



**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.**

*Programa de Estudios de Posgrado*

Valoración de la calidad de un extracto desgrasado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*), sometido a diferentes métodos de conservación, como aditivo en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*.

**T E S I S**

*Que para obtener el grado de*

**Maestro en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**Erika Torres Ochoa**

La Paz, B.C.S. Agosto de 2007

***“Sólo hay un bien, el conocimiento;  
Sólo hay un mal, la ignorancia”  
Si piensas que la cultura es cara,  
Pregúntate cuánto cuesta la ignorancia.  
Sócrates***

## DEDICATORIA

A mi padre, por que él es .responsable que haya llegado hasta donde estoy, siempre ha creído en mí, me ha hecho ver mis errores y aún así me ayuda y apoya.

A ti, que estas por venir...

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al CONACYT por la beca de maestría otorgada (No. 19486). La presente investigación se llevó a cabo con el apoyo económico de los proyectos SAGARPA 2003-C01-33 y AC1.15 del CIBNOR. Se agradece al Dr. Eliseo Alcántara de la empresa Malta-cleyton de México por el suministro de alimentos y el interés mostrado por el proyecto, y al B. M. Gustavo Pineda de la granja Organic Shrimp, B. C. S. por facilitar los camarones utilizados en el bioensayo de crecimiento. De manera especial, se agradece al Dr. Eduardo Balart y a su equipo de trabajo por haber capturado y proporcionado la materia prima, la langostilla, sin la cual no habría sido posible realizar este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Roberto Civera y mis co-directores Dr. Héctor Nolasco y Dr. Dariel Tovar, sus consejos y llamadas de atención fueron fundamentales para llevar a cabo la finalización de este trabajo.

Agradezco mucho el apoyo y la ayuda de mis compañeros del laboratorio de Nutrición, en especial a Ranfery Gutiérrez, por todos los consejos y la ayuda proporcionada. De ese maravilloso grupo quiero también agradecer a Ernesto Goytortúa, por el apoyo en las formulaciones de los alimentos y a mis compañeros, que aunque nos vimos poco, los momentos que nos relajamos fueron fundamentales para este trabajo: Margarita, Liliana, Ana Luisa, Marissa, Martín Terrazas, Armando y Alfonso Galicia.

Cada persona tiene un lugar y un tiempo en tu vida, quiero agradecer especialmente a una persona que compartió su lugar y su tiempo con migo durante la mayor parte de este recorrido. Con esta persona aprendí a saber lo que no quiero y me apoyó siempre, hasta que nuestro lugar y tiempo llegó a su fin: Christian Javier Vázquez Reyes, gracias por todo tu apoyo y dedicación.

A mis amigos y compañeros de generación Alfonso Dávila y Claudia Villicaña, los cuales, además de su compañerismo como generación, me apoyaron y fueron mis compañeros de batalla.

Agradezco a todo el personal técnico que me ayudó de una u otra manera en este trabajo: Francisco Hernández, doblemente agradecida por su buen humor y su amistad además de la ayuda técnica que me brindaste (del laboratorio de pigmentos); Norma Ochoa, Sofi y Rox (del laboratorio de diagnóstico microbiológico); Patricia Hinojosa (del laboratorio de fisiología comparada); Roberto Hernández (bioquímica fisiológica); Laura Carreón (biotecnología de microalgas). Quiero agradecer a Arturo Sierra por el préstamo de la centrífuga y a Hever por habernos dejado utilizar su laboratorio el día de la obtención del extracto. Así mismo, también agradecer a Horacio del centro de cómputo y al personal de la biblioteca del CIBNOR. También, no puedo olvidar a los compañeros de vigilancia que sin su ayuda no hubiera podido ir a realizar los experimentos que me tocaban a deshoras, el hecho de que ellos me fueran a abrir, era básico para poder realizar mis experimentos; muchas gracias a todos ustedes, son parte básica para la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a las personas de la UABCS que estuvieron al pendiente de mi trabajo y que me apoyaron de una forma o de otra: Mamy, Aurora Rebolledo, Eleonora Romero, Leonardo Álvarez; Emelio Barjau y a mis alumnos y amigos, los cuales siempre estuvieron ahí al pendiente desde el principio y hasta el fin de este trabajo.

A mis padres, ellos son el motor de todo ese entusiasmo para hacer bien las cosas. Gracias por todo.

Finalmente, quiero agradecer a la vida por darme la oportunidad de equivocarme y darme sorpresas; sé que me seguiré equivocando y además me tiene preparadas muchas más.

Gracias por todo.

## RESUMEN

Estudios previos sobre la utilización de extractos de langostilla roja *Pleuroncodes planipes* como aditivos funcionales en alimentos para camarón han reportado que los extractos mejoran la calidad de los alimentos, debido a su capacidad fagoestimulante y de promover el crecimiento de los camarones. Sin embargo, por su alto contenido de agua y presencia de enzimas digestivas, los extractos son productos de fácil degradación, por lo que es necesario evaluar diferentes métodos de conservación que permitan preservar su calidad. Para ello, se realizaron dos experimentos. En el primer experimento, se elaboró en el laboratorio un extracto desgrasado de langostilla que fue sometido a diversos métodos de conservación: congelado, tratamiento térmico, y acidificado a 4°C y 27 °C, y posteriormente se almacenó durante 12 semanas. En el segundo experimento, los extractos obtenidos fueron evaluados como aditivos en alimentos para camarón. Experimento 1. A lo largo del almacenamiento se determinaron: pH, composición proximal, carotenos totales, proteínas solubles, actividad específica de enzimas digestivas, bacterias, hongos y levaduras totales, así como bacterias marinas presentes en los extractos. Se observó que al eliminar la fase oleosa del extracto completo de langostilla, el porcentaje de proteína cruda aumentó de 36.8 a 53.5%, y el contenido de carotenos totales disminuyó de 1.03 a 0.09 mg/mL. El extracto más afectado fue el acidificado almacenado a 27°C, el cual tuvo 46.7% de proteína cruda en la semana 12, mientras que el resto de los tratamientos se mantuvo alrededor de 50% durante todo el almacenamiento. Al inicio del estudio, el tratamiento que mostró la mayor concentración de proteína soluble fue el congelado (5.69 mg/mL) y el de menor concentración fue el tratamiento térmico (4.29 mg/mL). Todos los extractos sufrieron pérdida de proteína soluble a partir de la sexta semana de almacenamiento. Se detectó crecimiento moderado de microorganismos en todos los tratamientos. En el extracto tratado térmicamente se detectó alta actividad de proteasas y también una presencia importante de carga microbiana a partir de la sexta semana de almacenamiento. El extracto congelado mostró mayor cantidad de bacterias de origen marino que los demás tratamientos, pero ningún extracto rebasó los límites establecidos en la NOM-021-PESC-1994 para ingredientes y alimentos usados en acuicultura. De acuerdo a los resultados, se concluye que la vida de anaquel de los extractos de langostilla es de aproximadamente seis semanas de almacenamiento, y que el método de congelación es el que preserva mejor las propiedades del extracto. Experimento 2. Para evaluar la calidad de los extractos

como aditivos alimentarios, se realizó un bioensayo de crecimiento con juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (peso inicial de 0.4 g) durante 41 días. Se evaluaron 5 dietas: una dieta control, y cuatro que contenían 1% de cada uno de los extractos sometidos a los métodos de conservación y almacenados por 12 semanas. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos alimenticios a nivel de la supervivencia, el alimento consumido, el peso, la tasa de crecimiento, el factor de conversión alimenticia y la eficiencia proteica. Los cambios sufridos por los extractos durante las 12 semanas de almacenamiento con los diferentes métodos de conservación, aparentemente atenuaron su capacidad de funcionar como fagoestimulantes y de promover el crecimiento del camarón. Se sugiere utilizar los extractos de langostilla a niveles de inclusión más elevados en el alimento, y probar su calidad nutricia a la sexta semana de almacenamiento.

**Palabras clave:** *Pleuroncodes planipes*, extractos, métodos de conservación, aditivos alimentarios, *Litopenaeus vannamei*.

## ABSTRACT

Previous studies on the use of red crab (*Pleuroncodes planipes*) extracts as additives in shrimp feeds have shown that the extracts improve the quality of the diet by its effect on phagostimulation and its capacity to promote shrimp growth. Nevertheless, the high water content and presence of digestive enzymes in the extracts, makes them highly unstable and easy to decompose, hence it is necessary to evaluate different conservation methods to preserve their quality. For this purpose, two experiments were conducted. In the first experiment, a defatted red crab extract was produced in the laboratory, and was subjected to four preservation methods: frozen, thermal treatment, and acidification at 4°C and 27 °C, hence stored during 12 weeks. In the second experiment, the extracts were evaluated as feed additives in shrimp diets. Experiment 1. During this trial several parameters were determined: pH, proximate composition, total carotenoids, soluble proteins, specific enzymatic activity, bacteria, fungus, total yeast and marine bacteria present in the extracts. It was observed that at the moment of extracting the fat from a red crab crude extract, the crude protein content increased from 36.8 to 53.5%, and the total carotenoids content decreased from 1.03 to 0.09 mg/mL. The most affected extract was the one acidified and stored at 27°C, with a crude protein content of 46.7% after 12 weeks of storage, while the other extracts maintained their protein content at approximately 50% during all the storage period. At the beginning of the trial, the treatment showing the highest soluble protein concentration was the freeze extract (5.69 mg/mL), and the lowest concentration was found in the thermally treated extract (4.29 mg/mL). All the extracts lost soluble protein from the sixth week of storage. Moderate microbial growth was observed in all treatments. In the thermally treated extract, high protease activity was detected as well as microbial growth from the sixth week of storage. The freeze extract showed the highest growth of marine bacteria, but none of the extracts exceed the limits established in the NOM-021-PESC-1994 for feedstuffs and diets. According to the results, it is concluded that the shelf-life of the defatted red crab extracts is approximately six weeks. The freeze method appears to be the most adequate to preserve the properties of the extract. Experiment 2. To evaluate the nutritional quality of the extracts after 12 weeks of storage, a growth trial was conducted with juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial weight 0.4 g) during 41 days. Five diets were evaluated: a control diet and 4 diets containing 1% of each of the extracts obtained by the preservation methods. No significant differences were detected among

treatments, in terms of survival, feed intake, weight, growth rate, feed conversion ratio, and protein efficiency. The changes occurred in the extracts during the 12 weeks of storage with the different preservation methods, apparently reduced their capacity to function as phagostimulants and to promote growth in shrimp. It is suggested to use the extracts at higher inclusion levels in the diet, and to evaluate its nutritional value after sixth week of storage.

