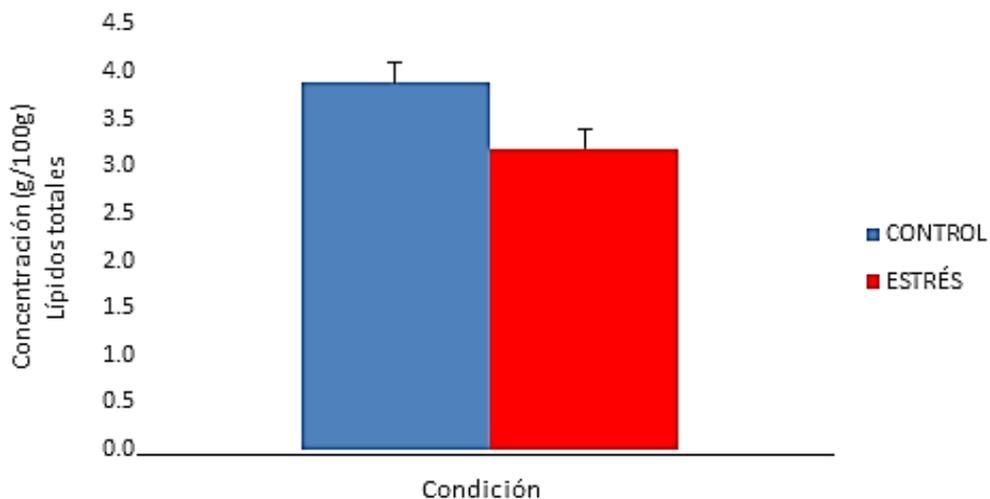


Figura 36. Efecto de la condición sobre la concentración de lípidos totales en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

8.7.2 Lípidos totales en hepatopáncreas de camarón

Los lípidos totales en hepatopáncreas de camarón, no tuvieron diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados, así como para las interacciones entre los factores. Los camarones que consumieron alimento comercial presentaron las mayores concentraciones de lípidos totales para todos los tiempos en la condición control en hepatopáncreas. Aunque no fue significativa para todos los factores, la misma tendencia se observó en los organismos de la condición estrés (Figura 37).

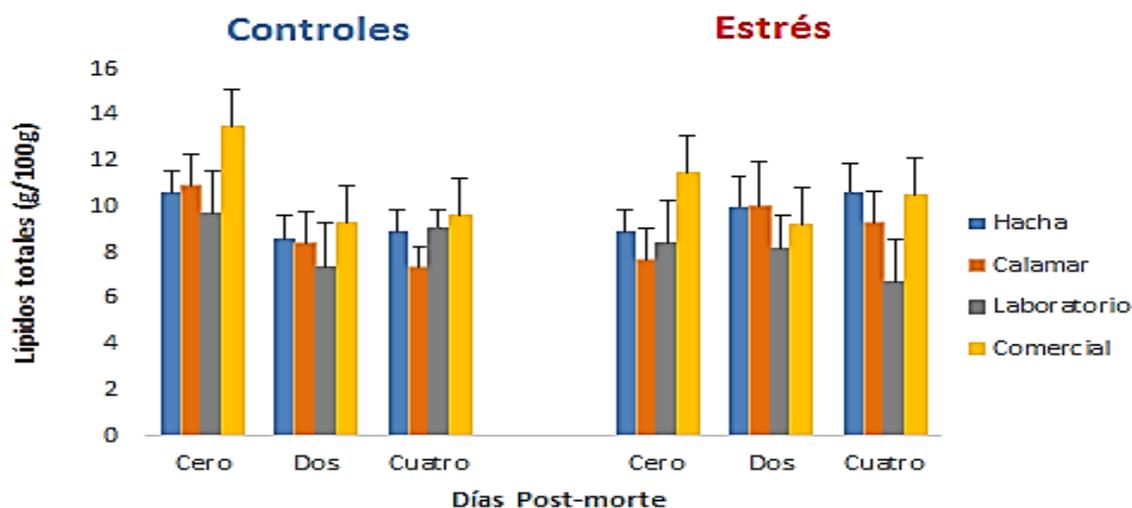


Figura 37. Concentración de lípidos totales (g/100g) en hepatopáncreas de camarón en diferentes tiempos post-mortem, en dos condiciones (estrés y control) con cuatro diferentes alimentos.

8.8 Ácidos grasos

8.8.1 Ácidos grasos en músculo de camarón

Se observaron diferencias significativas en los porcentajes de los ácidos grasos en el músculo de camarón por efecto del tipo de alimento consumido para todos los ácidos grasos evaluados ($P < 0.05$). De manera general se registró un mayor porcentaje de ácidos grasos involucrados en la respuesta de estrés, principalmente de la serie n-3, ARA, EPA, DHA, además de la sumatoria de todos los ácidos altamente insaturados (Σ HUFA) en los alimentos elaborados con subproductos de calamar y callo de hacha. Por otra parte, el alimento comercial y laboratorio, registraron un mayor porcentaje de la sumatoria de ácidos grasos saturados, así como de ácidos grasos de la serie n-6 (Tabla XVII).

No se registraron diferencias significativas por efecto de los factores individuales de condición de estrés o tiempo post-mortem en el porcentaje de ácidos grasos en el músculo de camarón. Se encontraron diferencias significativas para el efecto combinado de los factores tiempo post-mortem y condición de estrés en la relación de ácidos grasos DHA/EPA en músculo de camarón ($P < 0.05$), encontrando un mayor porcentaje de la relación de estos ácidos grasos para los camarones alimentados con subproductos de calamar. Los camarones de la condición de estrés presentaron una menor proporción de estos ácidos grasos conforme transcurre el tiempo post-mortem; mientras que en los organismos de

la condición control, se apreció un efecto contrario, con un ligero incremento en la proporción de DHA/EPA hacia el tiempo cuatro post-mortem.

Se encontraron diferencias significativas para la interacción de los factores tiempo post-mortem, condición de estrés y alimento, para el porcentaje de los ácidos grasos de la serie n-6 así como la sumatoria de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ($P < 0.05$) (Tabla XVII).

8.8.2 Ácidos grasos en hepatopáncreas de camarón

Se observaron diferencias significativas en los porcentajes de ácidos grasos en hepatopáncreas de camarones de los cuatro grupos de alimentos probados ($P < 0.01$), a excepción de la relación DHA/EPA. Se observó un mayor porcentaje de ácidos grasos en hepatopáncreas de camarones alimentados con subproductos de calamar, especialmente en los ácidos grasos involucrados en la respuesta de estrés (ARA, EPA, DHA).

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de ácidos grasos en hepatopáncreas de camarón por efecto de la condición de estrés, así como para los diferentes tiempos post-mortem (0.2 y 4 días post-cosecha) (Tabla XVIII). Se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de ácidos grasos de la serie n-6 en hepatopáncreas de camarón únicamente para la interacción de los factores tiempo post-mortem y alimento ($P < 0.05$). La concentración de ácidos grasos n-6 se mostró muy similar entre los diferentes tiempos post-mortem, sin embargo, los camarones alimentados con subproductos de callo de hacha registraron una mayor acumulación de ácidos grasos de la serie n-6 en hepatopáncreas.

Tabla XVII. Ácidos grasos (% en relación al total de ácidos grasos) en el músculo de camarón

	Hacha	Calamar	Laboratorio	Comercial	T	A	E	T*A	T*E	E*A	T*E*A
Σ SAT	36.3 ± 0.3 ^{ab}	37.5 ± 0.3 ^a	36.2 ± 0.5 ^b	36.8 ± 0.6 ^{ab}	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
Σ MUFA	16.9 ± 0.2 ^c	18.1 ± 0.35 ^c	23.4 ± 0.4 ^a	22.3 ± 0.4 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
Σ PUFA	24.3 ± 0.5 ^a	16.65 ± 0.7 ^b	26.9 ± 1.2 ^a	19.4 ± 1.4 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	P<0.05
Σ HUFA	22.2 ± 0.4 ^b	27.5 ± 0.7 ^a	13.3 ± 1.4 ^c	21.3 ± 1.6 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
20: 4n-6	3.3 ± 0.05 ^a	3.3 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.18 ^c	2.3 ± 0.17 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
20: 5n-3	9.1 ± 0.2 ^b	10.9 ± 0.3 ^a	5.7 ± 0.6 ^c	8.9 ± 0.6 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
22: 6n-3	9.7 ± 0.2 ^b	13.3 ± 0.3 ^a	5.9 ± 0.7 ^c	10.0 ± 0.7 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
Σ n-6	26.2 ± 0.4 ^a	18.9 ± 0.7 ^b	26.7 ± 1.4 ^a	20.6 ± 1.3 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	P<0.05
Σ n-3	20.4 ± 0.4 ^b	25.0 ± 0.6 ^a	13.5 ± 1.3 ^c	20.1 ± 1.31 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
n-3/n-6	0.8 ± 0.03 ^c	1.45 ± 0.1 ^a	0.55 ± 0.09 ^c	1.1 ± 0.08 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS	NS
22: 6/ 20: 5	1.1 ± 0.01 ^b	1.2 ± 0.01 ^a	1.0 ± 0.03 ^c	1.1 ± 0.03 ^b	NS	P<0.05	NS	NS	P<0.05	NS	NS

Σ SAT = suma de ácidos grasos saturados, Σ MUFA = suma de ácidos grasos monoinsaturados, Σ PUFA = suma de ácidos grasos poliinsaturados, Σ HUFA = suma de ácidos grasos altamente insaturados, Σ n-6 = suma de ácidos grasos omega 6, Σ n-3 = suma de ácidos grasos omega 3, n-3/n-6 = relación de ácidos grasos omega 3 y omega 6, 22:6/20:5 = relación de ácido docosahexaenóico y ácido eicosapentaenoico. (E) condición, (T) tiempo post-mortem, (A) Alimento, Se aplicó un ANOVA trifactorial donde P<0.05 indica diferencias significativas, P<0.01 indica diferencias altamente significativas y NS= sin diferencias significativas. Los datos se presentan en base húmeda como medias globales ± error estándar.

Tabla XVIII. Ácidos grasos (% en relación al total de ácidos grasos) en hepatopáncreas de camarón

	Hacha	Calamar	Laboratorio	Comercial	T	A	E	T*A	T*E	C*E	T*E*A
Σ SAT	31.8 \pm 0.2 ^b	31.4 \pm 0.4 ^b	36.1 \pm 0.5 ^a	31.6 \pm 0.4 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
Σ MUFA	25.2 \pm 0.4 ^c	27.6 \pm 0.4 ^b	30.7 \pm 0.7 ^a	30.8 \pm 0.5 ^a	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
Σ PUFA	32.1 \pm 0.6 ^a	22.8 \pm 0.4 ^c	25.4 \pm 0.4 ^b	25.0 \pm 0.5 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
Σ HUFA	10.6 \pm 0.6 ^b	17.5 \pm 0.6 ^a	7.4 \pm 0.9 ^c	12.3 \pm 0.7 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
20: 4n-6	1.86 \pm 0.1 ^b	2.51 \pm 0.2 ^a	1.26 \pm 0.2 ^c	1.34 \pm 0.1 ^{bc}	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
20: 5n-3	3.68 \pm 0.2 ^b	6.28 \pm 0.3 ^a	3.18 \pm 0.4 ^b	4.0 \pm 0.4 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
22: 6n-3	5.05 \pm 0.2 ^c	8.74 \pm 0.1 ^a	2.91 \pm 0.3 ^d	6.93 \pm 0.3 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
Σ n-6	31.8 \pm 0.5 ^a	23.6 \pm 0.3 ^c	25.2 \pm 0.3 ^b	24.8 \pm 0.4 ^{bc}	NS	P<0.01	NS	P<0.05	NS	NS	NS
Σ n-3	10.9 \pm 0.4 ^b	16.7 \pm 0.4 ^a	7.65 \pm 0.7 ^c	12.4 \pm 0.6 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
n-3/n-6	0.34 \pm 0.01 ^c	0.71 \pm 0.02 ^a	0.31 \pm 0.03 ^c	0.50 \pm 0.02 ^b	NS	P<0.01	NS	NS	NS	NS	NS
22: 6/ 20: 5	1.37 \pm 0.04 ^b	1.46 \pm 0.05 ^a	0.96 \pm 0.07 ^c	1.95 \pm 0.1 ^b	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Σ SAT = suma de ácidos grasos saturados, Σ MUFA = suma de ácidos grasos monoinsaturados, Σ PUFA = suma de ácidos grasos poliinsaturados, Σ HUFA = suma de ácidos grasos altamente insaturados, Σ n-6 = suma de ácidos grasos omega 6, Σ n-3 = suma de ácidos grasos omega 3, n-3/n-6 = relación de ácidos grasos omega 3 y omega 6, 22:6/20:5 = relación de ácido docosahexaenóico y ácido eicosapentaenoico. (E) condición, (T) tiempo post-mortem, (A) Alimento, Se aplicó un ANOVA trifactorial donde P<0.05 indica diferencias significativas, P<0.01 indica diferencias altamente significativas y NS= sin diferencias significativas. Los datos se presentan en base húmeda como medias globales \pm error estándar.