**Key words:** *Pleuroncodes planipes*, extracts, preservation methods, feed additives, *Litopenaeus vannamei*.

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abstract	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Características de la langostilla	4
2.2 Composición química de la langostilla	4
2.3 Utilización de la langostilla como ingrediente y aditivo en acuicultura	4
2.4 Alimentos funcionales en acuicultura	6
2.5 Principales tipos de deterioro en los alimentos	7
a) Cambios químicos	7
b) Cambios físicos y/o fisicoquímicos	8
c) Cambios microbiológicos	8
2.6 Métodos de conservación	8
a) Métodos físicos	8
a.1) Deshidratación	8
a.2) Tratamiento térmico	9
b) Métodos químicos	9
2.7 Vida de anaquel	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4 HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
General	
Particulares	
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Obtención de la langostilla	15
6.2 Obtención del extracto de langostilla	15
6.3 Caracterización de los extractos de langostilla	17
6.3.1 Análisis químico proximal	18
6.3.2 Medición de pH	18
6.3.3 Carotenos totales	18
6.3.4 Proteína soluble	18

6.3.5 Actividad enzimática	18
a) Actividad amilolítica	19
b) Actividad lipolítica	19
c) Actividad proteolítica	20
6.3.6 Análisis microbiológicos	20
a) Coliformes fecales	20
b) Bacterias, hongos y levaduras totales	21
c) Bacterias marinas	21
6.4 Conservación del extracto desgrasado de langostilla por diferentes métodos y determinación de su vida de anaquel	22
6.4.1 Métodos de conservación	22
a) Congelado	22
b) Acidificado a dos temperaturas: 4 °C y 27 °C	23
c) Tratamiento térmico	23
6.4.2 Vida de anaquel	25
6.4.3 Análisis estadísticos	25
6.5 Inclusión de extractos de langostilla, obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> . Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento	26
6.5.1 Formulación de los alimentos	26
6.5.2 Fabricación de los alimentos experimentales	26
6.5.3 Estabilidad del alimento en el agua	28
6.5.4 Composición proximal de los alimentos	28
6.5.5 Sistema experimental de cultivo para el bioensayo de crecimiento	28
6.6 Bioensayo de crecimiento	30
6.6.1 Organismos experimentales	30
6.6.2 Condiciones de cultivo y monitoreo periódico	31
6.6.3 Criterios de evaluación	31
6.6.4 Análisis estadísticos	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Conservación del extracto soluble de langostilla por diferentes métodos, y determinación de su vida de anaquel	33
7.1.1 Obtención del extracto de langostilla	33
7.1.2 Caracterización de los extractos de langostilla	34
7.1.3 Vida de anaquel	35
Análisis químico proximal	35

Evaluación de pH	37
Carotenos totales	38
Concentración de proteínas solubles	38
Actividad enzimática	39
Actividad específica de amilasa	39
Actividad específica de lipasa	40
Actividad específica de proteasa	41
Análisis microbiológico	41
7.2 Inclusión de extractos de langostilla, obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> . Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento	43
7.2.1 Criterios de evaluación	43
8. DISCUSIÓN	51
8.1 Evaluación del extracto desgrasado de langostilla conservado con diferentes métodos	51
8.2 Inclusión de extractos de langostilla obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para el camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> . Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento	63
9. CONCLUSIONES	67
10. RECOMENDACIONES	69
11. LITERATURA CITADA	70
12. ANEXOS	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Actividades principales detectadas en el extracto de langostilla (ETL) y vías sugeridas que pueden propiciar efectos positivos en la fisiología y salud del camarón (Vega-Villasante y colaboradores, 2004)	6
Figura 2	Prensado de langostilla	16
Figura 3	Prensa mecánica	16
Figura 4	Extracto completo de langostilla	16
Figura 5	Extracto centrifugado de langostilla (14,000 rpm, 15 minutos 4 °C).	16
Figura 6	Diagrama de flujo para la obtención del extracto de langostilla desgrasado por medio de prensado mecánico y centrifugación.	17
Figura 7	Diagrama de los métodos de conservación y condiciones de almacenamiento durante el estudio de vida de anaquel del extracto desgrasado de langostilla.	24
Figura 8	Sistema experimental para bioensayos de crecimiento	29
Figura 9	Supervivencia final (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	45
Figura 10	Peso promedio final (g) de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	46
Figura 11	Tasa de crecimiento final (%) de juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	47
Figura 12	Alimento aparentemente consumido (mg/org./día) por juveniles de <i>L. vannamei</i> alimentados durante 41 días con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	48
Figura 13	Factor de conversión alimenticia final de los alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	49
Figura 14	. Eficiencia proteica final de los alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	50

## INDICE DE TABLAS

Tabla I	Diseño experimental del estudio de vida de anaquel del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación.	25
Tabla II	Composición de los alimentos experimentales (g/100g de alimento) utilizados en el bioensayo de crecimiento con juveniles de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .	27
Tabla III	Masa y rendimiento porcentual de las fracciones de langostilla obtenidas por prensado mecánico y centrifugación.	33
Tabla IV	Composición química proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) de langostilla entera, extracto completo y desgrasado.	33
Tabla V	Valores de pH, carotenos totales, y proteínas solubles de los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación..	34
Tabla VI	Actividad específica (U/mL) de enzimas digestivas en los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación.	34
Tabla VII	Presencia de microorganismos en los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación.	35
Tabla VIII	Contenido de humedad del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	35
Tabla IX	Contenido de cenizas del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	36
Tabla X	Contenido de proteína cruda del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	36
Tabla XI	Contenido de extracto etéreo del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	37
Tabla XII	Contenido de extracto libre de nitrógeno del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	37

Tabla XIII	Valores de pH del extracto desgrasado de langostilla, sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento	38
Tabla XIV	Concentración de carotenos totales en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	38
Tabla XV	Concentración de proteínas solubles en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	39
Tabla XVI	Actividad específica de amilasa (U/mL de extracto $\pm$ desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	40
Tabla XVII	Actividad específica de lipasa (U/mL de extracto $\pm$ desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	40
Tabla XVIII	Actividad específica de proteasa (U/mL de extracto $\pm$ desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	41
Tabla XIX	Carga microbiana de hongos y levaduras en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.	43
Tabla XX	Composición química proximal (g/100 g de materia seca excepto humedad) e hidroestabilidad de los alimentos con inclusión de 1% de los extractos de langostilla utilizados en el bioensayo de crecimiento con juveniles <i>L. vannamei</i> .	42
Tabla XXI	Resultados zootécnicos al final del bioensayo de crecimiento con juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados con alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.	44

## 1. INTRODUCCIÓN

El atractivo mercado del camarón a nivel mundial ha provocado que México tenga interés en el cultivo de este crustáceo, y además de ser un alimento de origen marino, se ha convertido en la primera especie en valor a nivel nacional (FAO, 2000 y <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/>).

La Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) reportó que en el 2004 en México se produjeron 61 mil toneladas de camarón proveniente de la pesca en el mar y 61 mil toneladas provenientes de la acuicultura; cantidad que aumentó un 40% respecto al año anterior.

El desarrollo del cultivo de camarón en México ha permitido que aun cuando la actividad de captura va a la baja, hay un aumento de producción. Así mismo, la CONAPESCA en el 2005, destacó que el camarón mexicano cumple con los estándares de sanidad como la prevención de enfermedades en los cultivos; los cuales son superiores a los estadounidenses, situación que es reconocida por las propias autoridades de ese país.

Por otro lado, del cultivo de camarón, como en cualquier otra especie, depende en gran medida de una adecuada nutrición y manejo del alimento. De hecho, en los cultivos intensivos y semi-intensivos de camarón, la alimentación se basa en su mayoría en tablas para calcular las raciones diarias a partir de un porcentaje de biomasa y de peso promedio de los camarones presentes en el estanque (Molina *et al.*, 2000).

En los cultivos semi-intensivos e intensivos, la biomasa de cultivo es grande, de manera que no es fácil alimentar a los camarones con alimento vivo y se sustituye con alimento artificial. Por esta razón, el alimento balanceado representa un gasto alrededor del 50% de la producción total. El alimento artificial es un elemento de gran importancia dentro de los cultivos ya que de él depende la producción y rentabilidad de las empresas, en este caso específico, de las empresas de la industria camaronera (Díaz *et al.*, 2004).

Aunado a la situación antes mencionada, la calidad de un alimento artificial depende de su formulación, materias primas y tecnología. Así como del tiempo y condiciones de almacenamiento (Díaz *et al.*, 2004). Para lograr la calidad deseada en los alimentos formulados en la dieta para juveniles de camarón, se deben considerar los nutrimentos básicos: proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Tacon, 1989).

La base de la formulación de alimentos balanceados para camarón, es la fuente de proteína, nutriente que se obtiene principalmente de las harinas de pescado. Estas harinas contienen los aminoácidos esenciales para el desarrollo y crecimiento

del camarón. También se utilizan algunos aceites vegetales y de pescado, los cuales cubren la necesidad de ácidos grasos y fosfolípidos (Tacon, 1989).

Al momento de formular un alimento para organismos de cultivo, se deben buscar ingredientes de buena calidad que contengan los nutrientes esenciales para que los organismos lleven a cabo sus funciones biológicas y fisiológicas (Tacon, 1989). Sin embargo, no sólo la buena calidad de los ingredientes es importante, también el costo de éstos es un factor que limita su utilización. Por ejemplo, la harina de pescado, es un ingrediente muy bueno para los alimentos para camarón, este insumo contiene proteínas musculares de pescado, las cuales están constituidas por aminoácidos que son la base para la producción de proteína de los mismos camarones (Galleguis, 1994). Sin embargo, la calidad de la harina de pescado depende de la materia prima con la que está elaborada (Davis, *et al.*, 2004). Así mismo, el costo del insumo es muy alto, de manera que este problema invita a buscar nuevas alternativas que sustituyan este ingrediente tan importante para la fabricación de alimentos balanceados.

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) es un crustáceo decápodo bentónico de la familia Galatheidae, la cual habita en la costa Oeste de Norteamérica y la plataforma continental de las costas de Baja California (Auriolles –Gamboa, 1995). *P. planipes* es un recurso muy abundante en esta zona y poco explotado comercialmente (Vega-Villasante *et al.* 2002).

Se han realizado varias investigaciones sobre la calidad nutricional de la langostilla, para utilizarla en forma de harina como ingrediente en alimentos experimentales para camarón y se ha demostrado que la sustitución parcial de la harina de pescado con harina de langostilla puede mejorar el crecimiento, conversión alimenticia y eficiencia proteica (Civera *et al.*, 2000; Goytortúa-Bores *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2006).

De acuerdo con Vega-Villasante y colaboradores (2002), el extracto de langostilla posee compuestos que no pueden ser considerados nutrientes y que a su vez pueden ejercer efectos en el organismo de los camarones modificando así su estado fisiológico y constitución corporal. Se ha demostrado que el extracto liofilizado de langostilla ejerce efectos positivos sobre la velocidad de crecimiento, composición corporal y estado oxidativo, por mencionar algunos. Dichos efectos coinciden con las características descritas para los alimentos funcionales (Vega-Villasante *et al.*, 2004).

Gutiérrez-Leyva (2003) demostró que la inclusión de 1 a 3 % de un extracto liofilizado de langostilla en alimentos balanceados para camarón blanco del Pacífico, mejora el consumo del alimento y acelera el crecimiento de los organismos.

El poseer estas propiedades, hacen que el extracto de langostilla sea un buen candidato para ser utilizado como aditivo en alimentos para camarón. Hasta el momento el extracto se ha añadido liofilizado (Vega-Villasante, 2003), sin embargo, este método de conservación es de alto costo y dificultaría su aprovechamiento en la industria, por lo que se hace necesario evaluar diferentes métodos de conservación que permitan preservar las propiedades del extracto.

En este trabajo se aplicaron cuatro métodos de conservación a un extracto desgrasado de langostilla [congelación, tratamiento térmico y acidificación a dos temperaturas (4°C y 27°C)], a fin de determinar su vida de anaquel y evaluar su efecto al ser incluidos como aditivos en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Características generales de la langostilla**

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) es un crustáceo decápodo bentónico de la familia Galatheidae, el cual habita en la costa Oeste de Norteamérica y la plataforma continental de las costas de Baja California. Su abundancia estimada es de 735,000 toneladas métricas por año (Auriolles-Gamboa, 1995), por lo que es un recurso muy abundante en esta zona, pero poco explotado comercialmente (Vega-Villasante, 2002).

La langostilla roja en México es uno de los recursos naturales con más posibilidades de ser utilizado como ingrediente o como aditivo para alimentos balanceados en la acuicultura (Vega-Villasante, *et al.*, 2004).

### **2.2 Composición química de la langostilla**

La composición química de la langostilla indica que los componentes más abundantes presentes en este organismo son: proteína cruda (21.2-54.75%), cenizas (12.8-35.9%), quitina (4.76-21.6%) y extracto etéreo (4.7-14.0%). Esta variabilidad en su composición se debe a la zona en la cual fue colectada, edad, temporada y profundidad de captura (Castro-González, *et al.*, 1995).