8.9 Pigmentos

8.9.1 Pigmentos carotenoides en músculo

La concentración de pigmentos carotenoides en el músculo de camarón presentó diferencias significativas para el efecto de los factores tiempo post-mortem ($P < 0.05$) y condición de estrés ($P < 0.01$) (Tabla XIX). Se observaron diferencias para la concentración de pigmentos en músculo de camarón por efecto del tipo de alimento, encontrando las mayores concentraciones de pigmentos carotenoides en los camarones alimentados con los tratamientos comercial y laboratorio (Figura 38).

En el factor tiempo post-mortem se observó un incremento en la concentración de pigmentos carotenoides en el músculo con el paso del tiempo, partiendo de concentraciones de 2 mg/100g al tiempo cero y alcanzando los mayores valores de pigmentos en el día cuatro post-mortem 4.5 mg/100g (Figura 39b). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas por efecto del factor condición de estrés, con una mayor concentración de pigmentos en los organismos que fueron estresados con respecto de los organismos de la condición control (Figura 39a).

Tabla XIX. Tabla de interacciones en la concentración de pigmentos en músculo de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

<i>Factores</i>	<i>significancia</i>
<i>Alimento</i>	NS
<i>Tiempo post-mortem</i>	**
<i>Estrés</i>	*
<i>A x T</i>	NS
<i>A x E</i>	NS
<i>T x E</i>	NS
<i>A x T x E</i>	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. * indica diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

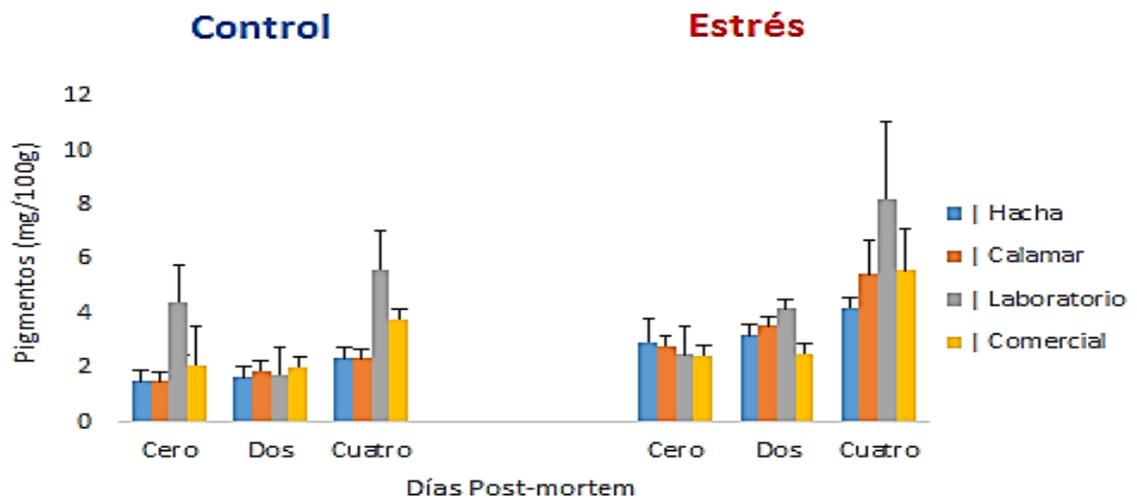


Figura 38. Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en músculo de camarón. Letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos.

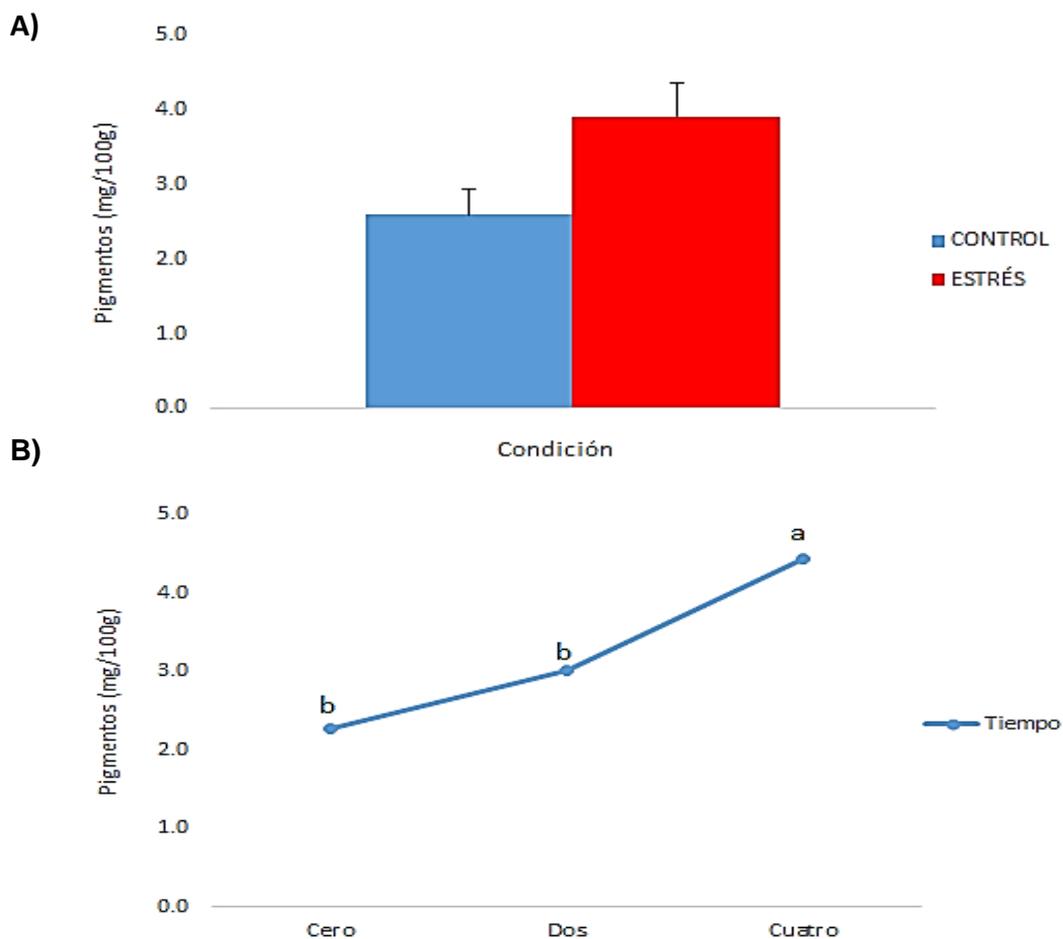


Figura 39. Efecto de las variables: A) condición y B) tiempo post-cosecha, sobre la concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en el músculo de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

8.9.2 Pigmentos carotenoides en hepatopáncreas en camarón.

La concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas de camarón, registró diferencias significativas únicamente por efecto del factor condición de estrés ($P < 0.01$) (Tabla XX). La mayor concentración de pigmentos carotenoides, tuvo lugar en organismos que fueron alimentados con subproductos de calamar, especialmente en camarones de la condición control (Figura 40).

El efecto de la condición de estrés por manipulación tuvo un efecto significativo en la concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas. Los camarones que fueron sometidos a una condición de estrés presentaron una baja concentración de pigmentos carotenoides (20 mg/100g), mientras que los camarones que no fueron estresados presentaron concentraciones más elevadas de pigmentos (41 mg/100g) (Figura 41).

Tabla XX. Tabla de interacciones en la concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas de camarón mediante el análisis de varianza de tres factores.

<i>Factores</i>	<i>Significancia</i>
<i>Alimento</i>	NS
<i>Tiempo post-mortem</i>	NS
<i>Estrés</i>	**
<i>A x T</i>	NS
<i>A x E</i>	NS
<i>T x E</i>	NS
<i>A x T x E</i>	NS

A= Alimento, T=tiempo post-mortem, E=estrés. NS= no significativo. Un asterisco indica ($P < 0.05$) y dos asteriscos indican ($P < 0.01$).

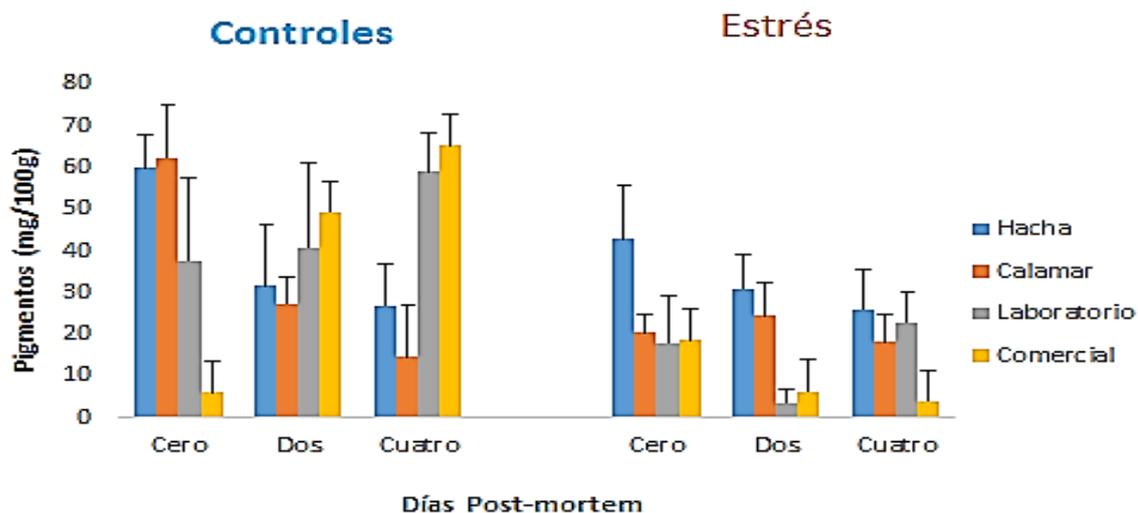


Figura 40. Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100g) en hepatopáncreas de camarón.

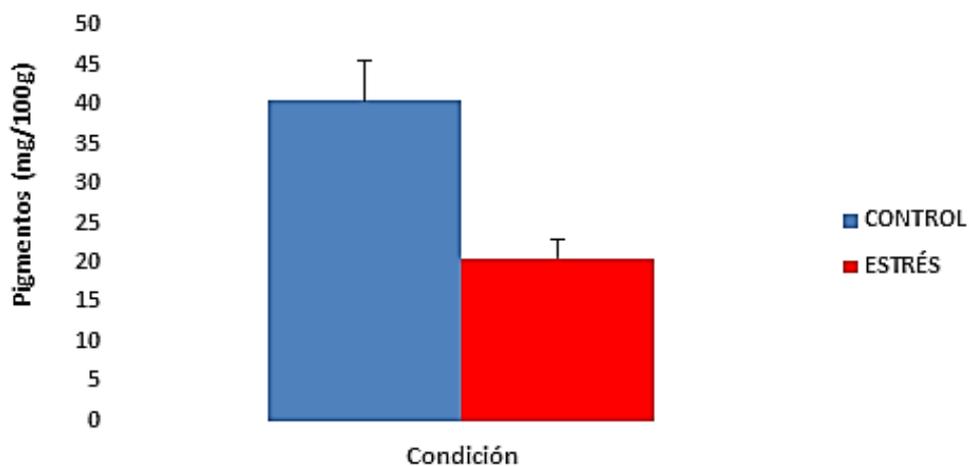


Figura 41. Efecto del factor condición sobre la concentración de pigmentos carotenoides en hepatopáncreas de camarón. Letras diferentes indican diferencias significativas.

9. DISCUSIÓN

9.1 Desempeño en cultivo

Los camarones de los diferentes tratamientos iniciaron con un consumo de alimento de 0.05g/día por organismo; después de transcurridos 45 días de experimento, los camarones alimentados con vísceras de hacha y calamar presentaron un consumo mayor (0.16-0.22 g/día), en comparación con el consumo de alimento comercial (0.08g/día). Este mayor consumo del alimento de vísceras de hacha y calamar puede deberse a dos factores: 1) los organismos consumieron más alimento para tratar de compensar una posible deficiencia de nutrientes. Es bien sabido que el nivel de proteínas en la dieta es un factor crítico en la elaboración de alimentos formulados; en el presente estudio, como ya se mencionó anteriormente todos los alimentos se formularon con un porcentaje de 38 % de proteína, con base en los requerimientos nutricionales de proteína para camarón blanco *L. vannamei* (35-40 %) (D´Abramo, 1997). Otro macronutriente de gran importancia en la nutrición de camarones peneidos son los lípidos, como fuente de energía y ácidos grasos esenciales, que favorecen un buen crecimiento y supervivencia en cultivo. Sin embargo, el mayor consumo de alimento se presentó en los organismos alimentados con vísceras calamar que es en particular el alimento que contiene una mayor cantidad de lípidos (Tabla II). 2) los alimentos de vísceras de calamar y vísceras de almeja presentan una mayor palatabilidad, estimulando de este modo a una mayor ingestión de estos alimentos.