Por otro lado, se sabe que el perfil de aminoácidos de la langostilla es similar al requerido por los peces, con excepción del contenido de ácido aspártico y glutámico. Aunque al parecer la composición química proximal de la langostilla varía por la zona y temporada de captura, el contenido relativo de aminoácidos se mantiene constante (Castro-González *et al.*, 1995).

### **2.3 Utilización de la langostilla como ingrediente y aditivo en acuicultura**

La langostilla roja, por su abundancia, factibilidad de captura y composición química, se ha utilizado en la acuicultura como una fuente de pigmentos o proteína con buenos resultados (Auriolles-Gamboa, 1995; Villarreal, 1995).

Este crustáceo es evaluado para su utilización como insumo en la fabricación de dietas para camarón. En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), Civera y colaboradores (1992) y Goytortúa-Bores (1993) han realizado estudios sobre la aplicación de la harina de langostilla en alimentos experimentales para camarón, y reportan que la langostilla no solamente es un ingrediente con posibilidades de sustituir a las harinas de pescado, cabeza de camarón o soya, sino que además, a ciertos niveles de inclusión, promueve el crecimiento de los

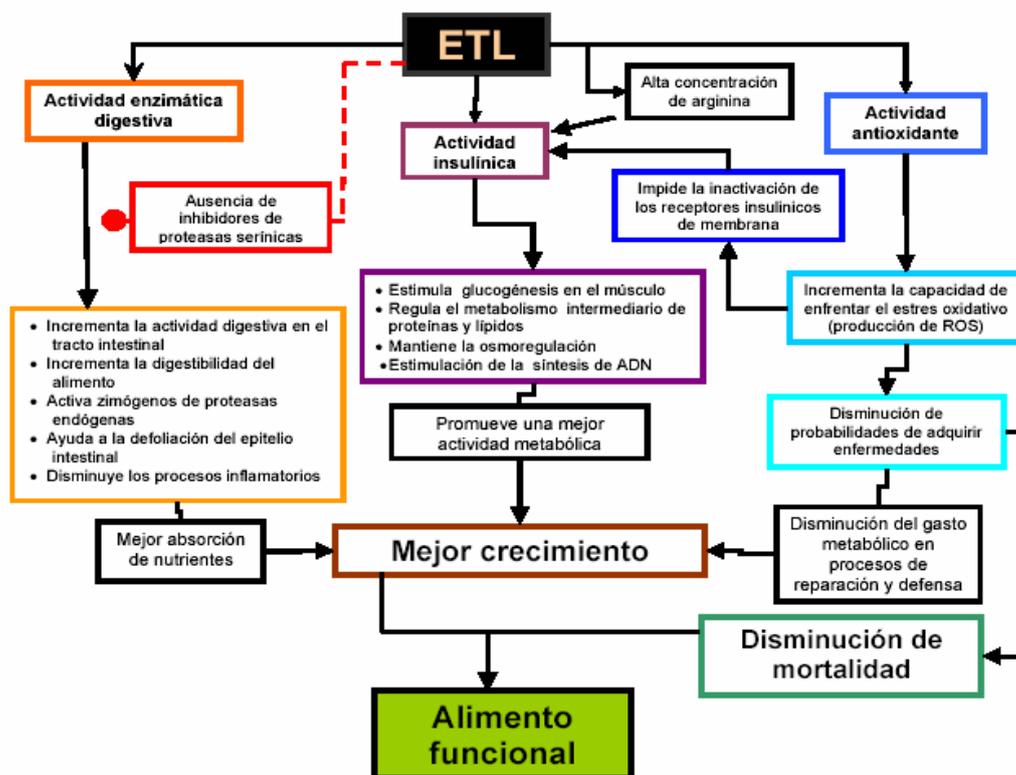
organismos, aumenta la actividad proteolítica en la glándula digestiva y mejora la digestibilidad de la proteína.

En 1994 Villarreal y colaboradores observaron mejoras en el crecimiento del camarón blanco al sustituir parcial y totalmente harinas de pescado, pasta de soya o cabeza de camarón en la dieta. En ese mismo año, Civera y colaboradores realizaron estudios semejantes para camarón café (*Penaeus californiensis*), encontrando respuestas variables de la actividad proteolítica y amilolítica del tracto digestivo de los organismos, en función a los niveles de inclusión de la langostilla en la dieta (Civera *et al.*, 1994).

En los estudios antes mencionados utilizaron harina fabricada a nivel laboratorio en cantidades experimentales. En 1999, Hernández-González determinó el valor nutricional de harina de *P. planipes* fabricada a nivel industrial para utilizarla como sustituto parcial de harina de pescado en dietas para los camarones peneidos *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei* bajo diferentes condiciones de cultivo. En este estudio observó que la sustitución de harina de pescado por harina de langostilla fabricada a nivel industrial favoreció el crecimiento de los organismos y concluye que se puede sustituir parcialmente la harina de pescado e inclusive podría utilizarse en alimentos comerciales. Sin embargo, la búsqueda de nuevas formas de inclusión de este crustáceo en alimentos para camarón, ha proporcionado nuevas alternativas de uso.

En el 2002 Vega-Villasante y colaboradores, realizaron un perfil bioquímico de la composición de un extracto soluble de langostilla liofilizado, el cual se consideró un aditivo potencial en los alimentos para camarón. En ese mismo estudio encontraron que el extracto crudo de langostilla posee capacidad antioxidante en la lipoperoxidación de tejido cerebral de rata y de los iones superóxido producidos por la reacción de la xantina-oxidasa. También encontraron actividad de péptidos tipo insulina. Se ha observado que este extracto tiene una influencia en el crecimiento en los camarones. Por todas estas propiedades, Vega-Villasante y colaboradores, en el 2004 proponen utilizar al extracto de langostilla como alimento funcional en dietas para camarón (Figura 1).

Nuevamente Vega-Villasante y colaboradores (2004) utilizaron un extracto total de langostilla liofilizado (ETL) a diferentes niveles de inclusión (1, 2, y 3%) como aditivo en alimentos experimentales para juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, en este estudio encontraron que los organismos alimentados con estos alimentos incrementaron su consumo de alimento, crecimiento y sobrevivencia, con respecto a aquellos alimentados con el alimento control (sin extracto de langostilla).



**Figura 1.** Actividades principales detectadas en el extracto total de langostilla (ETL) y vías sugeridas que pueden propiciar efectos positivos en la fisiología y salud del camarón (Vega-Villasante y colaboradores, 2004). (ROS): Especies reactivas al oxígeno.

## 2.4 Alimentos funcionales en la acuicultura

La ciencia de los alimentos ha evolucionado en los últimos años y se ha llegado a la vinculación de los alimentos con la medicina hasta crear el concepto de alimento funcional (Vega-Villasante *et al.*, 2002).

De acuerdo a la definición de alimento funcional, dada por Vega-Villasante y colaboradores (2002), un alimento se puede considerar como funcional si contiene componentes (nutricios o no nutricios) que beneficien una o varias funciones en el organismo de una forma dirigida a que sea relevante para conservar el estado de bienestar y salud; a reducir la aparición de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico por ejemplo, o si posee un efecto fisiológico más allá de los efectos nutricionales.

Como se ha mencionado con anterioridad, básicamente el éxito de la producción de un cultivo es la nutrición de los organismos. En los últimos años se han hecho búsquedas de alternativas nutricionales o alimentos que favorezcan el crecimiento, salud y confieran a los organismos la capacidad de resistir enfermedades (Vega-Villasante *et al.* 2002 y 2004). Para el caso del camarón de acuerdo a Tacon

(2000), la nutrición en el futuro inmediato tendrá la necesidad de considerar la investigación de los requerimientos nutricios adicionales para su reproducción y para lograr una óptima salud y resistencia hacia las enfermedades.

Un ejemplo de los alimentos funcionales utilizados en acuicultura, es la inclusión de harina de kelp (*Macrosistis pyrifera*), la cual al parecer promueve el crecimiento y salud de los camarones de cultivo (Rivera *et al.* 2002) Por otro lado, Vega-Villasante y colaboradores en el 2002 proponen el uso del extracto de langostilla como un alimento funcional en la acuicultura.

## **2.5 Principales tipos de deterioro en los alimentos**

Los alimentos son perecederos por naturaleza; sufren numerosos cambios durante su procesamiento en donde pierden nutrientes que componen al alimento, y posteriormente esta pérdida de nutrientes y de su calidad puede continuar en su almacenaje. Dichos cambios tienen influencias desfavorables que influyen en la calidad de los alimentos (Singh, 2000).

El alimento artificial para camarón no es la excepción. La calidad de este producto depende de su formulación, materias primas y tecnología de proceso. El almacenamiento inadecuado tanto de los ingredientes como de los alimentos formulados, puede conllevar a pérdidas económicas importantes para la industria del cultivo de camarón: si las condiciones de almacenamiento son pobres (exceso o falta de agua, temperatura, los cuales pueden promover un incremento en la carga microbiana. Agentes contaminantes como por ejemplo insecticidas, solventes orgánicos no deseados, entre otros; por mencionar algunos); se pueden producir modificaciones fisiológicas en los animales produciendo bajos rendimientos, mala utilización del alimento y hasta trastornos que provoquen la muerte de los animales (Díaz *et al.*, 2004).

Uno de los principales componentes que promueven el deterioro de los ingredientes y de los alimentos ya procesados, es el agua. Los alimentos tienen una porción de agua disponible y es la que propicia los procesos químicos, físicos y microbiológicos, los cuales pueden ser tanto favorables como indeseables al momento de conservar un alimento (Badui, 1999). Los cambios que sufren los alimentos por la presencia de agua pueden ser:

### **a) Cambios químicos**

Estos cambios se refieren a una alteración en la composición química de los alimentos por reacciones químicas. Dentro de los más importantes se encuentran los asociados a la actividad enzimática y las reacciones de oxidación. Estos cambios traen como

consecuencia, una alteración en el sabor y apariencia de los alimentos. Así como el promover la producción de sustancias que empobrecen la calidad del alimento (Singh, 2000).

#### **b) Cambios físicos y/o fisicoquímicos**

Estos efectos son causados principalmente por el mal manejo de los alimentos durante el almacenamiento y transportación. Si no se tienen las condiciones adecuadas de almacenamiento como los son la temperatura y humedad (valores que dependen del tipo de alimento y del modo de preparación), los alimentos pierden sus propiedades e inclusive la textura deseada de alimento (Singh, 2000 y Baudi, 1999).

#### **c) Cambios microbiológicos**

Los alimentos contienen diferentes porcentajes de agua en su composición; en ella se disuelven sustancias, las cuales generan un medio muy propicio para la formación de microorganismos (Garda, 2000). Estos microorganismos provocan alteraciones por reacciones enzimáticas de los mismos (Singh, 2000). Un problema muy común en los alimentos, que tienen como base semillas como trigo, es la proliferación de hongos, la cual promueve la formación de sustancias tóxicas para los individuos que los consumen (Desrosier, 2000).

### **2.6 Métodos de conservación**

Los métodos de conservación son aplicados a los alimentos para impedir que la acción microbiana y enzimática, provoquen algún tipo de deterioro en los mismos. Entre estos métodos de conservación se encuentran:

#### **a) Métodos físicos**

##### **a.1) Deshidratación**

Estos métodos consisten en eliminar el agua de los alimentos; por ejemplo: el secado o la liofilización. El primero consiste en eliminar el agua presente en los alimentos por calor. Para realizar esta operación, se utilizan equipos, como aireadores, secado al sol, secador de túnel o estufa, los cuales eliminan gran parte del agua. Los alimentos tratados por estos métodos pierden humedad y esto aumenta la concentración de los nutrientes que este contenga (Desrosier, 2000).

Por otro lado, la liofilización es un proceso que consiste en desecar un producto, el cual previamente se ha congelado a temperaturas sumamente bajas y se realiza por sublimación bajo vacío. La clave de este método es que los alimentos no

deben pasar a su estado líquido para poder eliminar el agua. De acuerdo a Navarro (1998) como producto de la liofilización se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original.