En un estudio realizado por Akiyama et al (1993) mencionan que la harina de calamar utilizada en la elaboración de alimento para camarones presenta aminoácidos libres y pequeños péptidos que sirven como atractantes para el camarón, actuando como un estimulante químico de la ingestión del alimento.

El factor de conversión alimenticia es la medida del peso del camarón producido por kilogramo de alimento abastecido y se calcula mediante el peso del alimento suministrado y el peso final de los organismos. En el presente estudio se encontraron diferencias significativas para el factor de conversión alimenticia en los diferentes alimentos probados durante el bioensayo de crecimiento en

camarón, obteniendo valores de FCA de 1.3 para los camarones del alimento comercial, así como para los camarones alimentados con vísceras de callo de hacha. Los resultados antes mencionados, indican una mayor eficiencia del uso del alimento en los camarones alimentados con subproductos de callo de hacha, al reportar los valores más bajos de FCA (Cruz-Ricque et al., 1987).

Boyd y Clay (2002) indican que el factor de conversión alimenticia para camarón blanco *L. vannamei* en condiciones de cultivo intensivo oscila entre 1.2 y 1.8, lo cual concuerda con los valores de FCA obtenidos en el presente estudio, los cuales oscilaron entre 1.3-1.6.

De acuerdo con el mayor consumo de alimento, la mayor ganancia en peso se obtuvo en los organismos alimentados con vísceras de calamar (6.55 g). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con el estudio realizado por Gama-Ortiz (2013) en el cual utilizaron desechos de calamar y almeja con una inclusión al 10% para la elaboración de alimentos para camarón (*L. vannamei*), encontrando un mayor peso final en los organismos alimentados durante 30 días con desechos de calamar. En un estudio similar Martínez-Contreras (1999) utilizó desechos de calamar en la elaboración de alimentos para bagre, registrando un mayor peso final en organismos alimentados durante 42 días con desechos de calamar.

Martínez-Vega (1997), probaron la sustitución de la harina de pescado por harina elaborada a partir de vísceras de calamar para la formulación de alimentos para camarón blanco, y encontró que la ganancia en peso fue similar a los camarones alimentados con el alimento control (sardina). Esto concuerda con que la sustitución total de la harina de pescado por harinas alternas elaboradas con subproductos de calamar es factible, debido a que mediante el uso de los subproductos pesqueros se ha logrado igualar e inclusive mejorar el desempeño en cultivo de camarón blanco, principalmente en relación al peso final.

En relación a subproductos de almejas, en un estudio realizado por Reyes-Becerra (2011), probaron la sustitución al 100% de la harina de pescado por harina elaborada a partir de subproductos de almeja (*Argopecten ventricosus*)

en la elaboración de alimento para camarón blanco, sin encontrar diferencias significativas en el peso final de los organismos. Palma-Cruz (2015) realizó la sustitución total de la harina de pescado por harina de residuos de callo de hacha (*Atrina maura*) para la elaboración de alimento para camarón, registrando una mayor ganancia en peso en los camarones alimentados con residuos de callo de hacha, con respecto a los camarones alimentados con una dieta control de harina de pescado.

Los datos de sobrevivencia durante el desarrollo del experimento se mostraron muy similares entre los alimentos de laboratorio, vísceras de calamar y callo de hacha, aunque se presentaron diferencias con respecto de alimento comercial en donde se presentó la sobrevivencia más baja. Como dato particular del bioensayo, durante la manipulación en las biometrías los camarones del alimento comercial presentaron frecuentes contracturas en la región abdominal, seguida de una peculiar coloración blanquecina en la parte dorsal del cefalotórax, condición que no se logró revertir en ninguno de los camarones afectados, provocando la muerte del organismo. Lo anterior pudiera ser una consecuencia del bajo consumo de alimento que se presentó en el alimento comercial a lo largo del experimento, causando de este modo una disminución en condición fisiológica de los organismos. Mercier et al (2006), demostraron el efecto del estrés por manipulación sobre el desempeño en cultivo de camarones, encontrado una menor sobrevivencia en camarones sometidos a una condición de estrés, efecto de una disminución en la condición fisiológica por manipulación tal y como ocurrió durante los eventos de muestreo y biometrías en el presente estudio.

9.2 Respuesta de escape.

9.2.1 Respuesta comportamental

No se tienen estudios en los cuales se analicen la influencia de diferentes condiciones de cultivo, como el tipo de alimento, sobre una capacidad fisiológica adaptativa como sería la respuesta de escape. Sin embargo, a nivel ecológico la capacidad de nado de almejas ("clapping") está relacionada con la época reproductiva que a su vez tiene que ver con la disponibilidad de alimento y reservas energéticas, por lo cual refleja de alguna manera la condición fisiológica (Cromarty et al., 1998; Brokordt et al., 2000). Lo anterior indica que ciertas características como la eficiencia de la respuesta de escape puedan ser un buen indicador de una condición de "vigor fisiológico" que pueda utilizarse en la selección de la mejor condición de cultivo, mejor alimento, etc. Así, el mayor vigor fisiológico inferido por la capacidad en la respuesta de escape se presentó en los grupos de camarones alimentados con subproductos pesqueros, dado que los camarones alimentados con vísceras de hacha y calamar presentaron el máximo número de "coletazos" (41 y 39, respectivamente) antes de alcanzar el estado de agotamiento fisiológico. En contraste, se obtuvieron valores considerablemente menores para el alimento de laboratorio y el comercial con 26 y 23 coletazos, respectivamente.

En otros trabajos donde se ha evaluado la capacidad en la respuesta de escape de diversas especies de decápodos, en los que se ha empleado un alimento comercial son similares o menores. Así, Gäde et al (1984), en un estudio realizado con *Orconectes limosus*, al suministrar un alimento comercial, obtuvieron una respuesta de escape de 39 coletazos. Recientemente Robles-Romo et al (2014) evaluaron el estado energético del camarón blanco *L. vannamei* en la respuesta de escape, presentando un máximo de 29 flexiones abdominales.

En cuanto al periodo de duración de la respuesta de escape en el presente estudio, podemos observar una relación directa con el número de "coletazos" la cual tiene sentido si consideramos que una menor capacidad de respuesta implica que los organismos se agoten más rápidamente. El menor tiempo fue de

30 segundos para los camarones del tratamiento comercial, mientras que el mayor tiempo fue de 55 segundos para los camarones alimentados con vísceras de hacha. Estos valores de manera general se encuentran dentro de los valores reportados en trabajos previos: 59 segundos para *Orconectes limosus* (Gade et al., 1984), 20 segundos en *P. serratus* (Thébault et al., 1997), mientras que para *Marsupenaeus japonicus* el tiempo de respuesta fue de apenas 9 segundos (Yu et al., 2009). En un estudio más reciente, Robles-Romo et al. 2014 reportaron un tiempo de duración de la respuesta de escape de 25 segundos en *L. vannamei* alimentado con el mismo alimento comercial, lo cual fue incluso ligeramente menor al tiempo obtenido en el presente estudio para este tratamiento. En este sentido es posible que otro dato útil a considerar para evaluar el "vigor fisiológico" no sea únicamente el número de "coletazos" presentado y la duración de la respuesta de escape antes de alcanzar el estado de agotamiento, sino la frecuencia de "coletazos". Así, en nuestro trabajo en el tratamiento considerado como el peor desempeño (alimento comercial), se presentaron 23 coletazos en 30 segundos, que equivale a 0.77 coletazos/seg., mientras que en el estudio de Robles-Romo et al. (2014), la frecuencia fue de 1.16 coletazos/seg que podría sugerir una mejor condición dada las condiciones experimentales en tinas grandes (3m de diámetro) comparado con las condiciones del presente trabajo en acuarios pequeños. Sin embargo, en el presente trabajo no parece haber muchas diferencias en las frecuencias de "coletazos" dado que el tratamiento con mejor desempeño (vísceras de hacha) presentó una frecuencia de 0.75 coletazos/seg, mientras que para el desempeño más bajo (alimento comercial) fue de 0.77 coletazos/seg, con valores similares para los otros dos tratamientos: 0.87 y 0.74 coletazos/seg para vísceras de calamar y alimento laboratorio, respectivamente.

9.2.2 Metabolismo energético en la respuesta de escape

9.2.1 Fosfato de arginina

El aporte energético durante la respuesta de escape en crustáceos derivado del uso de fosfógenos de alta energía como el fosfato de arginina es un tema ampliamente estudiado (Gäde, 1984; Thebault y Raffin, 1991; Thebault et al., 1997; England y Baldwin, 1983). Un gran número de trabajos de investigación se han realizado en diversos crustáceos decápodos en los cuales se ha demostrado una disminución del fosfato de arginina desde un 50% hasta en un 97 % por efecto de estrés en la respuesta de escape (England y Baldwin 1983; Gäde, 1984; Thébault y Raffin, 1991; Thébault et al., 1997).

En el presente estudio se observó una disminución del 64% del fosfato de arginina en camarones *L. vannamei* sometidos a un estrés por manipulación para generar la respuesta de escape. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado para otras especies de decápodos, un ejemplo es el estudio realizado por Thébault et al (1994) en el que se reportó una disminución del 60% en el fosfato de arginina en *P. elegans* y *P. serratus* tras realizar respuesta de escape por estimulación eléctrica. Para *L. vannamei*, Robles-Romo et al (2014) reportaron una disminución del 75% en el fosfato de arginina después de realizar 29 flexiones abdominales en respuesta de escape por efecto de estrés por manipulación.

La disminución en la concentración de Arg-P por efecto del tipo de alimento consumido, indica que los camarones alimentados con vísceras de hacha presentaron un mayor agotamiento de sus reservas de Arg-P (97%) lo cual concuerda con el mayor desgaste físico en la respuesta de escape, dado que con este alimento se presentó el máximo de 41 flexiones en 55 segundos. Esta disminución en las reservas de fosfógenos hasta casi su agotamiento, en periodos de corta duración, valida el uso de la Arg-P en condiciones desfavorables como es un evento de estrés por manipulación (Gäde et al., 1984; Thebault et al., 1994; Thébault et al., 1997)

8.2.2 Carga energética adenílica (CEA)

La respuesta metabólica y respiratoria de crustáceos al estrés se tiene bien documentada en decápodos; Se sabe que la concentración de ATP y CEA puede disminuir en función del tipo de estresor, así como de la capacidad fisiológica del organismo para hacer frente a esta situación (England y Balwin, 1983). Gäde (1984), reportó una disminución significativa en los valores de ATP (12%) y de la CEA (16%) en organismos estresados por estimulación para generar la respuesta de escape en *Orconectes limosus*, realizando 66 flexiones abdominales en un periodo de 59 s. En un estudio similar, England y Baldwin (1983) reportan en *Cherax destructor* una disminución más pronunciada de ATP (40%) y CEA (28%) tras realizar un máximo de 60 flexiones abdominales. Robles-Romo et al (2014) reportan una disminución en la concentración e ATP (35%) y CEA (18%) respectivamente en camarones *L. vannamei* estresados con una respuesta de escape de 29 coletazos en un periodo de 25 segundos. En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en la concentración de ATP y la CEA por efecto de estrés, observando una disminución en la concentración de ATP (25%) y en la CEA (35%) en los organismos que se encontraron sometidos a un estrés por manipulación, lo cual coincide con los resultados en los estudios antes mencionados.

Estas diferencias pueden ser atribuidas al régimen del ejercicio, lo que ocasiona una caída de la concentración de ATP y la CEA, al mismo tiempo que incrementa la concentración de ADP y AMP (Atkinson y Walton, 1967; Atkinson, 1968). A pesar de no existir diferencias significativas por efecto de la condición de estrés, se registró un incremento en las concentraciones de ADP y AMP en los organismos estresados con respecto de grupo control. Este efecto coincide con los eventos que se presentan durante un evento típico de estrés agudo, en el cual se presentan una serie de cambios fisiológicos en el músculo de crustáceos, los cuales se caracterizan por el agotamiento en las reservas de Arg-P y una disminución considerable en la concentración de ATP, al mismo tiempo que las concentraciones de ADP y AMP tienden a incrementarse (Méndez et al. 2001; Gornik et al 2008; 2010). Sin embargo, estas diferencias pueden de igual forma ser atribuidas a las reservas de fosfato de arginina presentes en el músculo,

atenuando la disminución de la concentración de ATP y la CEA en el músculo de los camarones durante el evento de estrés. Es bien sabido que la capacidad en la respuesta de escape en camarones peneidos depende en gran medida de los almacenes energéticos de metabolitos como ATP, fosfágenos de alta energía (Arg-P), glucógeno, lactato, entre otros (Peterson, 1993; Hervant et al. 1999; Morris y Adamczewska, 2002).

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en la concentración de ATP entre los diferentes alimentos experimentales utilizados en el presente trabajo de investigación, donde las mayores concentraciones de ATP se registraron en los alimentos de vísceras de callo de hacha y calamar. A la fecha no se cuenta con estudios que relacionen la concentración de Arg-P o ATP en músculo de decápodos en relación al tipo de alimento consumido; sin embargo, se ha reportado que la composición química de algunas materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos formulados, como son la harina de calamar y algunas especies de almejas, contienen altas concentraciones de nucleótidos. Diversos autores han reportado la incorporación de nucleótidos como suplemento en el alimento de organismos en cultivo, mostrando un gran número de efectos benéficos como un mayor crecimiento, reducción en la susceptibilidad a enfermedades, así como un incremento en la tolerancia al estrés (Burrells et al., 2001; Leonardi et al., 2003).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato y glucógeno en músculo por efecto del estrés por manipulación. Esto se debe posiblemente a que el tiempo de exposición al agente estresor no fue lo suficientemente intenso para activar el metabolismo anaeróbico. Robles-Romo et al (2014) aplicaron un agente estresor para producir la respuesta de escape en *L. vannamei*, logrando un total de 29 flexiones abdominales en un tiempo de 20 segundos, condición en la cual tampoco se observaron cambios en el glucógeno o el lactato muscular; se puede apreciar un incremento en el lactato a nivel de hemolinfa que no fue evaluado en el presente trabajo.

De hecho, el incremento en la concentración de lactato es un evento característico de la respuesta de estrés, pero que resulta más evidente en hemolinfa que en el tejido muscular o hepatopáncreas. Se ha sugerido que los crustáceos decápodos poseen un eficiente sistema de eliminación del lactato muscular hacia la hemolinfa (Yu et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010).

Otro aspecto importante de señalar es que algunos organismos del grupo de alimento comercial, al aplicarles un estímulo estresor agudo, presentaron contractura muscular, además de presentar una coloración blanca en la parte dorsal del músculo abdominal, lo que redujo considerablemente su capacidad de realizar flexiones abdominales para efectuar la respuesta de escape. Thébault y Raffin (1991), en un estudio con *P. serratus* se registraron 10-40 flexiones rápidas y vigorosas, seguido de una serie de 5-10 flexiones de menor intensidad hasta alcanzar el agotamiento, registrando la aparición de una coloración blanquecina en el músculo abdominal, de manera similar a lo ocurrido en los camarones del grupo comercial en el presente estudio.

La rápida contractura del músculo abdominal de estos organismos puede deberse en gran parte a la fatiga muscular, producto de una actividad física intensa como lo es la respuesta de escape. Se sabe que un ejercicio de alta intensidad con frecuencia lleva a un rápido descenso en la función contráctil, ocasionando fatiga muscular. Existe una relación causal entre el metabolismo anaeróbico y la fatiga muscular: esto es, que algunas consecuencias del metabolismo anaeróbico causan la disminución de las funciones contráctiles. La hidrólisis del glucógeno anaeróbico lleva a una acumulación intracelular de ácidos inorgánicos, de los cuales el ácido láctico es el más importante. El ácido láctico es un ácido fuerte, este se disocia en lactato y H⁺. Los iones de lactato pueden tener un pequeño efecto sobre la contracción muscular; sin embargo, el incremento en los iones H⁺ (reducen pH o acidosis) es la causa clásica de fatiga del músculo esquelético (Robergs et al., 2004; Kano et al., 2012).

En el presente estudio, se observó una disminución en la concentración de proteínas y lípidos totales en músculo de camarón por efecto del estrés por manipulación en la respuesta de escape. Los lípidos y las proteínas son

combustibles metabólicos que se almacenan en los principales tejidos como músculo y hepatopáncreas en camarones y durante una condición adversa como lo es un evento de estrés en cultivo, los camarones utilizan sus reservas tanto de lípidos como de proteínas como fuente de energía, para hacer frente a las altas demandas de energía generadas en esta condición (Racotta y Palacios, 1998; Rosas et al., 2002; Mercier et al., 2006).

9.3 Bioquímica post-mortem

9.3.1 Fosfato de arginina

Los cambios post-mortem en el músculo de camarones peneidos son complejos, interconectados y mediados por múltiples factores; siendo el efecto del factor tiempo post-mortem uno de los temas más estudiados. En condiciones post-mortem se sabe que en el músculo de crustáceos, los transportadores de alta energía (Arg-P) se degradan antes de la disminución del ATP, y está influenciada por diferentes factores como son temperatura, estrés ante-mortem, tiempo de almacenamiento, etc.

En el presente estudio se observó una caída significativa (84%) de la concentración de la Arg-P en músculo, desde la cosecha hasta el día 4 post-mortem. Shidama et al (2000) registraron altas concentraciones del fosfato de arginina ($30 \mu\text{mol g}^{-1}$) en el tiempo cero, con una concomitante caída del 80% a las 20 horas, hasta su agotamiento a las 48 horas post-mortem en un estudio realizado con la langosta *Homarus americanus* almacenada a 0°C . Gornik et al (2008; 2010) registraron una concentración inicial de Arg-P de $40 \mu\text{mol g}^{-1}$ para el tiempo cero en el músculo abdominal del crustáceo *Nephrops norvegicus*, con una disminución del 90% en la concentración de Arg-P a las 12 horas, hasta su agotamiento a las 24 horas post-mortem.

En este estudio se encontraron diferencias significativas en la concentración de Arg-P en músculo de camarón por el efecto combinado de los diferentes tiempos post-mortem y la condición de estrés, encontrando una disminución más pronunciada en los primeros dos días de almacenamiento en los niveles de Arg-P en camarones no estresados. En contraste y al cómo se discutió anteriormente para organismos sometidos a estrés ante-mortem, las reservas de Arg-P se

encontraron casi agotadas, por lo cual ya no se observó una disminución adicional durante el tiempo post-mortem. Se tiene reportado que las reservas de Arg-P se agotan en las primeras 24 horas post-mortem (Gornik et al., 2010). En el presente estudio se registró una disminución del 84% de la Arg-P en músculo de *L. vannamei* sometidos a estrés por manipulación, así como el agotamiento de la Arg-P para los tiempos dos y cuatro post-mortem, lo cual resulta consistente con lo mencionado en trabajos antes citados que con el estrés ante-mortem posible una disminución adicional de la Arg-P. Por el contrario se observó un ligero aumento no significativo de Arg-P entre el tiempo cero y dos días post-mortem, que difícilmente se puede explicar y que debe ser analizado más a fondo para ver si se trata de un efecto real.

9.3.2 Nucleótidos

Los camarones alimentados con vísceras de callo de hacha mostraron una mayor concentración de ATP en organismos recién sacrificados ($2.2 \mu\text{mol g}^{-1}$). La mayor concentración de ATP en este grupo de camarones en particular, pudiera ser el resultado de un mayor estatus energético que concuerda con un mayor contenido de Arg-P. Como ya se mencionó anteriormente la Arg-P desempeña una función de buffer energético, aportando fosfatos de alta energía; en condición post-mortem, el contenido de ATP incrementa por un periodo corto de tiempo, debido a que los nucleótidos son regenerados por la degradación de la Arg-P previo a la destrucción del ATP (Iwamoto et al., 1988). Por lo tanto, la degradación de la Arg-P antecede a la degradación del ATP, indicando de este modo que una mayor reserva de fosfógenos al momento del sacrificio, alarga el tiempo de degradación de los nucleótidos (Delbarre-Ladrat et al., 2006; Albalat et al., 2009; Gornik et al., 2010).

El ATP es el nucleótido predominante en todos los organismos al momento del sacrificio, y este comienza a degradarse rápidamente durante las primeras horas post-mortem, agotándose prácticamente para los tiempos dos y cuatro post-mortem (Hiltz y Dyer, 1970; Gornik et al., 2008; Albalat et al., 2009). Los resultados encontrados en el presente estudio, concuerdan con el estudio de Díaz-Tenorio (2006) donde se reportó una caída en la concentración de ATP en

el músculo del camarón blanco *L. vannamei*, la cual disminuyó drásticamente a las 12 horas y agotándose a las 24 horas post-mortem.

La concentración inicial de ATP depende de distintos factores como son: la especie, el tipo de tejido, el estado nutricional, el método de captura, así como la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Huss, 1995). La concentración de ATP en el presente estudio para el tiempo cero fue de $4 \mu\text{mol g}^{-1}$, lo cual resulta consistente con lo reportado para *Nephrops norvegicus* $3.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Gornik et al., 2010) y un tanto menor a lo reportado previamente para otras especies de crustáceos: $9.53 \mu\text{mol g}^{-1}$ para *Scylla serrata* (Chiou y Huang, 2003), $6.81 \mu\text{mol g}^{-1}$ en *L. vannamei* (Robles-Romo et al., 2014) y $4.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ en *Chionoecetes opilio* (Hiltz y Bishop, 1974).

Con respecto a la concentración de ADP, se encontraron diferencias significativas por efecto del factor tiempo post-mortem. La degradación de nucleótidos se presenta durante las primeras 24 horas post-mortem y comienza con la hidrólisis del ATP a ADP, por lo que las concentraciones de ADP se presentan altas en durante las primeras 12 horas post-mortem ($10 \mu\text{mol g}^{-1}$), seguidas de un decremento en la concentración de ADP, hasta su agotamiento a las 24 h post-mortem (Díaz-Tenorio, 2006). Gornik et al (2010) describen una concentración inicial baja de ADP en el músculo de *Nephrops norvegicus* al momento del sacrificio con un pico máximo de concentración a las 12 horas post-mortem ($2 \mu\text{mol g}^{-1}$). Los estudios anteriores coinciden con lo reportado en el presente estudio, donde se observó una mayor concentración de ADP en organismos recién cosechados ($2.5 \mu\text{mol g}^{-1}$), seguido del agotamiento de este nucleótido en los tiempos post-mortem siguientes que son posteriores al intervalo en donde se incrementa el ADP (12 hrs).

Por otra parte, la aplicación de una condición de estrés por manipulación por efecto de la respuesta de escape en el presente estudio, generó un incremento en la concentración de ADP en organismos sometidos a estrés ($3.2 \mu\text{mol g}^{-1}$). El incremento en la concentración de ADP en músculo se debe al efecto de la condición de estrés (como lo es la respuesta de escape en crustáceos decápodos), la cual tiene un efecto acelerador sobre la tasa de degradación de

nucleótidos, metabolizando rápidamente las reservas de ATP, al mismo tiempo que la concentración de ADP y AMP incrementan (England y Baldwin, 1983; Thébault et al., 1997; Morris y Adamczewska, 2002).

En condiciones post-mortem, la aplicación de un agente estresor ante-mortem, influye considerablemente en el curso de los eventos post-mortem (Gornik et al., 2008; 2010). En condición post-mortem los camarones no estresados presentaron bajas concentraciones de ADP y AMP en las primeras horas posteriores al sacrificio; seguido de un aumento paulatino en la concentración de ADP en las primeras 24 horas, acumulándose considerablemente el AMP al día 2 post-mortem. Sin embargo al aplicar un agente estresor, la concentración inicial de ADP se incrementa al tiempo cero, causando el agotamiento en las primeras 12 horas post-mortem. Una condición de estrés causa un efecto acelerador en los tiempos de degradación de los nucleótidos, ocasionando que la hidrólisis del ADP a AMP ocurra en un menor tiempo (Hiltz y Bishop, 1974; Gornik et al., 2008; 2010).

Saito et al. (1958) y subsecuentemente Arai (1966), indicaron que la ruta degradativa de nucleótidos en invertebrados marinos puede diferir a lo reportado para peces y vertebrados superiores, concluyendo que la principal ruta de conversión es de AMP a Inosina. En el músculo de crustáceos, sin embargo, una ligera actividad de la AMP desaminasa se demostró en langostas (Dingle et al., 1968), resultando en la formación de IMP, lo cual ocurre principalmente en la condición post-mortem, tal como se discutirá más adelante.