### **a.2) Tratamiento térmico**

Otro método de conservación físico, es el aumento de temperatura. El tratamiento térmico en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>) es un ejemplo de la aplicación de este método. Este proceso consiste en aplicar un proceso de esterilización térmica a productos alimenticios mantenidos en recipientes cerrados. Tiene la finalidad de eliminar los microorganismos presentes en los alimentos y sus enzimas por medio de calor, para así evitar las fuentes de descomposición en los alimentos.

### **b) Métodos químicos**

Consisten en añadir a los alimentos una sustancia que evite el deterioro de los alimentos al momento de ser procesados (Desroisier, 2002).

Baudi (1999) define un aditivo como una sustancia natural o sintética distinta al alimento que se encuentra en el mismo como resultado de una adición intencional durante las etapas de producción, almacenamiento o envasado para lograr ciertos beneficios. Cabe mencionar que en esta definición no se incluyen materiales y/o sustancias indeseables como plaguicidas, fumigantes, fertilizantes, por mencionar algunos.

Existen más de 3500 compuestos dentro de la categoría de aditivos. Todas estas sustancias están catalogadas de acuerdo al efecto que tenga sobre el alimento al cual sea incluido. Existe mucha controversia sobre la clasificación y el uso de estas sustancias, sobretudo, cuando se trata del consumo humano, el cual tiene un control muy riguroso sobre las cantidades de aditivos que se añaden en el alimento (FDA, 2000).

Un ejemplo de este tipo de método de conservación es la acidificación. La cual consiste en añadir una sustancia ácida, también llamadas acidulantes. Estas sustancias cumplen un gran número de funciones cuando se añaden a los alimentos, entre los que destacan: reducción y amortiguación de pH; conservador, saborizante, inhibidor de reacciones enzimáticas, entre otras. Dentro de este grupo destacan los ácidos orgánicos: acético, atípico, benzoico, fumático, láctico, sóbico; por mencionar algunos. De los inorgánicos el más utilizado es el ácido clorhídrico (Baudi, 1999 y FDA, 2000).

De acuerdo al Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos, FDA por sus siglas en inglés, los alimentos considerados acidificados son aquellos que

tienen un pH de 4.6 o menos. Este método consiste en preparar el alimento y mantenerlo a una temperatura aproximada de 25°C y con ayuda de unos electrodos de un medidor de pH se agrega el ácido (generalmente orgánico) en una concentración de 0.1 molar aproximadamente hasta ajustar el pH a 4.6

## **2.7 Vida de anaquel**

Los métodos de conservación tienen la finalidad de impedir o reducir el ataque de microorganismos y la degradación de los alimentos por el manejo de los mismos. Cada uno de éstos se lleva a cabo por medio de protocolos diferentes y cada uno de ellos tiene efectos secundarios en los alimentos. Al momento de ser procesados pueden tener influencia negativa sobre los componentes de los mismos: por ejemplo, la precipitación de enzimas por la variación de pH, la degradación de carotenos y clorofilas por un choque térmico (Baudi, 1999 y Singh, 2000).

De acuerdo a Singh (2000), en el momento que un alimento se considera poco apropiado para el consumo del mismo, se dice que ha terminado su vida de anaquel. Durante la distribución y almacenamiento de los alimentos se pueden presentar condiciones ambientales que favorecen su degradación entre las que se encuentran: alta temperatura, alta humedad, presencia de oxígeno y luz. Estas condiciones pueden provocar infinidad de reacciones y mecanismos que favorecen la degradación de los alimentos (Man y Jones, 2000).

Los principales mecanismos de degradación de los alimentos que disminuyen la vida de anaquel de los mismos son los siguientes: (a) cambios físicos, los cuales son acusados por la manipulación, almacenamiento y transporte de los alimentos; (b) cambios químicos, los cambios ocurren en los componentes internos de los alimentos tanto por las sustancias aplicadas al momento de su procesamiento como del medio externo al que esté sometido el alimento. Dentro de los cambios químicos que más problemas presentan son la presencia de actividad enzimática y rancidez de lípidos por presencia de oxígeno y (c) cambios microbiológicos; los microorganismos tienen la habilidad de multiplicarse a tasas de crecimiento muy altas. Los alimentos tienen los nutrientes necesarios para su crecimiento. Otro problema, es que los microorganismos son los responsables de propiedades sensoriales no deseables en los alimentos como hongos generadores de sustancias que alteren el sabor de los alimentos (Singh, 2000).

Para evaluar la vida de anaquel de un alimento, se siguen ciertos criterios, los cuales están registrados en cada país. En México, estos criterios de evaluación los proponen las Normas Oficiales Mexicanas, en las cuales se describen los criterios que se

deben tener para evaluar un producto apto para el consumo, en ellas se establecen una serie de especificaciones para cada tipo de alimento y su método de conservación. Sin embargo, estas normas establecen el control y evaluación de los alimentos para consumo humano. Se tienen pocas referencias donde se establezcan los criterios de evaluación para los alimentos balanceados utilizados en acuicultura. . La Norma Oficial con clave NOM-021-PESC-1994, tiene como objetivo regular los ingredientes y alimentos balanceados para acuicultura y el ornato, importados y nacionales, para su comercialización y consumo en el país. Sin embargo, hasta el momento son pocos los parámetros para medir la vida de anaquel de los ingredientes y alimentos utilizados en acuicultura.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón es una actividad que día con día tiene más demanda. Para el éxito y sustentabilidad de esta industria, se necesita contar con alimentos balanceados que aporte los componentes nutricios requeridos por los animales, pero al mismo tiempo, se debe velar por la salud de los camarones, por lo que la utilización de alimentos funcionales en la acuicultura es una propuesta para mejorar la salud y obtener animales de talla máxima en menor tiempo.

Para mantener la calidad de los alimentos, hay que procurar la buena calidad de los ingredientes y aditivos. La actividad microbiana, las enzimas digestivas y la actividad de agua son los principales agentes que favorecen el deterioro de ingredientes, aditivos y alimentos.

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) es un crustáceo con características adecuadas para ser explotado a nivel industrial y ser usado en la acuicultura. Hasta el momento se ha propuesto el uso de la harina de langostilla como sustituto de las harinas de pescado y otros ingredientes tradicionales. Al mismo tiempo, se han hecho estudios para utilizar extractos de langostilla como aditivos en alimentos para camarón y peces. Por las características bioquímicas del extracto soluble de langostilla, y su capacidad como quimioattractante, fagoestimulante y promotor del crecimiento, puede ser utilizado como alimento funcional en alimentos balanceados para camarón. Sin embargo, contiene mucha agua y enzimas digestivas, lo cual facilita su rápida degradación. Existen alternativas para solucionar este problema, como lo son el aplicar tratamientos que ayuden a preservar sus propiedades. Entre esas alternativas, están la congelación, la acidificación y la cocción, mismas que no han sido evaluadas. Contar con un método de conservación que reduzca la velocidad de degradación del extracto soluble de langostilla, aumentará su vida de anaquel, teniendo así la posibilidad de incluirlo en alimentos balanceados, con lo cual se pretende mejorar la utilización del alimento y tener una producción de organismos mejor nutridos y sanos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La aplicación de diferentes métodos de conservación (congelación, acidificación a 4 y 27 °C o un tratamiento térmico) al extracto desgrasado de langostilla provocará cambios en sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas a lo largo del tiempo de almacenamiento, pero no reducirá significativamente su capacidad de promover un mayor consumo de alimento y el crecimiento ponderal del camarón.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la calidad de un extracto desgrasado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*), sometido a diferentes métodos de conservación, como aditivo alimentario en dietas para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*.

### Objetivos específicos

1. Determinar los cambios en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un extracto desgrasado de langostilla, al ser sometido a diferentes métodos de conservación (congelación, acidificación a 4°C y 27°C, o tratamiento térmico), a lo largo de doce semanas de almacenamiento.
2. Evaluar los extractos de langostilla obtenidos al cabo de 12 semanas de almacenamiento, como aditivos alimenticios en dietas para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*, por medio de un bioensayo de crecimiento.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en tres etapas: primero se obtuvo el extracto completo de langostilla (ECL) el cual fue desgrasado (EDL). A estos extractos se les realizó una caracterización, la cual consistió en una serie de análisis químicos (concentración de proteínas solubles, actividad enzimática, concentración de carotenos totales, determinación de pH) y un análisis microbiológico) con la finalidad de conocer sus condiciones iniciales. Posteriormente, se aplicaron cuatro métodos de conservación: congelado, acidificado y almacenado a dos temperaturas (4 y 27°C) y un tratamiento térmico (cocción).

La segunda etapa del trabajo consistió en la valoración de los distintos métodos de conservación por medio de un estudio de una vida de anaquel, el cual tuvo una duración de 12 semanas durante las cuales se aplicaron los mismos criterios de evaluación empleados para determinar las características de los extractos ECL y EDL de manera que se pudiese apreciar la variación de sus propiedades después de ser sometido el extracto desgrasado a un método de conservación y almacenamiento.

Finalmente, la tercera etapa del trabajo consistió en evaluar la calidad de los cuatro extractos obtenidos al cabo de 12 semanas de almacenamiento, al ser incluidos como aditivos al 1% en alimentos formulados para camarón.

### 6.1 Obtención de la langostilla

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) fue gentilmente proporcionada por el Dr. Eduardo Balart, del programa de Ecología Pesquera del CIBNOR. Se capturó en los últimos días del mes de Octubre del año 2004, frente a la costa de Bahía Magdalena en Baja California Sur. El método de captura empleado fue con red de arrastre (tipo camaronera). Después de su captura, la langostilla fue congelada a -4°C y almacenada en completa oscuridad hasta su utilización.

### 6.2 Obtención del extracto soluble de langostilla

Se prensaron mecánicamente 20 kg de langostilla entera, previamente descongelada a temperatura ambiente en lotes, de 650 g (Figuras 2 y 3), de acuerdo a la metodología propuesta por Vega-Villasante y colaboradores (2002). De este prensado se obtuvo un líquido café-rojizo al cual se le denominó extracto completo de langostilla (ECL) (Fig. 4). Se centrifugó a 14,000 rpm, durante 15 minutos a una temperatura de 4°C (centrífuga marca BECKMAN J2-MC, rotor: JA-14) en contenedores de 250 mL (Fig. 5). Después de la centrifugación, se recuperó por sifoneo la capa superior del extracto, correspondiente al aceite de langostilla (ACL). Posteriormente se recuperó la

parte soluble del extracto, a la que se le denominó extracto desgrasado de langostilla (EDL).