La concentración de IMP en organismos recién sacrificados con frecuencia es reportada como indetectable debido a las bajas concentraciones (Díaz-Tenorio, 2006; Gornik et al., 2010). Los niveles de IMP en *L. vannamei* en este estudio en el tiempo al tiempo cero no fueron detectables. Sin embargo, en algunos casos y a pesar de la baja actividad de la AMP desaminasa, el aumento de la concentración de IMP se ha reportado no solo en condiciones post-mortem, sino también en crustáceos vivos expuestos a condiciones de estrés (Paterson, 1993; Albalat et al., 2009; Robles-Romo, 2014). En otros estudios, la concentración de IMP se mantuvo por debajo del límite de detección aún en organismos

estresados por la respuesta de escape (Gornik et al., 2010). Lo antes descrito, podría explicar que el efecto depende de la duración o intensidad del agente estresor. Sin embargo, en el presente trabajo no se observó un incremento de la concentración de IMP por efecto de la condición de estrés mediante la respuesta de escape.

En los primeros estadios de la condición post-mortem, el ATP en el músculo de casi todas las especies los peces y mariscos son degradadas rápidamente a hasta IMP. El IMP es el resultado de una reacción de desaminación del AMP, mediada por la enzima AMP desaminasa tiende a acumularse posterior a 24 horas post-mortem, seguido de una inminente degradación para dar paso a la acumulación de Hx (Connell y Shewan, 1980; Kenish y Kramer, 1986; Murata y Sakaguchi, 1989). La disminución del ATP y el aumento del IMP en condición post-mortem son efectos típicos reportados en esta etapa en los organismos marinos, lo cuales pueden observarse después de horas o días (Matsumoto y Yamanaka., 1990; Mandes et al., 2001). Díaz-Tenorio (2006), reportó un incremento en la concentración de IMP en el músculo de camarón *L. vannamei* mantenido a 0°C, con una máxima acumulación de este nucleótido a los 8 días (15 $\mu\text{mol g}^{-1}$), seguido de una disminución hasta su agotamiento a los 30 días post-mortem. El incremento del IMP en condición post-mortem ha sido ampliamente documentado en diversos crustáceos y moluscos, los cuales pueden variar en función de diversos factores con valores de: 2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en *Scylla serrata* después de 4 días en hielo (Chiou y Huang, 2004), 0.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en *Illlex argentinus* tras 6 días en hielo (Sahedhal et al., 2008) y 0.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en *Haliothis discus* mantenido a 10 °C por 7 días (Watanabe et al., 1992). En el presente estudio se encontró un aumento significativo de la concentración de IMP en músculo con respecto al paso del tiempo post-mortem, registrando una máxima acumulación de IMP (0.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$) a los cuatro días post-mortem. El incremento de IMP coincide con lo reportado previamente en diversos trabajos, sin embargo, la concentración máxima acumulada es menor a lo reportado en otras especies de crustáceos.

La baja concentración de IMP observada en el presente trabajo puede estar asociada al tipo y tiempo de las condiciones post-mortem, el cual resultó no ser tan intenso como para generar una respuesta mayor en la degradación del IMP después de transcurridos cuatro días post-mortem. Sin embargo, la baja acumulación de IMP en músculo aun a los cuatro días post-mortem, podría asociársele como un efecto poco deseado, considerando que el IMP es un indicador de frescura en productos marinos. Esto resulta sumamente importante en términos de calidad, ya que el IMP ha sido considerado como un componente activo relacionado con el sabor en diversas especies de crustáceos como *Nephrops norvegicus*, *Chionoecetes opilio*, entre otros (Hayashi et al., 1981; Shahidi y Botta, 1994; Shirai et al., 1996). Por lo tanto, un aumento gradual de la concentración de IMP, así como una degradación más lenta de los nucleótidos, pudieran influenciar de manera directa en la palatabilidad del tejido de crustáceos (Hughes y Jones, 1966; Haard, 1992).

Los perfiles de producción de Hx en músculo durante el periodo post-cosecha mostró diferencias significativas en el cambio en la concentración de Hx durante los primeros cuatro días post-mortem. La concentración de hipoxantina en el presente estudio en organismos recién cosechados fue muy baja con valores cercanos a cero. Las bajas concentraciones de Hx en el tiempo cero, coinciden con lo publicado por Gornik et al (2010), en el que no fue posible la detección de este nucleótido, aun en organismos sometidos a estrés. La mayor concentración de Hx se presentó en el día cuatro post-mortem, registrando concentraciones cercanas a $1 \mu\text{mol g}^{-1}$. Un incremento similar ha sido reportado en estudios previos en crustáceos, Chiou y Huang (2004), registraron concentraciones de Hx de $1.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ en *Scylla serrata* en tejidos almacenados a 10°C durante 6 días.

La producción de hipoxantina muestra una alta correlación con el sabor amargo en los productos acuícolas (Fletcher y Statham, 1988). Por lo tanto, el rápido incremento de la concentración de hipoxantina en los tejidos implica una pérdida en la calidad del músculo para su consumo durante su almacenamiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran una baja

concentración de Hx durante los primeros cuatro días post-mortem, y no en relación con el tipo de alimento por lo cual no existe ninguna ventaja de algún alimento en particular que se relacione con una producción más lenta de Hx y por ende en una mayor vida de anaquel. En realidad se esperaba una interacción entre el tipo de alimento y estrés, partiendo de la hipótesis que en organismos sometidos a estrés, se aceleraba la cascada de hidrólisis de ATP con producción de AMP que se transformaba a IMP y posteriormente en Hx. Sin embargo, este no fue el caso dado que el AMP no se incrementó en animales sometidos a estrés ante-mortem ni tampoco tuvo un curso temporal diferente en la condición post-mortem dependiendo del estrés ante-mortem. En consecuencia, el IMP tampoco se vio afectado por la condición de estrés ni tampoco por la interacción estrés-tiempo post-mortem. Lo anterior contrasta con Gornik et al (2010) en el cual si hay un incremento del AMP por estrés ante-mortem por ejercicio y emersión. Por ende, la producción de IMP post-mortem fue prematura en animales sometidos a condiciones de estrés, aunque no se tradujo en una producción previa de Hx. Las diferencias entre el presente trabajo y el de Gornik se pueden deber a varias razones como la especie y su susceptibilidad particular al estrés, la naturaleza y la intensidad del estímulo estresor, entre otras.

Por último, el efecto del tipo de alimento sobre los niveles de IMP con valores menores para los camarones alimentados con vísceras de hacha podría sugerir una menor palatabilidad que sin embargo tendría que evaluarse con pruebas formales de paneles de degustación. Por el contrario y aunque los efectos no fueron significativos, la menor aparición de IMP coincide también con niveles menores de Hx en el tratamiento de vísceras de hacha, lo cual sugeriría hasta cierto punto que los camarones alimentados con vísceras de hacha permanecieron "más frescos" durante el tiempo de congelación analizado.

9.3.3 Lípidos totales

En el presente trabajo el análisis del contenido de lípidos totales en hepatopáncreas no mostró diferencias significativas por efecto del tiempo post-mortem. En el tejido muscular se registró un incremento del 23% en la concentración inicial de lípidos totales al tiempo cero (85 mg g^{-1}), alcanzando una máxima concentración de este metabolito al día cuatro post-mortem (110 mg g^{-1}). Estos resultados, coinciden con lo reportado por Losada et al. (2006), donde se reportó un incremento del 40% tras 5 días en condición post-mortem en el contenido de lípidos totales en muestras de *Sardina pilchardus*, bajo dos condiciones de enfriamiento.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan diversos estudios en los que se ha reportado un efecto contrario con la disminución del contenido total de lípidos con el aumento de los días post-cosecha. Gandotra et al. (2012), reportaron una disminución del 82% del contenido de lípidos totales en muestras de músculo de *Mystus seenghala* almacenadas a 4°C . Arannilewa et al. (2005) obtuvieron una pérdida del 25% de lípidos totales en músculo de tilapia *Sarotherodon galiaenus*, después de 60 días de almacenamiento a 4°C . En un estudio similar, Siddique et al. (2001), encontraron una disminución del 35, 22 y 19% del contenido total de lípidos durante su almacenamiento en congelación en *Puntius sophore*, *P. gonionotus* y *P. sarana* respectivamente.

La disminución del contenido de lípidos totales en tejidos de diversos productos acuícolas durante el periodo post-cosecha, se ha atribuido principalmente a procesos de oxidación de lípidos, especialmente en ácidos grasos altamente insaturados. La degradación de los HUFA por auto-oxidación durante su almacenamiento pueden llevar a la formación de ácidos grasos libres y compuestos volátiles asociados con la rancidez (Pazos et al., 2005). Los cambios relacionados con la fracción lipídica en condición post-mortem se encuentran estrechamente relacionados con el sabor y la textura de la carne (Losada et al., 2006). Durante largos periodos de los productos en almacenaje, la oxidación de los lípidos se intensifica, pudiendo observar cambios en la coloración, así como en la calidad y valor nutricional de diversos productos acuícolas (Dragoev et al., 1998).

9.3.4 Ácidos grasos

Los porcentajes de ácidos grasos variaron en relación al origen de las materias primas utilizadas en la elaboración de los alimentos, registrando diferencias significativas para los diversos grupos de ácidos grasos en músculo y hepatopáncreas. Los alimentos elaborados con subproductos de callo de hacha y calamar presentaron un mayor porcentaje de los ácidos grasos altamente insaturados HUFA (22-27 %), DHA (9.7-13.3%), EPA (9-10%) y ARA (3.3%), en relación al alimento laboratorio.

El porcentaje de DHA y EPA en las vísceras de calamar se encontró por debajo de los valores reportados en glándula digestiva por de Moreno et al. (1998). Por otra parte, las vísceras de callo de hacha presentaron valores de DHA similares a lo reportado por Caers et al. (1999) en gónadas; mientras que el porcentaje de EPA fue similar a lo encontrado por Racotta et al. (2008) en gónadas. Por otro lado, el valor de ARA fue superior a lo reportado por Caers et al. (1999) en glándula digestiva y gónadas.

Estas variaciones encontradas en la composición química de las materias primas empleadas en la elaboración de harinas de origen marino se encuentran asociadas a diversos factores, como el lugar o temporada de captura, características propias de la especie, como la edad o el estado fisiológico, sexo o a condiciones del procesamiento mismo, si la harina se elabora de un organismo completo o solo de subproductos de este (Fenucci, 2007).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ácidos grasos por efecto de la condición de estrés. Sin embargo, en los camarones alimentados con vísceras de callo de hacha y calamar, se registró un mayor porcentaje de DHA y EPA, que son ácidos grasos a los que se les ha atribuido un efecto atenuador del estrés. Si bien no se encontró un efecto directo de estos ácidos grasos sobre la condición de estrés como tal, cabe la posibilidad que la acumulación de estos HUFA a través del consumo del alimento pudiera tener un efecto sobre la condición fisiológica de los camarones incrementando el desempeño de estos durante el cultivo (Palacios et al., 2004). De acuerdo a lo antes mencionado, en el presente estudio, los camarones

alimentados con subproductos de callo de hacha y calamar mostraron un notable mayor desempeño en cultivo en los atributos de sobrevivencia, ganancia en peso, alimento consumido y tasa de crecimiento, lo cual resulta consistente con lo antes discutido. En estudios preliminares, se ha reportado que un suplemento de HUFA en el alimento mejora el crecimiento y la supervivencia de los camarones peneidos, tanto en estadios larvales como en juveniles (Millamena et al., 1988; Léger y Sorgeloos, 1992; Rees et al., 1994; Kontara et al., 1997; González-Félix et al., 2003).

Por otra parte, el DHA y EPA no son los únicos ácidos grasos asociados a la respuesta de estrés. Recientemente, se han propuesto nuevos ácidos grasos altamente insaturados como moléculas capaces de modular e incrementar la condición fisiológica, así como la respuesta inmune (Calder, 2001). Un ejemplo de estos ácidos grasos es el ARA, un HUFA de la serie n-6, precursor de eicosanoides, los cuales se ha demostrado que son mediadores del sistema inmune (Stanley y Miller, 2006). Uno de los principales eicosanoides derivados del ARA son las prostaglandina PGE₂, las cuales se ha demostrado que en peces cumplen funciones estructurales de las membranas mitocondriales, actúan en la respuesta inflamatoria y ayudan a una mayor respuesta al estrés ambiental, (Bell y Sargent, 2003). Aguilar et al. (2012), reportaron una mayor tolerancia al estrés por hacinamiento en el camarón blanco *L. vannamei* alimentados con dietas con un alto contenido de ARA, atribuyendo este efecto a una mayor producción de PGE₂.