**Figura 2.** Prensado de langostilla



**Figura 3.** Prensa mecánica

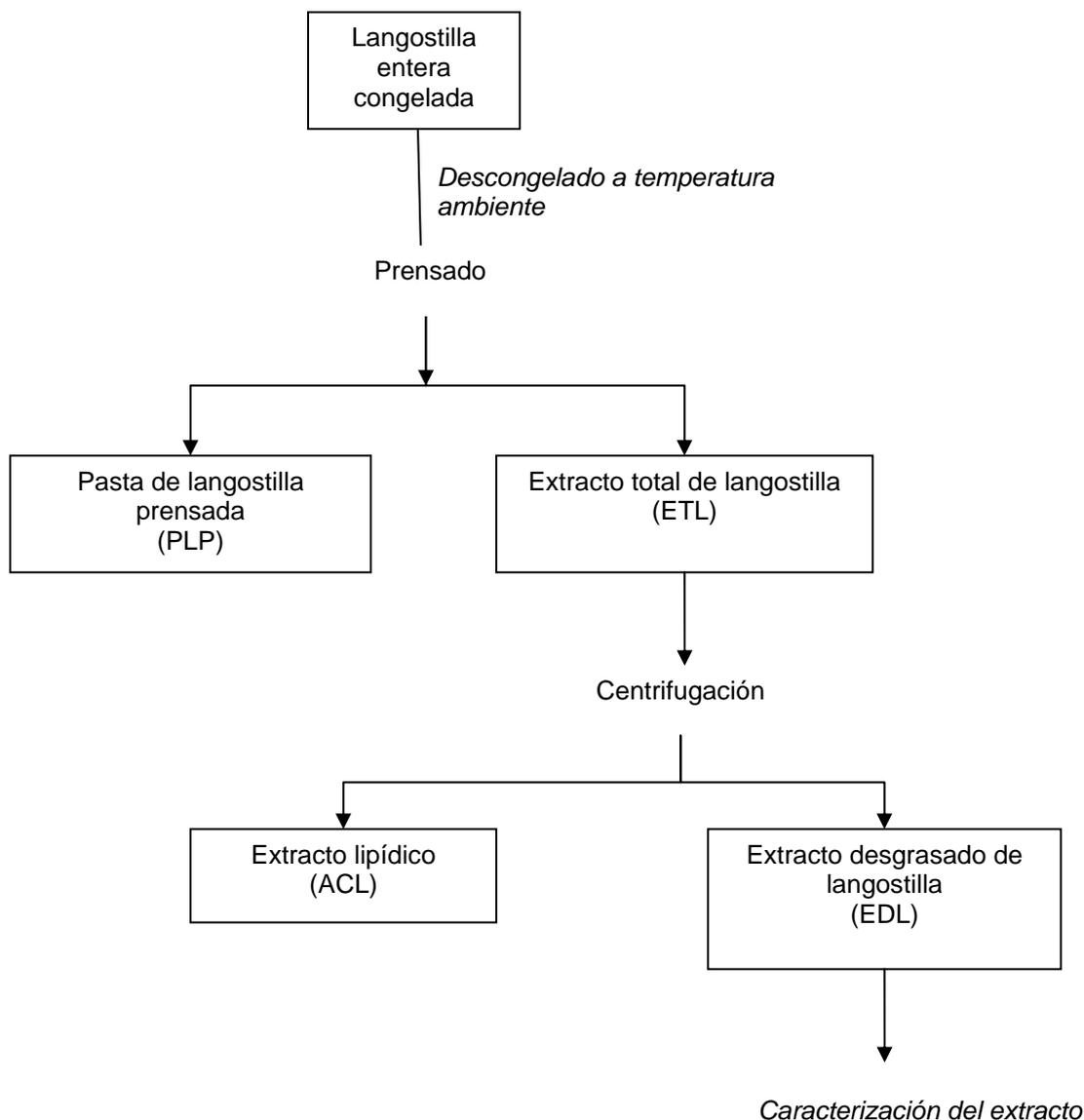
El aceite de langostilla se almacenó en tubos de plástico de 300mL de capacidad, con butihidroxitolueno (BHT) al 0.004% en peso. Se almacenó en oscuridad a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  en un congelador WHIRPOOL. Cabe mencionar que este extracto lipídico, así como la masa del prensado de langostilla obtenidos (Fig. 6) no fueron sujetos de estudio en el presente trabajo.



**Figura 4.** Extracto completo de langostilla.



**Figura 5.** Extracto centrifugado de langostilla (14,000rpm; 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ )



**Figura 6.** Diagrama de flujo para la obtención del extracto de langostilla desgrasado por medio de prensado mecánico y centrifugación.

### 6.3 Caracterización de los extractos de langostilla

Para conocer las condiciones iniciales de los extractos, antes de aplicar los métodos de conservación, tanto al ECL como al EDL se les realizaron una serie de análisis que servirían como punto de referencia para ver los cambios ocurridos tanto al momento de aplicar los métodos de conservación, como durante su almacenamiento. Los análisis realizados fueron los siguientes:

### **6.3.1 Análisis químico proximal**

El análisis de la composición química proximal (materia seca, proteína cruda [Nx6.25], extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno) de las muestras se determinó por triplicado de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC (1995).

Para la realización de los análisis antes mencionados, todas las muestras se liofilizaron previamente para obtener los valores en base seca.

### **6.3.2 Medición de pH**

Se midió el pH de los extractos con un potenciómetro marca HANNA INSTRUMENTS, modelo pH 210.

### **6.3.3 Carotenos totales**

La cuantificación de carotenos totales se realizó modificando el método descrito por Coral-Hinostroza (2000). Se hizo una curva de calibración de astaxantina y acetona a una concentración de 2mg/mL. Se realizó un barrido en un espectrofotómetro (JEN WAY 6505 UV/Vis), para determinar la absorbancia a la cual se realizaría la lectura. La curva de calibración se leyó en el espectro a 470nm al igual que las muestras problema.

Para el caso de los análisis de los extractos, se tomó 1 mL de las muestras a analizar y se mezclaron con 2 mL de acetona, en tubos de ensayo de vidrio con tapa de plástico. Las muestras se dejaron reposar durante 24 horas en oscuridad total. Pasado ese tiempo, se les agregó 0.5g de sulfato de sodio anhidro sólido para eliminar el exceso de agua. Las muestras se centrifugaron a 10,000rpm a 4°C durante 10 minutos (centrifuga marca EPPENDORF 5810R, rotor: A-4-81) y se leyeron en el espectrofotómetro (JEN WAY 6505 UV/Vis) a 470nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### **6.3.4 Proteína soluble**

Se determinó la concentración de proteínas solubles expresada en mg/mL de todos los extractos de acuerdo al micrométodo Bradford (1976).

### **6.3.5 Actividad enzimática**

Se evaluaron las condiciones iniciales de la actividad específica de las enzimas digestivas amilasa, lipasa y proteasa del ECL y EDL, así como de los extractos sometidos a diferentes métodos de conservación. Los análisis se realizaron por triplicado, y con un testigo.

**a) Actividad amilolítica**

La actividad específica de amilasa se determinó midiendo la producción de azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de almidón, de acuerdo al método de Vega-Villasante *et al.* (1993) con el siguiente protocolo:

La mezcla de reacción fue: 480 $\mu$ L de Tris-HCl (50mM, pH 7.5), 20 $\mu$ L de extracto, y 500 $\mu$ L de solución de almidón (1% en Tris-HCl). La mezcla se incubó a temperatura ambiente (30°C) durante 10 minutos. Inmediatamente después de la incubación, se agregaron 200 $\mu$ L de carbonato de sodio (2N) y 1.5mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se sometió a ebullición durante 15 minutos. El volumen se ajustó a 10mL con 7.3mL de agua destilada. La solución coloreada se leyó en un espectrofotómetro a 550nm, (JEN WAY 6505UV/Vis). Los testigos se prepararon agregando el extracto crudo después del reactivo de DNS. Se preparó un control adicional en el que se reemplazó el extracto con Tris-HCl. La actividad enzimática se expresó como el número de unidades por mL de extracto.

**b) Actividad lipolítica**

La actividad enzimática tipo lipasa se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Versaw *et al.* (1989) de acuerdo al siguiente protocolo:

La mezcla de reacción fue: 100 $\mu$ L de taurocolato de sodio (200mM), 1900 $\mu$ L de Tris-HCl (50mM, pH 7.5), y 10 $\mu$ L de extracto. Se agregaron 20 $\mu$ L de  $\beta$ -naftilcaprilato (200mM en dimetil sulfoxido [DMSO]). La mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente (30°C). Posteriormente se agregaron 20 $\mu$ L de Fast Blue (100mM en DMSO) y la mezcla se incubó por 5 minutos a la misma temperatura. La reacción se detuvo con 200 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA 0.72N). La mezcla resultante se clarificó con 2.71 etanol:acetato de etilo (1:1) y la absorbancia fue medida a 540nm en un espectrofotómetro (JEY WAY 6505 UV/Vis). Los testigos se prepararon agregando el extracto crudo después de la solución de TCA. Un control adicional fue preparado reemplazando el extracto crudo por amortiguador de Tris-HCl. La capacidad de lipasa se expresó como el número de unidades de lipasa por mL de extracto.

### **c) Actividad proteolítica**

Para determinar la actividad enzimática tipo proteasa, se siguió el protocolo propuesto por Vega-Villasante *et al.* (1993):

La mezcla de la reacción fue: 20 $\mu$ L de extracto, 230 $\mu$ L de Tris-HCl (50mM, pH 7.2) y 500 $\mu$ L de azocaseína (2% disuelto en Tris-HCl 50mM, pH 7.5). La mezcla se incubó a temperatura ambiente (30°C) durante 30 minutos. Después de la incubación la reacción se detuvo con 500 $\mu$ L de TCA al 20% y se clarificó en una centrifuga EPPENDORF (modelo 5804R, rotor: X055), a 10,000rpm, 25°C durante 5 minutos. La absorbancia se registró a 440nm. Los testigos se prepararon de forma similar, pero el extracto se agregó después de la solución de TCA. Se utilizó un control negativo adicional en el que se reemplazó el extracto con amortiguador de Tris-HCl. La actividad se expresó como el número de unidades de proteasas por mL de extracto.

### **6.3.6 Análisis microbiológicos**

Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico y Parasitología del CIBNOR.

Para determinar qué tipo de microorganismos serán analizados, se tomaron como referencia las especificaciones sanitarias propuesta para los alimentos acidificados especificados por la NOM-130-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico, la cual proporciona el límite máximo permitido de microorganismos mesófilos anaerobios, aerobios, mohos y levaduras en alimentos acidificados a pH 4.6.

#### **a) Coliformes fecales**

Se realizó una determinación previa tanto del ECL y el EDL para detectar la presencia de organismos fecales y definir si se haría seguimiento de dicho análisis a lo largo del estudio de vida de anaquel, para lo que se utilizó la técnica descrita en la Norma Mexicana NMX-AA-42-1987 Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli*.

Para la inoculación, se prepararon alícuotas de muestra diluida en una serie de tubos de dilución decimal a las concentraciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en solución salina al 0.8%.

Se preparó una serie de tubos con Caldo lactosado y otra serie para Caldo verde brillante al 2%. Las muestras diluidas se inocularon en la serie de tubos de los dos medios antes mencionados y se incubaron (incubadora marca VWR) a 36°C durante 24 horas.

Para la detección de coliformes fecales, se revisó si había presencia de efervescencia y turbidez en cada uno de los tubos y mediante tablas estadísticas se

llevó a cabo el cálculo de número más probable (NMP) de organismos coliformes, coliformes fecales termotolerantes y *E. coli* que pudieran estar presentes en 100 cm<sup>3</sup> de muestra, a partir del número de tubos resultados confirmativos positivos.

### **b) Bacterias, hongos y levaduras totales**

Para la determinación de bacterias y levaduras totales se utilizó la técnica descrita por Hernández-Saavedra (1990).

Previo a la inoculación por dispersión (Alonso-Urmeneta, *et. al* 1995), se preparó el medio formado por peptona (2% en peso), dextrosa (2% en peso), extracto de levadura (1% en peso) y agar (2% en peso) y se disolvió en agua caliente y con agitación constante hasta lograr una solución homogénea. Este medio se esterilizó en una autoclave (Market ForgeSTME) a una temperatura de 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Dicho agar nutritivo se colocó en cajas Pretri de plástico. Como control de contaminación al momento de la preparación, las cajas se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente (29°C), en caso de encontrar alguna caja contaminada ésta no fue utilizada en la siembra.

Para la inoculación, las muestras se diluyeron para alcanzar diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> en solución salina al 0.8%. Se tomaron 50µL de cada una de las diluciones y se hizo la siembra por dispersión. Los cultivos se colocaron en una incubadora (VWR) a una temperatura de 36°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó un conteo por cuadrante y se obtuvieron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL de extracto). Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

### **c) Bacterias marinas**

Para determinar la presencia de bacterias marinas se utilizó la técnica establecida por Hernández-Saavedra (1990).