Por otra parte, se ha reportado en diversas especies de peces, el efecto del tiempo post-mortem sobre la fracción lipídica, específicamente en la disminución del contenido de ácidos grasos. Nazemroaya et al. (2009), registraron una disminución en el contenido de ácidos grasos DHA 45%, EPA 53%, ARA 57%, así como un incremento en los valores de peróxido (de 2,41 a 15.41) en macarela *Scomberomorus commersons* después de 6 meses de almacenamiento a -18°C. La disminución en la composición de ácidos grasos en peces ha sido atribuida a la oxidación de lípidos por la formación de hidroperóxidos. Los cambios oxidativos en los lípidos de peces congelados

pueden ser originados por la presencia de radicales libres, los cuales son indicadores de estos procesos (Dragoev et al., 1998). Estos tipos de radicales son fácilmente formados en los tejidos de peces durante su almacenamiento en condición post-mortem, debido a su alto contenido de HUFA. En el presente estudio no se encontraron cambios en el contenido de ácidos grasos por efecto del tiempo post-mortem, ni aun sumado con el efecto de la condición de estrés. A pesar de no haber realizado ninguna prueba de estrés oxidativo para la detección de radicales libres y compuestos secundarios de la oxidación de lípidos, al no presentar cambios en el contenido de ácidos grasos en el máximo tiempo (cuatro días post-mortem), los resultados indican que es posible que no exista daño oxidativo en los tejidos (músculo y hepatopáncreas).

Comparando las concentraciones de ácidos grasos de las harinas experimentales de vísceras de callo de hacha y calamar, contra harinas de pescado utilizadas comúnmente en alimentos acuícolas, como las de anchoa y arenque, podemos concluir que las harinas experimentales resultan un buen sustituto de las harinas de pescado, desde el punto de vista del contenido de HUFA, ya que el contenido de las harinas de pescado oscila entre 15-19% de DHA y 10-15% de EPA (García-Galano et al., 2007), y los contenidos de harinas de vísceras para las de calamar ronda en 20% para DHA y 15% de EPA; y para las de callo de hacha en aproximadamente 20% de DHA y 17% de EPA.

9.3.5 Pigmentos

En el presente estudio se registró una baja concentración de pigmentos carotenoides en los diferentes alimentos probados tanto en músculo como en hepatopáncreas, principalmente en los camarones alimentados con vísceras de callo de hacha y calamar. Escarria et al (1989) reportan que en las harinas de vísceras de callo de hacha los principales pigmentos que podemos encontrar son luteína y astaxantina. Latscha (1989) menciona que en *L. vannamei*, alrededor de 95% de la astaxantina se encuentra esterificada, unida a carotenoproteínas en el cefalotórax y exoesqueleto, y el resto está en forma libre, principalmente en la glándula digestiva y el músculo. Con base a lo antes mencionado, pudiera explicarse la baja concentración de pigmentos carotenoides en los tejidos

analizados, debido a que la unión de la proteína con el pigmento enmascara la pigmentación del músculo, dificultando el poder cuantificarlo.

Con respecto al efecto de la condición de estrés, se encontraron diferencias significativas en la concentración de pigmentos carotenoides en músculo de camarón, encontrando una mayor concentración de pigmentos en organismos estresados (3.9 mg/100g), con respecto de los organismos de la condición control (2.6 mg/100g). Se ha reportado que bajo condiciones de estrés, algunos organismos pueden hacer uso de sus reservas metabólicas como son las proteínas, como fuente de energía para hacer frente a las altas demandas de energía generadas en esta condición (Racotta y Palacios, 1998; Rosas et al., 2002; Mercier et al., 2006). Con base en lo anterior, es posible que el uso y movilización de proteínas por efecto de estrés, provoque un aumento en la concentración de pigmentos carotenoides, al liberarlos de la unión con la proteína.

Se registraron diferencias significativas en la concentración de pigmentos carotenoides con respecto al efecto del tiempo post-mortem en el músculo de camarón, registrándose un incremento en el contenido de pigmentos carotenoides al tiempo cero (2.0 mg/100g) al día cuatro post-mortem con una concentración de 4.5 mg/100g. Este efecto puede estar relacionado a que bajo condiciones post-mortem, el tejido muscular de peces, crustáceos y moluscos se encuentra susceptible a degradación de proteínas por la acción enzimática (proteasas) (An et al., 1996).

Dentro del grupo de las proteasas, las catepsinas son enzimas que están inactivas generalmente en el tejido vivo, y pueden ser activadas por la actividad física intensa, así como los procesos de congelación y descongelación del músculo en condición post-mortem. Se ha reportado que las catepsinas D y L desempeñan un papel primordial en la degradación autolítica del tejido del pescado. Se sabe que estas enzimas son mucho menos activas en presencia de ATP, lo cual sugiere que estas enzimas estarían activas sólo en el músculo de pescado *post mortem*. Por lo tanto, la fuerte actividad de las catepsinas en condición post-mortem, favorecen la degradación de proteínas musculares, lo

que favorecería el desprendimiento de los pigmentos que originalmente se encontraban unidos a la proteína, lo cual explicaría el incremento en la concentración de pigmentos carotenoides con respecto del tiempo post-mortem (Bahuaud et al., 2010; Zhou et al., 2014).

10. CONCLUSIONES

- 1) La sustitución total de la harina de pescado en el alimento de camarón por subproductos de pesca (vísceras de calamar y callo de hacha) ricos en HUFA, resultó en un mayor desempeño en cultivo de los camarones.
- 2) La sustitución total de la harina y el aceite de pescado en el alimento de camarón por harinas de subproductos de pesca ricos en HUFA, incrementó el vigor fisiológico inferido por la capacidad de respuesta de estrés de los camarones.
- 3) Los camarones alimentados con harinas de vísceras de callo de hacha mostraron un mejor estatus energético en términos de carga energética adenilica (CEA) y niveles de fosfágenos que los que fueron alimentados con alimento comercial, lo cual podría explicar la mayor capacidad de respuesta de escape.
- 4) Independientemente del tipo de alimento consumido, los bajos niveles de Hx, así como los altos niveles de IMP en músculo indican que no se pierde sustancialmente la "frescura" del camarón durante el almacenamiento a 0°C durante 4 días.
- 5) La composición de ácidos grasos en los diferentes tejidos analizados se vio afectada únicamente por el efecto del tipo de alimento consumido, con un mayor porcentaje de HUFA (DHA, EPA y ARA) en los camarones alimentados con subproductos de calamar y callo de hacha.
- 6) No se observó ningún efecto significativo del estrés ante-mortem y del almacenamiento a 0°C durante 4 días sobre el perfil de ácidos grasos esenciales del camarón, por lo que se descarta un posible daño oxidativo.
- 7) La sustitución de la harina y el aceite de pescado por el uso de subproductos de calamar y callo de hacha en la elaboración de alimento para camarón, mostraron características satisfactorias e incluso superiores en los parámetros biológicos, nutricionales y energéticos, con respecto a un alimento convencional de laboratorio o comercial.

11. LITERATURA CITADA

- Abdalla, A.S.A., A.P. Harrison, J.F. Jensen. 1999. Effect of some ante-mortem stressors on peri-mortem and post-mortem biochemical changes and tenderness in broiler breast muscle: A review. *World's Poultry Science Journal* 55:403-14.
- Aguilar, V., I.S. Racotta, E. Goytortua, M. Wille, R. Sorgeloos, R. Civera, E. Palacios. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquacult Nutr.* 18: 258-271.
- Akiyama, D.M., W.G. Dommy, A.L. Lawrence. 99. Penaeid shrimp nutrition for commercial feed industry revised. In: Akiyama, D.M, R.K. Tan (Eds.), *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia.* American Soybean Association, Singapore, 80-90pp.
- Albalat, A., S.G. Gornik, R.J.A. Atkinson, G.H. Coombs, D.M. Neil. 2009. Effect of capture method on the physiology and nucleotide breakdown products in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Marine Biology Research* 5:441-450.
- An, H., M. Y. Peters, T. Seymour. 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends Food Science and Technology.* 7: 321-327.
- Aparicio-Simón, B., M. Piñon, I.S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture.* 298: 308-314.
- Arannilewa, S.T., S.O. Salawu, A.A. Sorungbe, G.D. Aubrey. 2005. Effect of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish (*Sarotherodon galiaenus*). *Afr. J. Biotechnol.* 4: 852-855.
- Arjona O., A. Millan, A.M. Ibarra, E. Palacios. 2008. Muscle and roe lipid composition in diploid and triploid scallops. *J Food Lipids,* 15:407-419.
- Arnott, S.A., D.M. Neil, A.D. Ansell. 1998. Tail-flip mechanism and size-dependent kinematics of escape swimming in the brown shrimp *Crangon crangon*. *J Exp Biol.* 201: 1771-1784.

- Atkinson, D.E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*.7, 4030-4034.
- Atkinson, D.E., G.M. Walton. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 242, 3239-3241.
- Ashie, I.N.A., J.P. Smith, B.K. Simpson. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36:87-121.
- Aubourg, S., V. Losada, M. Prado, J.M. Miranda, J.B. Velázquez. 2007. Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: Effects of a preliminary treatment with an antimelanotic agent on enzymatic browning. *Food Chemistry*. 103:741-48.
- Bahuaud, D., T. Mørkøre, T.K. Østbye, E. Veiseth-Kent, M.S. Thomassen, R. Ofstad. 2010. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress. *Food Chemistry*. 11: 602-615.
- Barrows, F.T., T.G. Gaylord, D.A.J. Stone, C.E. Smith. 2007. Effect of protein source and nutrient density on growth efficiency, histology and plasma amino acid concentration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research*. 38: 1747–1758.
- Barton, B.A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *N. Am. J Aquac.*62:12–18.
- Beis, I., E. A. Newsholme. 1975. The contents of adenine nucleotides phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal* 152:23-32.
- Bell, J.G., I Ashton, C.J. Secombes, B.R. Weitzel, J.R. Dick, J.R. Sargent. 1996. Dietary lipid affects phospholipids fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotriene & Essential Fatty Acids*. 54: 173-182.

- Bell, J. G., D. R. Tocher, R. J. Henderson, J. R. Dick, V. O. Crampton. 2003. Altered Fatty Acid Compositions in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fed Diets Containing Linseed and Rapeseed Oils Can Be Partially Restored by a Subsequent Fish Oil Finishing Diet. *The Journal of Nutrition*. 133: 2793-2801.
- Boyd, C., J. Clay. 2002. Evaluation of Belize aquaculture, Ltd.: superintensive shrimp aquaculture system. FAO. Roma. 17 p.
- Bragagnolo, N., D.B. Rodriguez-Amaya. 2001. Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *J Food Compos Anal*, 14:359-369.
- Bransden, M.P., G. Butterfield, J. Walden, L.A. McEvoy, J.G. Bell. 2005. Tank color and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 250: 328-340.
- Brokordt, K.B., J.H. Himmelman, H.E. Guderley. 2000. Effect of reproduction on escape responses and muscle metabolic capacities in the scallop *Chlamys islandica* Müller 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 251: 205-225.
- Brown, W.D. 1986. Fish muscle as food. En: Bechtel, P.J. Muscle as food. Academic press. Orlando, Florida. 405.
- Burrells, C., P.D. Williams, P.J. Southgate, S.L. Wadsworth. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 199: 171-184.
- Burns, G.B., P.J. Ke, P.J., B.B. Irvin. 1985. Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue. *J. Assoc. Off. Anal Chem*. 68:444.
- Caers, M., P. Coutteau, K. Cure, V. Morales, G. Gajardo, P. Sorgeloos. 1999. The Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*, Lamarck, 1819): fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comp Biochem Physiol B*. 123:89-96.

- Calder, P.C. 2001. *N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale?* Nutrition Research. 21: 309-341.
- Carranco- Jáuregui, M.E., M.D.L. Carrillo-Calvo, F. Perez-Gil, F. Romo. 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 61 (3).
- Chinivasagam, H.N., H.A. Bremner, S.J. Thrower, M. Stephen. 1996. Spoilage pattern of five species of Australian prawns: Deterioration is influenced by environment of capture and mode of storage. Journal of Aquatic Food Product Technology. 5:25
- Chiou, T., J. Huang. 2003. Chemical constituents in the abdominal muscle of cultured mud crab *Scylla serrata* in relation to seasonal variation and maturation. Fish. Sci. 69: 597-604.
- Civera, R., J. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture. 77: 145-156.
- CONAPESCA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. Mazatlán, México. 305 p.
- Connell, J.J., J.M. Shewan. 1980. Past, present and future of fish science, 56-65 pp. In: Connell, J.J (Ed.), Advances in fish science and technology. Fishing News Book. Farnham, urrey, U.K.
- Contreras-Guzman, E. 2002. Bioquímica de Pescados e Invertebrados. CECTA USACH (Ed.), Santiago, Chile.
- Cromarty, S.I., J. Mello, G. Kass-Simon. 2000. Molt-Related and Size-Dependent Differences in the Escape Response and Post-Threat Behavior of the American Lobster, *Homarus americanus*. Bio Bull. 199: 265-277.
- Cruz-Ricque, L.E., J. Guillaume, G. Cuzon. 1987. Squid Protein effect on growth of four penaeid shrimp. J. World Aquacult. Soc. 18: (4). 209-217
- D´Abramo, L.R. 1997. Triacylglycerols and fatty acids. En: D´Abramo, L.R., D.E. Conklin, D.M. Akiyama. (Eds.) Crustacean nutrition: advances in world aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 6: 71-84.