Previo a la inoculación por dispersión (Alonso-Urmeneta, *et. al* 1995), se preparó un medio de cultivo 2216 (marca Difco) y se siguieron los pasos previos como en el apartado anterior pero con el medio de cultivo antes mencionado.

Se prepararon el mismo número de diluciones del apartado anterior y se procedió a la siembra por dispersión utilizando 50µL de inóculo. Los cultivos se colocaron en una incubadora (VWR) a una temperatura de 36°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó un conteo por cuadrante y se obtuvieron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL de extracto). Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

## **6.4 Conservación del extracto desgrasado de langostilla por diferentes métodos, y determinación de su vida de anaquel**

Para evaluar la vida de anaquel del extracto de langostilla, se tomaron 1500 mL del EDL por método de conservación: tratamiento térmico almacenado a 27°C; acidificado almacenado a 27°C; acidificado almacenado a 4°C; y congelado almacenado a -2°C.

Para evaluar el efecto de los diferentes métodos de conservación aplicados, se realizó una valoración de su vida de anaquel durante 12 semanas. Los extractos tratados fueron almacenados a las temperaturas antes señaladas en oscuridad total.

El diagrama de flujo de los procesos seguidos para aplicar los métodos de conservación, así como las condiciones de almacenamiento de los extractos desgrasados de langostilla durante el estudio de vida de anaquel, se muestran en la Figura 7.

### **6.4.1 Métodos de conservación**

#### **6.4.1.1 Congelado**

Se tomaron 630 mL del EDL y se colocaron en 9 botellas de vidrio con 100mL de capacidad, previamente lavadas y esterilizadas (121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>) en una autoclave (MarKet ForgSTIME). En cada una se colocaron 70 mL de este extracto.

Las botellas se cerraron manualmente y se almacenaron en oscuridad a una temperatura constante de -2°C en un congelador WHYRPOOL.

Los criterios de evaluación fueron son semejantes a los empleados para la caracterización de los extractos ECL y EDL (sección 6.3). La valoración de este método de conservación tuvo una duración de 12 semanas, y se realizó cada 6 semanas.

#### **6.4.1.2 Acidificado a 4°C y 27°C**

Se tomaron 3,500 mL del EDL, se mantuvo en agitación constante y a una temperatura de 25°C en una mezcladora marca THUNDERBIRD, modelo ARM-30 con capacidad de 20 Kg. Después, se midió el pH inicial del extracto con un potenciómetro HANNA INSTRUMENTS (modelo pH 210), y se llevó a pH 4.3 adicionando ácido acético glacial concentrado (J. B. Baker) de acuerdo a las normas establecidas por la FDA (2000). A este extracto se le denominó extracto acidificado de langostilla.

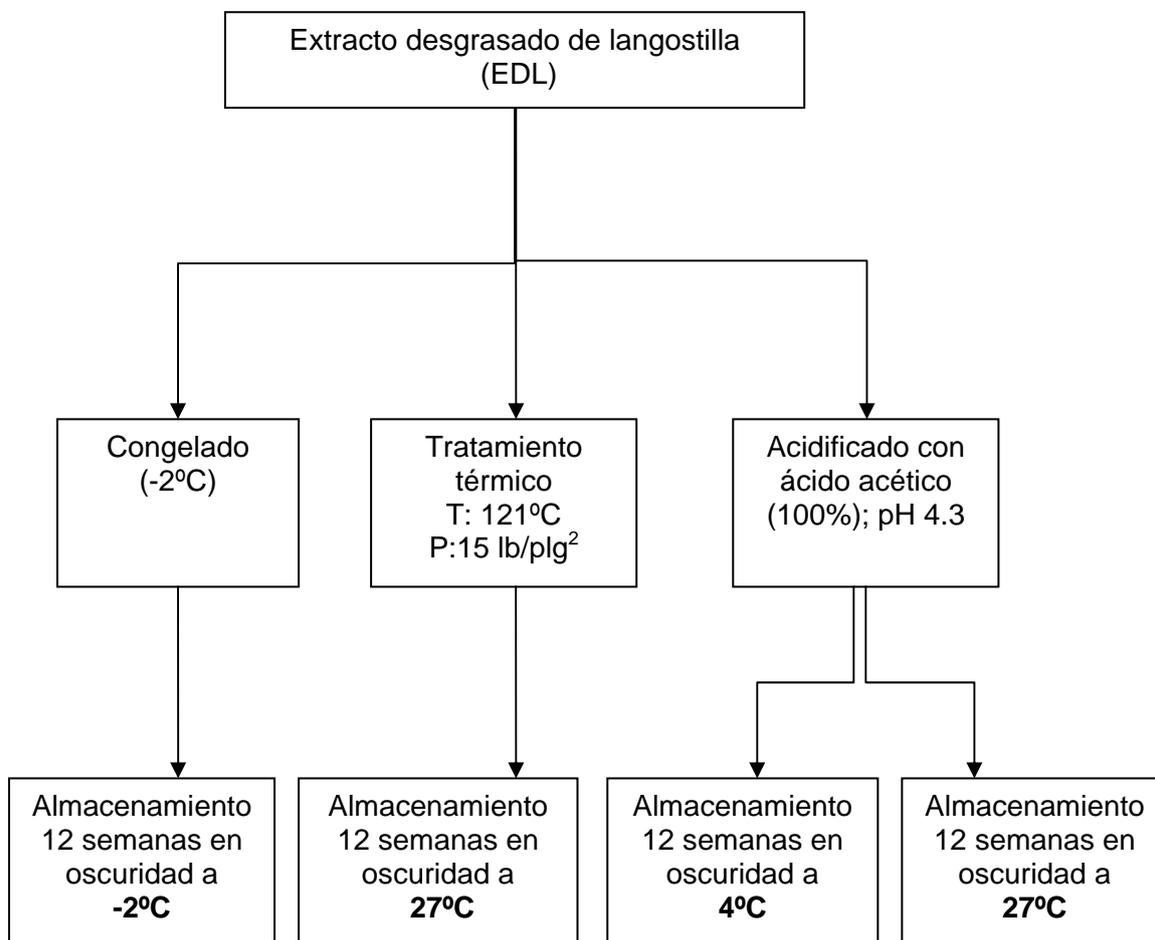
El extracto acidificado se colocó en 18 botellas de vidrio semejantes a las utilizadas en la sección 6.4.1.1, mismas que se cerraron manualmente. Nueve de las botellas se almacenaron a 4°C en un refrigerador WHIRPOOL, al cual se le denominó extracto de langostilla acidificado a 4°C (A4) y otras 9 se almacenaron a 27°C, al cual se le denominó extracto de langostilla acidificado a 27°C (A27). Las botellas para

ambos tratamientos se guardaron en completa oscuridad en cajas de cartón a la temperatura ya especificada.

La caracterización de los extractos fue semejante que para el congelado, y se realizó según se indica en la sección 6.3.

#### **6.4.1.3 Tratamiento térmico**

Se tomaron 1,000 mL del EDL y se envasaron en el tipo de botellas de vidrio descritas en la sección 6.3.1.1. En cada una de las botellas se colocaron 70 mL del extracto, y se cerraron parcialmente de manera manual. Se sometieron a un tratamiento térmico en autoclave (MarKet ForgSTIME) a una temperatura de 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Terminado este tiempo, se esperó a que la presión de la autoclave disminuyera para poder abrirla y cerrar las botellas completamente para hacer un cerrado manual. Los extractos se almacenaron a una temperatura de 27°C en completa oscuridad dentro de cajas de cartón.



*Caracterización inicial de los extractos  
y  
posteriormente cada 4 semanas*

**Figura 7.** Diagrama de los métodos de conservación y condiciones de almacenamiento durante el estudio de vida de anaquel del extracto desgrasado de langostilla.

### 6.4.2 Vida de anaquel

La evaluación los métodos de conservación aplicados al extracto de langostilla se realizó por medio de un estudio de vida de anaquel con duración de 12 semanas. Cada tratamiento se evaluó por triplicado y cada réplica se analizó a su vez, por triplicado. Los criterios de evaluación utilizados, se describen en la sección 6.3. Los muestreos se hicieron al inicio, a las 6 semanas de haber comenzado el almacenamiento y al final (Tabla I).

**Tabla I.** Diseño experimental del estudio de vida de anaquel del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación.

Tratamiento	Duración del estudio	Frecuencia de análisis	Réplicas por tratamiento	Réplica analíticas
Congelado	12 semanas	c/ 6 semanas	3	3
Acidificado 27°C	12 semanas	c/ 6 semanas	3	3
Acidificado 4°C	12 semanas	c/ 6 semanas	3	3
Tratamiento térmico	12 semanas	c/ 6 semanas	3	3

Congelado a -2°C. Acidificado a pH 4.3 y almacenado a 4°C. Acidificado a pH 4.3 y almacenado a 27°C. Tratamiento térmico a 121°C con 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 min y almacenado a 27°C. Tiempo con tres niveles: semanas 0, 6 y 12.

### 6.4.3 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de distribución normal Chi cuadrada, para comprobar que los datos eran normales, y se aplicaron análisis de varianza de dos vías para ver si había diferencias e interacción significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. Se tomaron como valores fijos los métodos de conservación con cuatro niveles (congelado, acidificado a 4°C; acidificado a 27°C y tratamiento térmico) y el tiempo con tres niveles (semana 0, 6 y 12). Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey para determinar entre qué tratamientos existían diferencias, con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa Statistica 7 ® (Stara Sofá, Inc. Tulsa, USA.)

## **6.5 Inclusión de extractos de langostilla, obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento.**

Se utilizaron los extractos obtenidos al cabo de 12 semanas de almacenamiento como aditivos en alimentos experimentales que se evaluaron en un bioensayo de crecimiento que se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, S. C.).

### **6.5.1 Formulación de los alimentos**

La formulación de las dietas experimentales se hizo con el software MIXIT-WIN<sup>MR</sup> teniendo como base la dieta control con 40% de proteína reportada en Goytortúa-Borés (1993), misma que cubre los requerimientos nutricios reportados para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Tabla II).

### **6.5.2 Fabricación de los alimentos experimentales**

Las dietas se elaboraron en la planta de alimentos experimentales del CIBNOR, S. C. de acuerdo a la técnica descrita por Civera y Guillaume (1989). Se mezclaron primero los macroingredientes secos (harina de pescado, pasta de soya y harina de trigo) en una mezcladora Kitchen Aid<sup>MR</sup> con capacidad de 5 L por espacio de 15 minutos. Aparte, se hizo la mezcla de los microingredientes (ácido algínico, vitamina C, cloruro de colina, premezclas de vitaminas y minerales, BHT y el extracto de langostilla). Posteriormente se mezclaron los macroingredientes y los microingredientes por 15 minutos más. Después se hizo manualmente una emulsión con los aceites de pescado y la lecitina de soya, misma que fue incorporada a la mezcla de ingredientes secos, y mezclada por 5 minutos. Una vez pasado ese tiempo, se agregó agua caliente a razón de aproximadamente un 35% del peso de a la masa sólida. La pasta resultante fue extruida en dos ocasiones en un molino de carne TOR-REY<sup>MR</sup> equipado con un dado de 2.7 mm de diámetro. La primera en forma rápida, y la otra más lenta cortando los espaguetis manualmente con la ayuda de una espátula, a fin de obtener pelets de aprox. 0.5 cms de longitud, mismos que fueron secados en una campana de extracción con flujo de aire a 28°C durante 48 hrs., para después ser almacenados en refrigeración a 4°C hasta su utilización. Se destinó una muestra de cada alimento para hacer pruebas de estabilidad en el agua y determinar su composición química proximal y de energía.

**Tabla II.** Composición de los alimentos experimentales (g/100g de alimento) utilizados en el bioensayo de crecimiento con juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*.

INGREDIENTE	CLAVE	DC	DEC	DEA4	DEA27	DTT
Harina de pescado <sup>1</sup>	HP0508	33.60	33.60	33.60	33.60	33.60
Harina de trigo <sup>1</sup>	HT0508	30.73	30.73	30.73	30.73	30.73
Pasta de soya <sup>2</sup>	PSoy0507	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Aceite de pescado <sup>1</sup>	AcPes0509	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Lecitina de soya <sup>3</sup>	LSoy051-s	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Almidón de maíz <sup>4</sup>	SigmaS-4126	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37
Ácido algínico <sup>5</sup>	Sigma A-7128	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas <sup>6</sup>	VITCRU0201	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Fosfato dibásico de sodio	S-0876	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Premezcla de minerales <sup>6</sup>	MINCRU0201	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina <sup>7</sup>	CloCol98	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C <sup>8</sup>	Stay-C 35% aa	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT <sup>7</sup>	<2004INC101162	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Extracto de langostilla	EDL041028/ 051017	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado. DEA4: dieta con extracto acidificado y almacenado a 4°C. DEA27: dieta con extracto acidificado y almacenado a 27°C. DEE: dieta con extracto tratado térmicamente.

<sup>1</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, Jalisco, México

<sup>2</sup>PIASA, La Paz, Baja California Sur, México

<sup>3</sup>Restaurant vegetariano Rey Sol, La Paz, Baja California Sur, México

<sup>4</sup>Probst, Toluca, Edo. De México, México

<sup>5</sup>Sigma, A-7128, St. Louis, MO, U.S.A.

<sup>6</sup>Sigma, B-2754, St. Louis, MO, U.S.A.

<sup>7</sup>Biomedicals. Inc., Aurora, OH, U.S.A.

<sup>8</sup>Roche, D.F., México

### 6.5.3 Estabilidad del alimento en el agua

Los alimentos fueron sometidos a una prueba de estabilidad en el agua, siguiendo la metodología a continuación descrita: 2 g de alimento (porcentaje de humedad conocido) se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual contenía 200 mL de agua destilada a 27°C. Después de una hora de inmersión sin agitación, el contenido del matraz se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1, previamente secado y pesado, con la ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro con el alimento residual se sometió a un secado en una estufa con flujo de aire a 70°C por 24 horas. La fórmula utilizada para determinar la estabilidad de la muestra en el agua, calculada como porcentaje de materia seca retenida, es la siguiente:

$$\text{Materia seca retenida (\%)} = \frac{\text{Peso seco del alimento residual}}{\text{Peso seco del alimento final}} * 100$$

### 6.5.4 Composición proximal de los alimentos

El análisis de la composición química proximal (materia seca, proteína cruda [Nx6.25], extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno) de las muestras se determinó de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC (1995). El extracto libre de nitrógeno (ELN) fue calculado por diferencia a 100%:

$$\text{ELN} = 100\% - (\% \text{ proteína} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ ceniza} + \% \text{ fibra cruda}).$$

La energía bruta se midió por medio de un calorímetro adiabático (PARR Instruments).

### 6.5.5 Sistema experimental de cultivo para el bioensayo de crecimiento

El sistema de cultivo, tipo intensivo, donde se llevó a cabo el bioensayo, está instalado en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, el cual cuenta con un aire acondicionado que mantuvo el ambiente a una temperatura promedio de 25°C. El sistema se alimentó con agua de mar proveniente de una toma de agua directa a 150 m de la orilla de playa, y se bombeó a una cisterna con una bomba con capacidad de 15 HP. De ahí se distribuyó por gravedad por un sistema de filtros de arena hacia dos cisternas marca ROTOPLAS de 5 m<sup>3</sup>, de donde se alimenta el sistema de cultivo por medio de un hidroneumático, pasando previamente por filtros de cartucho (50 y 10 μ) y un filtro de luz UV. El sistema consistió de 20 tanques de fibra de vidrio (34 x 35 x 38 cm) con capacidad de 60 L, los cuales están soportados por una estructura de hierro en cuya parte central están los sistemas de aireación, abastecimiento y descargas de agua. Todo el sistema se cubrió con un plástico de vinyl negro, el cual mantuvo una atmósfera estable en el interior en cuanto a iluminación y temperatura. Cada tanque

contó con un exhaustor de aireación, una malla mosquitero para evitar el escape de los organismos y un calentador sumergible para controlar la temperatura del agua.



**Figura 8.** Sistema de cultivo para bioensayos de crecimiento en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR.

## **6.6 Bioensayo de crecimiento**

### **6.6.1 Organismos experimentales**

Los organismos utilizados en este trabajo fueron juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* donados por la granja camaronera Organic Shrimp, B.C.S. Antes de su utilización, se aclimataron a condiciones de laboratorio durante una semana en tanques de plástico (ROTOPLAS) con 2,500 L de capacidad a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y salinidad de  $40 \pm 1\text{‰}$ . Se alimentaron con alimento comercial (PIASA) para camarón con 40% de proteína. Se seleccionaron 200 organismos por medio de una biometría previa para utilizar organismos entre 400 y 500 mg de peso. Hecha la selección, se distribuyeron en 20 tanques de manera aleatoria, a razón de 10 organismos por tanque y con 4 réplicas por cada alimento.

### **6.6.2 Condiciones de cultivo y monitoreo periódico**

Se realizó un monitoreo diario en la mañana (9:00 AM), el cual consistió en tomar primero las lecturas de temperatura y oxígeno disuelto con un oxímetro (YSI Modelo 57), la salinidad con un refractómetro (VISTA). Después se bajó el nivel de agua de los tanques al 80% para proceder a hacer el conteo de organismos, alimento residual, número de muertos y mudas, para terminar con un sifoneo retirando todo el alimento residual y material orgánico "sedimentado", llenando por último los tanques a flujo constante, pero lento. Se realizaron 4 biometrías para determinar el peso de los organismos al inicio, a los 15 días, a los 30 días y a los 41 para lo cual se utilizó una balanza (OHAUS) con precisión de 0.001 g. Primero se sacaron a los camarones de los tanques con una red, fueron colocados en cubetas con aireación, se secaron con papel absorbente, apoyados en un soporte de madera con malla, para ser pesados y reenviados al sistema. Al final del bioensayo, los organismos fueron clasificados y congelados a  $-18^\circ\text{C}$  para posteriores análisis.

El sistema de tanques funcionó con un recambio de agua/día de 80 %, temperatura  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  controlados independientemente con un calentador sumergible (EBO JAGGER) de 250 W, salinidad  $40 \pm 1 \text{‰}$ , oxígeno disuelto:  $> 4 \text{ mg/L}$  y se mantuvo un fotoperíodo de 12 horas: 12 horas de luz (06:00 a 18:00) y 6 horas de oscuridad, controlados por iluminación eléctrica con una red de 6 focos de 60 W distribuidos en el sistema y controlados por un reloj.

La alimentación de los organismos fue a saciedad aparente con dos raciones al día (10:00 y 17:00 horas) durante los 41 días. Al inicio del experimento se comenzó proporcionando 10% de la biomasa total en cada tanque y a partir del segundo día la alimentación se ajustó de acuerdo al alimento residual estimado en cada uno de los tanques.

### 6.6.3 Criterios de evaluación

Los criterios de evaluación biológica empleados durante el bioensayo fueron los siguientes:

#### Supervivencia (S):

$$S (\%) = \frac{Nf}{Ni} \times 100$$

De donde tenemos que: **Nf** es el número final de organismos y **Ni** es el número inicial de organismos.

#### Tasa de crecimiento porcentual (TC):

$$TC (\%) = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$$

De donde tenemos que: **Pf** es el peso final del organismo y **Pi** es el peso inicial del organismo.

#### Factor de conversión alimenticia (FCA):

$$FCA = \frac{\text{Alimento aparentemente consumido (g)}}{\text{Incremento en peso corregido* (g)}}$$

(\*) Incremento en peso corregido IPC =  $Bf + \frac{1}{2} (Ppf + Ppi) (Nm) - Bi$

Este factor corrige en función de la mortalidad, de acuerdo con Kitabayashi *et al.* (1971).

De donde tenemos que: **Bf** es la biomasa final, **Bi** es la biomasa inicial, **Ppf** es el peso promedio final, **Ppi** es el peso promedio inicial y **Nm** el número de muertos.

#### Eficiencia proteica (EP):

$$EP = \frac{\text{Incremento en peso corregido (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

#### Alimento consumido (mg/organismo/día):

$$\text{Alimento Consumido} = \frac{\text{Alimento total consumido}}{Ni + Nf/2 \times \text{tiempo (días)}}$$

#### **6.6.4 Análisis estadísticos**

Se comprobó la normalidad de los datos con un análisis de Chi cuadrada. Así mismo, se realizaron análisis de varianza de una vía para verificar si había diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). En caso se encontrar diferencias, se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre qué tratamientos había diferencias, con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa Statistica 7<sup>®</sup> (Stara Sofá, Inc. Tulsa, USA.)

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Conservación del extracto soluble de langostilla por diferentes métodos, y determinación de su vida de anaquel.

#### 7.1.1 Obtención del extracto de langostilla

Del proceso de prensado de 20 Kg de langostilla descongelada, se obtuvo un total de 9.6 Kg de extracto completo (ECL), con un rendimiento de 48%. A partir de este extracto, se obtuvo el extracto desgrasado (EDL). En la Tabla III se muestran los rendimientos de cada fracción.

**Tabla III.** Masa y rendimiento porcentual de las fracciones de langostilla obtenidas por prensado mecánico y centrifugación.

Producto	Masa total (g)	Rendimiento (%)	
		Respecto a la langostilla entera	Respecto al extracto (ECL)
Langostilla entera	20,000	-----	-----
Extracto completo	9,600	48.0	-----
Extracto desgrasado	5,900	29.5	61.4

El rendimiento del extracto desgrasado esta calculado respecto a la masa de langostilla entera.

En la Tabla IV se presenta la composición química proximal de la langostilla entera y de los extractos ECL y EDL.

**Tabla IV.** Composición química proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) de langostilla entera, extracto completo y desgrasado.

Tratamiento	Humedad (%)	Proteína cruda* (%)	Extracto etéreo* (%)	Fibra Cruda* (%)	Cenizas (%)	E. L. N. * (%)
Langostilla entera	62.95 ±0.45	37.57 ±0.3	17.17 ±0.3	8.70 ±0.4	26.87 ±0.36	62.95
Extracto completo	83.05 <sup>+</sup> ±0.62	36.79 ±0.00	13.78 ±0.69	N. A.	17.03 ±0.08	32.40
Extracto desgrasado	84.43 <sup>+</sup> ±0.8	53.50 ±0.08	0.05 ±0.01	N. A.	26.85 ±0.03	19.60

(\*) Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar.

(+) Calculado por diferencia de peso entre el extracto completo húmedo y después de ser liofilizado (3 réplicas).

N. A.: No analizado.

Se observa que la concentración de proteína se incrementó a 53% después del proceso de extracción (prensado) y desgrasado, mientras que el extracto etéreo disminuyó de 17.2% en la langostilla entera a 0.05% en el extracto desgrasado.

### 7.1.2 Caracterización de los extractos de langostilla

En la Tabla V se muestran los valores de pH, carotenos totales, y proteínas solubles de los extractos de langostilla, completo y desgrasado, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación. El pH del extracto desgrasado (7.8) es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) al del extracto completo (8.1). De manera similar, los carotenos totales y las proteínas solubles disminuyeron significativamente en el extracto desgrasado con respecto al extracto completo.

**Tabla V.** Valores de pH, carotenos totales, y proteínas solubles de los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación.

Extracto	pH	Carotenos totales (mg/mL)	Proteínas solubles (mg/mL)
Extracto completo	8.1±0.01 <sup>a</sup>	0.98±0.004 <sup>a</sup>	8.3±0.01 <sup>a</sup>
Extracto desgrasado	7.8±0.04 <sup>b</sup>	0.084±0.001 <sup>b</sup>	6.0±0.20 <sup>b</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla VI se presentan los valores de actividad de las enzimas digestivas de los extractos de langostilla completo y desgrasado. Se observa que una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), respecto a la actividad enzimática específica después de la centrifugación y separación parcial de lípidos del extracto.