- Davis, K.B. 2004. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) Comp. Biochem. Physiol. 139:433–440.
- De Vido De Mattio, N., M.E., Paredi, M. Crupkin. 1992. Postmortem changes in glycogen, ATP, hypoxanthine and 260/250 absorbance ratio in extract of adductor muscle from *Aulacomya ater ater* (Molina) at different biological conditions. Comp. Biochem. Physiol. 103: 605.
- De Vido De Mattio, N., M.E., Paredi, M. Crupkin. 2001. Influence of the gonadal cycle and food availability on postmortem change in glycogen, ATP, hypoxanthine and 260/250 absorbance ration in adductor muscle from scallop *Aequipecten tehuelchus* (Dórbigny, 1846). J. Shellfish Res. 20:111.
- Deng, J.C. 1978. Effect of iced storage on free fatty acid production and lipids oxidation mullet muscle, J. Food Sci. 43: 337.
- Diouf, B., P. Rioux. 1999. Use of the rigor mortis process as a tool for better understanding of skeletal muscle physiology: Effect of the ante-mortem stress on the progression of rigor mortis in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). American Biology Teacher. 61:376-79.
- Delbarre-Ladrat, C., R. Cheret, R. Taylor, V. Verrez-Bagnis. 2006. Trends in post-mortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of myofibrillar structure. Critica Reviews in Food Science and Nutrition 46:409-21.
- Dehn, P.F., K. Haya, D.E. Aike. 1985. Adenylate energy charge, arginine phosphate and atpase activity in juvenile *Homarus americanus* during the molt cycle. Comp Biochem Phys B. 81: 629-633.
- Delbarre-Ladrat, C., R. Cheret, R. Taylor, V. Verrez-Bagnis. 2006. Trends in post-mortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of myofibrillar structure. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46:409-21.
- Díaz-Tenorio, L.M. 2006. Cambios post-mortem en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) y el efecto de procesos post-cosecha

- en su textura. Baja California Sur. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.
- Dingle, J.R., J.A. Hines, I. Fraser. 1968. Post-mortem degradation of adenine nucleotides in muscle of the lobster, *Homarus americanus*. J. Fd Sci. 33: 100-103.
- Dragoev, S.T., D. Kiosev, S.T. Danshev, N. Iontcheva, N. Genov. 1998. Study on the peroxidative processes in frozen fish. Bul. J. Agric. Sci. 3 (4) 55-65.
- Drazen, J.C., C.F. Phleger, M.A. Guest, P.D. Nichols. 2009. Lipid composition and diet inferences in abyssal macrourids of the eastern North Pacific. Mar Ecol Prog Ser. 387:1-14
- Ehira, S., K. Saito, H. Uchyama. 1986. Accuracy of measuring K value, an index for estimating freshness offish by freshness testing paper. Bull. Tokai Reg. Fish. Lab. 120: 73-82.
- Ellington, W.R. 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. Journal of Experimental Zoology. 228:431-44.
- England, W.R., J. Baldwin. 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): Role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. Physiol. Zool. 56: 614-622.
- Escarria, S., C. Reyes, D. Rohan. 1989. Estudio bioquímico de la escalopa *Argopecten circularis*. Ciencias Marinas, vol. 15, no. 1, p.63-72.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura- 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 209 p.
- Fenucci, J.L. 2007. Harina de pescado. Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos, 18-40.
- Fletcher, G.C., J.A. Statham. 1988. Shell-life of Sterile Yellow Eyed Mullet (*Aldrichetta forsteri*) at 4°C. J. Food Sci. 53: (5) 1033.
- Fraser, D.I, W.J. Dyer, H.M. Weinstein, J.R. Dingle, J.A. Hines. 1966. Glycolytic metabolites and their distribution at death in the white and red muscle of cod following various degrees of antemortem muscular activity. Canadian Journal of Biochemistry 44:1015_33.

- Fraga, I., J. Galindo, R. Reyes, J.S. Álvarez, N. Gallardo, A. Forrellat y R. González. 1996. Evaluación de diferentes fuentes proteicas para la alimentación del camarón blanco. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 20: (1). 6-9.
- Fraga, I., J. Galindo, B. Jaime. 2010. Evaluación de niveles de inclusión de harina de cangrejo rojo de tierra (*Gecarcinus ruricola*) en la dieta de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 31(1): 53-60.
- Fujii, T., M. Hirayama, M. Okuzumi, H. Nishino, M. Yokohama. 1989. Shelf life studies of fresh sardine packaged with carbon dioxide-nitrogen gas mixture. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55:1971.
- Gäde, G. 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the Crayfish, *Orconectes limosus*. *Comp Biochem Physiol A.* 77: 495-502.
- Gama-Ortiz, A. L. 2013. Aprovechamiento de subproductos de almeja y calamar en la elaboración de ensilados biológicos y su uso en la dieta de camarón. Baja California Sur. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 50p.
- Gandotra, R., M. Koul, S.Gupta, S. Sharma. 2012. Change in proximate composition and microbial count by low temperature preservation in fish muscles of labeo rohita. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Science.* 2(1): 13-17
- García-Galano, T., H. Villarreal-Colmenares, J.L. Fenucci. 2007. Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Subprograma II "Acuicultura" red temática II.C Proyecto II-8. Pp 264. Mar del Plata, Argentina. ISBN: 978- 987-1371-02-0.
- González-Félix M.L., D.M. Gatlin, A.L. Lawrence, M. Perez-Velazquez. (2002) Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33: 330-340.
- Gornik, S.G., A. Albalat, R.J.A. Atkinson, G.H. Coombs, D.M. Neil. 2008. The time course of early post-mortem biochemical processes in the abdominal muscle of a commercially important decapod crustacean (*Nephrops*

- norvegicus*): Implications for post-catch processing. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41:241-56.
- Gornik, S.G., A. Albalat, R.J.A Atkinson, G.H. Coombs, D.M. Neil. 2010. The influence of defined ante-mortem stressors on the early post-mortem biochemical processes in the abdominal muscle of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758), *Marine Biology Research*. 6 :(3), 223-238.
- Guillaume, S., E. McLean, P. Rush-Battle, H. Michael, S. Schwarz, R. Craig. 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*. 298: 294–299.
- Haard, N.F. 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured Fish. *Food research international*. 25: 289-307.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*: 721-724.
- Hayashi, T., K. Yamaguchi, S. Konosu. 1981. Sensory analysis of taste-active components in the extract of boiled snow crab meat. *J Food Sci*. 46: 479-483.
- Hazel, J.R. 1979. Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. *Am. J. Physiol*. 236:91
- Hendricks, H.B. 1965. Influence of ante-mortem stress on meat palatability. *Journal of Animal Science* 24: 255-263.
- Heu, M.S, J.S. Kim, F. Shahidi. 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chem*. 82:235-242.
- Hervant, F., D. Garin, J. Mathieu, A. Freminet. 1999. L-Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxia recovery. *Journal of Experimental Biology*. 202:579-92.
- Hiltz, D.F., W.J, Dyer. 1973. Hexose monophosphate accumulation and related metabolic changes in unfrozen and thawed adductor muscle of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*). *J. Fish Res. Bd. Can.* 30:45.
- Hiltz, D.F., L.J. Bishop. 1975. Postmortem glycolytic and nucleotide degradative changes in muscle of the atlantic queen crab (*Chionoecetes opilio*) upon

- iced storage of unfrozen and of thawed meat, and upon cooking. *Comp Biochem Physiol B.* 52(4):453–458
- Hurtado, O.M.A., I.S. Racotta, R. Civera, L. Ibarra, M. Hernández-Rodríguez, E. Palacios. 2007. Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolarity and Na⁺ /K⁺ -ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integ. Physiol.* 147: 703-710.
- Hugnes, R. B., N. R. Jones. 1966. Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a content on flavor relations. *J. Sci. Food Agric.*, 17: 434-436
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper-348. <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E00htm>.
- Iwamoto, M., H. Yamanaka, S. Watabe, K. Hashimoto. 1987. Effect of storage temperature on *rigor mortis* and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. *J. FoodSci.* 5:6.
- Jentoft, S., A.H. Aastveit, P.A. Torjesen, Ø. Andersen. 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 141:353–358
- Kano, Y., T. Sonobe, T. Inagaki, M. Sudo, D. Poole. 2012. Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J Phys Fitness sports Med.* 1 (3): 505-512.
- Kennish, J.M., D.E. Kramer. 1987. A review of High-Pressure Liquid Chromatographic Methods for Measuring Nucleotides Degradation in Fish Muscle. In: Kramer, D.E., J.C. Liston (ed.). *Seafood quality Determination.* Elsevier Science Publisher B.V. Netherlands. 209-220 pp.
- Kjær, M.A., M. Todorčević, B.E. Torstensen, A. Vegusdal, B. Ruyter. 2008. Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon. *Lipids* 43: 813–827.

- Kontara, E., P. Coutteau, P. Sorgeloos. 1997. Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 158: 305-320.
- Koven, W., Y. Barr, S. Luzky, I. Ben-Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens, A. Tandler. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*. 193: 107–122.
- Kuninaka, A., M. kibi, K. Sakaguchi. 1964. History and development of flavor nucleotides. *Food Technol*. 18: 287.
- Kurshize, M., E. Okimasu, E. Inoue, K. Utsuna. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med*. 22: 27-38
- Ladikos, D., V. Lougovois. 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem*. 35:295.
- Latscha, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. In *Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti (French Polynesia)*, 20 Feb-4 Mar 1989.
- Lee Y.B., G.L. Hargus, E.C. Hagberg, R.H. Forsythe. 1976. Effect of ante-mortem environmental temperatures on post-mortem glycolysis and tenderness in excised broiler breast muscle. *Journal of Food Science*. 42:1466.
- Léger, P., P. Sorgeloos. 1992. Optimized feeding regimens in shrimp hatcheries. In: Fast, A.W., L.J. Lester (ed.). *Marine Shrimp Culture: Principle and practices*. Elsevier Publishers, NY, USA. 225-244.
- Leonardi, M., A.M.Sandino, A. Klempau. 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 23: 52–59.
- Lewis, P.K, L.Y. Rakes, C.J Brown, M.C. Heck. 1981. Interaction between ante-mortem stress sampling time and pH found in certain pork muscle characteristics. *Journal of Food Science* 46:1315-1319.

- Lim, C., H. Ako, C.L. Brown, K. Hahn. 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vanamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture*. 151:143-153.
- Llanes, J., J. Toledo, L. Savón, O. Gutiérrez. 2011. Evaluación nutricional de ensilajes de residuos pesqueros para la alimentación de tilapias rojas (*Oreochromis mossambicus* y *O. niloticus*). *Rev. Cubana de Investigaciones Pesqueras*. 28:10
- Losada, V., A. Rodríguez, J. Ortíz, J. Aubourg. 2006. Quality enhancement of canned sardine (*Sardina pilchardus*) by a preliminary slurry ice chilling treatment. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 598-605.
- Loung, J.H., K.B. Male, M.D. Huynh. 1991. Applications of polarography of assessment of fish freshness. *J. Food Sci.* 56: 335.
- Love, R.M. 1975. Variability of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of fish. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 23-33.
- Lowe, T.E., J.M. Ryder, J.F. Carragher, R.M.G. Wells. 1993. Flesh quality in snapper *Pagrus auratus* affected by capture stress. *Journal of Food Science* 58:770-773.
- Lunger, A.N., S.R. Craig, E. McLean. 2006. Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture*. 257, 393–399.
- Martínez-Contreras, T.M. 2009. Evaluación del crecimiento de juveniles del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados con desechos del procesado del calamar. Colima. Tesis de maestría. Universidad de Colima. México. 59p.
- Martínez-Vega, J.A. 1997. Procesamiento y utilización de diferentes partes del cuerpo de calamar gigante *Dosidicus gigas* en forma de harina como factor de crecimiento en dietas de crecimiento para *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. 71p.

- Matsumoto, M., H. Yamanaka. 1990. Postmortem Biochemical Change in the muscle kuruma Prawn during Storage and Evaluation of the Freshness. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1145.
- Mendes, R., R. Quinta, M.L. Nunes. 2001. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *European Food Research and Technology*. 212:141-146.
- Mercier, L., E. Palacios, A. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera, I.S Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. 258: 633-640.
- Mercier, L., I.S Racotta, G. Yepiz-Placencia, A. Muhlia-Almazan, R. Civera, M. Quiñones-Arreola, M. Wille, P. Sorgeloos, E. Palacios. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*. 40: 1849-1863.
- Meyers, S. P., T. Latscha. 1997. Carotenoids. In advances in world aquaculture. Vol 6. Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society.
- Millamena, O.M., R.F. bombeo, N.A. Jumalon, K.L. Simpson. 1988. Effects of various diets on the nutritional value of *Artemia sp.* As food for the prawn *Penaeus monodon*. *Mar. Biol.* 98: 217-221.
- Moal, J., J.R. Le Coz, J.F. Samain, J.Y. Daniel. 1989. Nucleotides in bivalves: Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 93: 307-316.
- Morris, S., A.M. Adamczewska. 2002. Utilization of glycogen ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs *Gecarcoidea natalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 133:813-25.
- Murata, M., M. Sakaguchi. 1989. The effects of phosphatase treatment of yellowtail muscle extracts and subsequent addition of IMP on flavor intensity. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55: (9) 1599-1603.

- Newman, S.G. 2000. Management and prevention of stress in aquaculture with a focus on farmed shrimp. Fourth Latin American Aquaculture Congress and Seafood Trade Show, Oct 25-28, [Http://www.aqua-in-tech.com/papers.html](http://www.aqua-in-tech.com/papers.html).
- Nazemroaya, S., M.A. Sahari, M. Rezaei. 2009. Effect of frozen storage on fatty acid composition and changes in lipid content of *Scomberomorus commersoni* and *Carcharhinus dussumieri*. *J.Appl. Ichthyol.* 25: 91-95.
- Nazir, D.J., N.G. Magar. 1963. Biochemical changes in fish muscle during *rigor mortis*. *J. Food Sci.* 28, 1-7.
- Nga, B.T., M. Lürling, E.T. Peeters, R. Roijackers, M. Scheffer, T.T. Nghia. 2005. Chemical and physical effects of crowding on growth and survival of *Penaeus monodon* post-larvae. *Aquaculture* 246: 455– 465.
- Obatake, A., T. Doi, T.Ono. 1988. Post-mortem change in inosine monophosphate concentration and related enzyme activity in the dark muscle fish. *Bull Jap. Soc. Sci. Fisheries.* 54: 283.
- Okuma, H., H. Takahashi, S. Yazawa, S. Sekimukai. 1992. Development a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness. *Anal.Chim. Acta*, 93.
- Onnen, T., E. Zebe. 1983. Energy metabolism in the tail muscles of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. *Comp Biochem Physiol A.* 74: 833-838.
- Østbye, T.K., M.A. Kjær, A.M.B Rørå, B. Torstensen, B. Ruyter. 2009. High n-3 HUFA levels in the diet of Atlantic salmon affect muscle and mitochondrial membrane lipids and their susceptibility to oxidative stress. *Aquacult Nutr.*
- Palacios, E., A. Bonilla, A. Pérez, I.S. Racotta, R. Civera. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 24: 201-215.
- Palma-Cruz, C.Y. 2015. Calidad alimentaria del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en función de la dieta y del sistema de enfriamiento

- durante la cosecha. Baja California Sur. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 109p.
- Pascual, C., A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13-28.
- Pascual, C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. Rosas. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637- 650.
- Paterson, B.D. 1993. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus* *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 106:395-400.
- Pazos, M., J.M. Gallardo, J.L. Torres, I. Medina. 2005. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* 92: 547-557.
- Perazzolo, M.L., R. Gargioni, P. Ogliari, A.M. Barroco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Pérez-Rostro, C., I.S. Racotta, A.M. Ibarra. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302: 189-200.
- Pickerin, A.D. (1993) Growth and stress in fish production. *Aquaculture*. 111, 51-63.
- Racotta, I.S., E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 351-356.

- Racotta I.S., R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 125: 437-443.
- Racotta, I.S., E. Palacios, A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, F. Arcos, O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar Biol*. 153:1245-1256.
- Rana, K.J., S. Siriwardena, M.R. Hasan. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. In: *FAO fisheries and aquaculture technical paper*, Vol. 541. Rome: FAO.
- Randall, M. 2011. The physiology of stress: Cortisol and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Dartmouth Undergraduate Journal of Science*, Retrieved from <http://dujs.dartmouth.edu/fall-2010/the-physiology-of-stress-cortisol-and-the-hypothalamic-pituitary-adrenal-axis>.
- Rees, J.F., K. Curé, S. Piyatiratitivorakul, P. Sorgeloos, P. Menasveta. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*. 122: 193-207.
- Reyes-Becerra, A. 2011. Uso de una harina de subproductos de almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) como fuente de proteína en alimentos para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Ridgway, I.D., A.C. Taylor, R.J.A. Atkinson, E.S. Chang, D.M. Neil. 2006. Impact of capture method and trawl duration on the health status of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339:135-147.
- Robergs, R. A., F. Ghiasvand, D. Parker. 2004. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: 502–516.

- Robles-Romo, A., O. Arjona, I.S Racotta. 2014. Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. Arch. Biol. Sci. 66(2): 651-666.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G Taboada, L. Arena, A. Van Wormhoudt. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268: 47-7
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. J. Agri. Food Chem. 33: 678.
- Ryder, J., G. Fletcher, M. Stec, R. Seelye. 1993. Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. Int. J. Food Sci. Tech. 18: 169-180.
- Sagedhal, A., J.P. Busalmen, H.A. Roldan, M.E. Paredi, M. Crupkin. 2008. Post-Mortem Changes in Adenosine Triphosphate and Related Compounds in Mantle of Squid (*Illex argentinus*) at Different Stages of Sexual Maturation. Journal of Aquatic Food Product Technology. 6: (4) 43-56.
- Saito, T., K. Arai, M. Matsuyoshi. 1959. A new method for estimating the freshness offish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 24: 749-50.
- Salonen, R.M., K. Nyssönen, J. Kaikkonen, E. Porkkala-Sarataho, S. Voutilainen, T.H. Rissane. 2003. Effect of Combined Vitamin C and E Supplementation on Atherosclerotic Progression: The Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. Circulation. 107(7):947-53.
- Sargent, J.R., D.R. Tocher, J.G. Bell. 2002. The lipids. In: Fish Nutrition. Third edition, Halver, J. E. and Hardy, R.W. (eds). San Diego: Academic Press, 181-257.
- Sealey, W.M., R. W. Hardy. 2011. Evaluation of 100% fish meal substitution with chicken concentrate, protein poultry by-product blend, and chicken and egg concentrate on growth and disease resistance of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society. 42(1): 46 – 55.

- Sakaguchi, M., K. Yamashita, L. Murata. 1990. The accumulation of AMP and IMP in the adductor muscles of oyster during ice storage. In: Chilling and Freezing a New Fish Products. I.I.F-I.I.R Commission C2. Alberdeen, U.
- Shaidi, f., J.R. Botta. 1994. Seafoods: chemistry, processing technology and quality. London, blackie Academic.
- Shirai, T., N. Kikuchi, S. Matsuo, S. Uchida, H. Inada, T. Suzuki, T. Hirano. 1997. Taste components of Boreo Pacific Gonate Squid *Gonatopsis borealis*. Fisheries Sci. 63: 772-778.
- Siddiqui Z.A., I. Mahmood. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes. A Review. Bioresource Technology. 69: 167-179.
- Sirof, V., M. Oseredczuk, N. Aouachria, J.L. Volatier, J.C. Leblanc. 2008. Lipid and fatty acid composition of fish and seafood consumed in France: CALIPSO study. J Food Compos Anal 21:8-16.
- Scheffler, T.L., D.E. Gerrard. 2007. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling post-mortem energy metabolism. Meat Science 77:7-16.
- Shimada, R., H. Ushio, H. Yamanaka. 2000. Initial changes in ATP equivalents in the post-mortem muscles of three species of lobster. Fisheries Science 66:755-760.
- Sidhu, G.S., W.A.Montgomery, M.A. Brown. 1974. Post-mortem changes and spoilage in Rock lobster muscle. Journal of Food Technology 9:357-363.
- Sigholt, T., U. Erikson, T. Rustad, S. Johansen, T. Nordtvedt, A. Seland. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Food Science. 62:898-905.
- Sikorski, Z.E., A. Karlakowska, J.R. Burt. 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. Chapter 4 En: Sikorski ZE, editor. Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 55-75p.
- Stansby, M.E A.S. Hall. 1967. Chemical composition of commercially important fish of the USA. Fish Ind. Res. 3:29.

- Stroud, G.D., J.C. Early, G.L. Smith. 1982. Chemical and sensory changes in iced *Nephrops norvegicus* as indices of spoilage. *International Journal of Food Science & Technology* 17:541.
- Surette, M., E. Gill, T.A. Le Blanc. 1988. Biochemical basis of post-mortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *J. Agric. Food Chem.* 36:19.
- Tacon, A., M. Hasan. 2007. Global Synthesis of feeds and nutrients for sustainable aquaculture development. En: Hasan, M., T. Hecht, S. De Silva, A. Tacon (Eds.), *Study and analysis of feeds and fertilizers for sustainable aquaculture development* (pp. 3-17). FAO. Fisheries Paper. No. 497. Roma.
- Tanaka, Y., T. Katayama, K.L. Simpson, C.O. Chichester. 1976. The carotenoids in marine red fish and the metabolism of the carotenoids in Sea Bream, *Chrysophrys major*. Temminch and Schegel. *Bull. Jpn. Soc Sci. Fish.* 42:1177-1182.
- Tarr, HL. 1996. Post-mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates and sugar in fish muscle. *J. Food Sci.* 31:864.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin. 1991. Seasonal variations in *Palaemon serratus* abdominal muscle metabolism and performance during exercise, as studied by ³¹P-NMR. *Mar Ecol Prog Ser.* 74: 175-183.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin, R. Pichon, A. Smine. 1994. P-³¹ NMR studies of the metabolic changes in the prawns *Palaemon serratus* and *P. elegans* during exercise. *Mar Ecol Prog Ser.* 111: 73:78.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin, R. Pichon. 1997. The effect of the stimulation regime on *Palaemon serratus* tail muscle energy metabolism. *Comp Biochem Physiol A.* 116: 337-340.
- Todorčević, M., M.A. Kjær, N. Djaković, A. Vegusdal, B.E. Torstensen, B. Ruyter. 2009. N-3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 152: 135–143.

- Viant, M.R., E.S. Rosenblum, R.S. Tjeerdema. 2001. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 765:107-11.
- Villalta, M., A. Estévez, M.P. Bransden, J.G. Bell. 2005. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture*. 249: 353-365
- Villareal, H., A. Hernández-Llamas, M.C. Rivera, A. Millán, S. Rocha. 2004. Effect of substitution of shrimp meal, fish meal and soy meal with red crab *Pleuroncudes planiples* (Stmpson) meal in pelleted diets for postlarvae and juvenile *Farfantepenaeus californiensis* (Colmes). *Aquaculture.Res.* 35: 178–183.
- Watanabe, H., H. Yamanaka, H. Yamanawa.1993. Changes in the content of extractive components in disk abalone fed with marine algae and starved. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 59: 2031-2036.
- Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.
- Wine, J.J., F.B. Krasne. 1972. The organization of escape behavior in the crayfish. *J Exp Biol.* 56:1-18.
- Woodall, A.A., S.W.M. Lee, R.J Weesie, M.J. Jackson, G. Britton. 1997. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochem. Biophys. Acta* 1336: 33–42.
- Wouters, R., L. Gómez, P. Lavens, J. Calderón. 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *J. Shellfish Res.* 18: 651-656.
- Xu, X.J., W.L. Ji, J.D. Castell, R.K. O'Dor. 1994. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture*. 127:29-40.
- Yamaguchi, S., T. Yoshikawa, S. Ikeda, T. Ninomiya. 1971. Measurement of the relative taste intensity of some L- α amino acids and 5' nucleotides. *J. Food Sci.* 36: 846-849.
- Yokohama, Y., M. Sakaguchi, F. Kawai, M. Kanamori. 1994. Chemical indices for assessing freshness of shellfish during storage. *Fisheries Sci.* 60: 329.

- Yu, X., X. Zhang, P. Zhang, C. Yu. 2009. Critical swimming speed, tail-flip speed and physiological response to exercise fatigue in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A*. 153:120-124.
- Zhou, D., X. Chang, S. Bao, L. Song, B. Zhu, X. Dong. 2014. Purification and partial characterisation of a cathepsin L-like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall. *Food Chemistry*. 158(1): 192-199.