**Tabla VI.** Actividad específica (U/mL) de enzimas digestivas en los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación.

Extracto	Actividad específica (U/mL)		
	Amilasa	Lipasa	Proteasa
Extracto completo	549.3±3.1 <sup>a</sup>	142.3±26.7 <sup>a</sup>	39.8±7.2 <sup>a</sup>
Extracto desgrasado	352.2±8.0 <sup>b</sup>	100.2±12.4 <sup>b</sup>	28.7±5.6 <sup>b</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores seguidos de letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla VII se muestra la presencia de microorganismos del extracto completo y del extracto desgrasado antes de aplicarle los métodos de conservación.

**Tabla VII.** Presencia de microorganismos en los extractos completo y desgrasado de langostilla, antes de aplicar los diferentes métodos de conservación.

Extracto	Medio de cultivo (UFC/mL)			
	Coliformes totales	YPD	2216	M1
Extracto completo	N. D.	$9.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$
Extracto desgrasado	N. D.	$1 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^2$

(UFC): unidad formadora de colonias; (YPD): medio de cultivo para hongos y levaduras totales; (2216): medio de cultivo para bacterias marinas; (M1): medio de cultivo para hongos y levaduras marinas. N. D.: UFC no detectadas.

### 7.1.3 Vida de anaquel

Las condiciones iniciales, tanto del extracto completo, como del desgrasado son los puntos de referencia para ver los cambios que sufrió el extracto desgrasado de langostilla después de cada uno de los tratamientos de conservación a lo largo de 12 semanas.

### Análisis químico proximal

En la Tabla VIII se muestra el contenido de humedad del extracto desgrasado de langostilla sometido a los diferentes métodos de conservación, a lo largo de doce semanas de almacenamiento. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de humedad del extracto respecto al tiempo y el método de conservación, y que hubo interacción entre el método de conservación vs tiempo.

**Tabla VIII.** Contenido de humedad del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	Humedad (%) <sup>a</sup>		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	$90.14 \pm 0.60^{A,a}$	$87.67 \pm 0.60^{B,b}$	$91.02 \pm 0.82^{A,a}$
Acidificado 4°C	$90.40 \pm 0.40^{A,a}$	$91.43 \pm 0.92^{A,a}$	$88.86 \pm 0.20^{B,b}$
Acidificado 27°C	$90.40 \pm 0.40^{A,a}$	$90.39 \pm 1.24^{A,a}$	$87.86 \pm 0.73^{B,b}$
Tratamiento térmico	$91.83 \pm 0.95^{A,a}$	$87.32 \pm 0.16^{B,b}$	$88.00 \pm 0.64^{B,b}$

<sup>a</sup> Calculado por diferencia de peso entre el extracto completo húmedo y después de ser liofilizado (3 réplicas). Valores promedio de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar.

En la Tabla IX se muestra el contenido de cenizas del extracto desgrasado de langostilla a lo largo de su almacenamiento durante doce semanas con diferentes métodos de conservación. El análisis estadístico mostró que existen diferencias

significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al método de conservación, el tiempo, y hay interacción método de conservación vs tiempo.

**Tabla IX.** Contenido de cenizas del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	Cenizas (%)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	26.85±0.03 <sup>A,a</sup>	25.86±0.43 <sup>A,b</sup>	24.21±0.01 <sup>B,c</sup>
Acidificado 4°C	26.74±0.08 <sup>A,a</sup>	23.53±0.07 <sup>B,b</sup>	21.64±0.11 <sup>C,c</sup>
Acidificado 27°C	26.74±0.08 <sup>A,a</sup>	23.76±0.05 <sup>B,b</sup>	20.55±0.08 <sup>D,c</sup>
Tratamiento térmico	23.98±0.39 <sup>C,c</sup>	25.61±0.69 <sup>A,b</sup>	27.09±0.19 <sup>A,a</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas entre las columnas indican la diferencia entre los tratamientos y las letras minúsculas entre filas indican las diferencias entre el tiempo de almacenamiento.

En la Tabla X se muestra el contenido de proteína cruda del extracto desgrasado de langostilla a lo largo de su almacenamiento durante doce semanas con diferentes métodos de conservación. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de proteína cruda entre los métodos de conservación y por tiempo, y hubo interacción método de conservación vs tiempo.

**Tabla X.** Contenido de proteína cruda del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	Proteína cruda (%)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	53.5±0.08 <sup>A,a</sup>	53.01±0.23 <sup>B,a</sup>	53.00±0.38 <sup>A,a</sup>
Acidificado 4°C	53.52±0.23 <sup>A,a</sup>	53.13±0.81 <sup>B,a</sup>	50.66±0.16 <sup>B,b</sup>
Acidificado 27°C	53.52±0.23 <sup>A,b</sup>	54.72±0.01 <sup>A,a</sup>	46.72±0.17 <sup>C,c</sup>
Tratamiento térmico	53.99±0.22 <sup>A,a</sup>	52.77±0.37 <sup>B,b</sup>	52.46±0.33 <sup>A,b</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

En la Tabla XI se muestra el contenido de extracto etéreo del extracto desgrasado de langostilla a lo largo de su almacenamiento durante doce semanas con diferentes métodos de conservación. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) por el método de conservación o el tiempo de almacenamiento, y que hubo interacción método de conservación vs tiempo.

**Tabla XI.** Contenido de extracto etéreo del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	Extracto etéreo (%)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	0.04±0.15 <sup>B,b</sup>	0.41±0.03 <sup>A,a</sup>	0.14±0.01 <sup>A,b</sup>
Acidificado 4°C	0.39±0.13 <sup>A,a</sup>	0.24±0.04 <sup>A,a</sup>	0.26±0.17 <sup>A,a</sup>
Acidificado 27°C	0.39±0.13 <sup>A,a</sup>	0.13±0.02 <sup>A,a</sup>	0.16±0.08 <sup>A,a</sup>
Tratamiento térmico	0.17±0.1 <sup>B,a</sup>	0.31±0.21 <sup>A,a</sup>	0.24±0.02 <sup>A,a</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

En la Tabla XII se muestra el contenido de extracto libre de nitrógeno del extracto desgrasado de langostilla a lo largo de su almacenamiento durante doce semanas con diferentes métodos de conservación.

**Tabla XII.** Contenido de extracto libre de nitrógeno del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	Extracto libre de nitrógeno (%)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	19.22	21.58	22.67
Acidificado 4°C	19.65	23.10	27.78
Acidificado 27°C	19.38	18.09	32.55
Tratamiento térmico	22.62	21.24	20.20

### Evaluación de pH

Los valores de pH de cada tratamiento se mantuvieron relativamente constantes durante las 12 semanas de almacenamiento. De acuerdo al análisis estadístico, por razones obvias, se encontraron diferencias significativas en los valores de pH respecto al método de conservación aplicado, aunque también hubo cambio de pH en el tiempo de almacenamiento para algunos tratamientos (ver Tabla XIII).

**Tabla XIII.** Valores de pH del extracto desgrasado de langostilla, sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Extracto	pH		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	7.80±0.04 <sup>B,a</sup>	7.63 ±0.02 <sup>B,a</sup>	7.73±0.01 <sup>B,a</sup>
Acidificado 4°C	4.30±0.03 <sup>C,a</sup>	4.39±0.01 <sup>C,a</sup>	4.24±0.15 <sup>C,a</sup>
Acidificado 27°C	4.30±0.03 <sup>C,a</sup>	4.06±0.05 <sup>C,b</sup>	4.07±0.08 <sup>C,b</sup>
Tratamiento térmico	8.07±0.03 <sup>A,a</sup>	8.03±0.03 <sup>A,a</sup>	8.12±0.04 <sup>A,a</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

### Carotenos totales

En la Tabla XIV se presenta la concentración de carotenos totales del extracto desgrasado de langostilla a lo largo de su almacenamiento durante doce semanas con diferentes métodos de conservación. De acuerdo al análisis ANOVA bifactorial, se encontraron diferencias significativas respecto a los tratamientos y el tiempo de almacenamiento. Se observa que hubo más pérdida de carotenos en el tratamiento térmico en la semana cero.

**Tabla XIV.** Concentración de carotenos totales en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Carotenos totales (mg/mL)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	0.084±0.001 <sup>B,a</sup>	0.033±0.01 <sup>B,b</sup>	0.029±0.001 <sup>B,b</sup>
Acidificado a 4°C	0.127±0.000 <sup>A,a</sup>	0.036±0.004 <sup>B,b</sup>	0.020±0.01 <sup>C,c</sup>
Acidificado a 27°C	0.127±0.000 <sup>A,a</sup>	0.039±0.004 <sup>B,b</sup>	0.033±0.01 <sup>AB,b</sup>
Tratamiento térmico	0.080±0.008 <sup>C,a</sup>	0.054±0.007 <sup>A,b</sup>	0.040±0.005 <sup>A,c</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

### Concentración de proteínas solubles

En la Tabla XV se muestran las concentraciones de proteínas solubles durante 12 semanas de almacenamiento. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas respecto al método de conservación y al tiempo de almacenamiento. Se observa que todos los tratamientos sufren la pérdida de proteínas solubles sin importar el método de conservación aplicado al extracto.

**Tabla XV.** Concentración de proteínas solubles en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Proteínas solubles (mg/mL)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	5.69±0.61 <sup>A,a</sup>	5.21±0.34 <sup>A,b</sup>	2.37±0.04 <sup>A,c</sup>
Acidificado a 4°C	5.30±0.18 <sup>B,a</sup>	5.37±0.06 <sup>A,a</sup>	1.15±0.03 <sup>BC,b</sup>
Acidificado a 27°C	5.30±0.18 <sup>B,a</sup>	1.63±0.02 <sup>C,b</sup>	0.41±0.06 <sup>C,c</sup>
Tratamiento térmico	4.29±0.03 <sup>C,a</sup>	3.12±0.15 <sup>B,b</sup>	1.46±0.06 <sup>B,c</sup>

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar, expresados en base seca.

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

Al inicio del almacenamiento, el tratamiento que mostró una mayor concentración de proteínas solubles fue el congelado y el de menor concentración fue el tratamiento térmico. A lo largo del tiempo de almacenamiento el tratamiento donde se observó una mayor degradación de proteínas solubles fue en el tratamiento acidificado a 27°C en la semana 12. Por otro lado, el tratamiento en donde se detectó una mayor concentración de proteínas solubles durante toda la vida de anaquel fue en el congelado.

### Actividad enzimática

#### Actividad específica de amilasa

La actividad enzimática tipo amilasa para el extracto sometido a diferentes métodos de conservación se muestra en la Tabla XVI. Se encontraron diferencias significativas en la actividad amilolítica respecto al método de conservación aplicado al extracto y al tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Se observa que el extracto con mayor actividad amilolítica durante todo el almacenamiento es el tratamiento congelado. Así mismo, se observa que el extracto acidificado y almacenado a 27°C, tuvo al final (semana 12) una mayor actividad enzimática en comparación del tratamiento acidificado y almacenado a 4°C.

Por otro lado, el extracto tratamiento térmico es el que mostró menor actividad enzimática durante todo el periodo de almacenamiento a diferencia de los otros tres métodos de conservación aplicados al extracto.

**Tabla XVI.** Actividad específica de amilasa (U/mL de extracto  $\pm$  desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Actividad específica de amilasa (U/mL de extracto)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	352.2 $\pm$ 5.7 <sup>A,a</sup>	241.6 $\pm$ 6.8 <sup>A,b</sup>	215.1 $\pm$ 15.8 <sup>A,b</sup>
Acidificado a 4°C	224.9 $\pm$ 2.3 <sup>B,a</sup>	222.7 $\pm$ 2.6 <sup>A,a</sup>	15.3 $\pm$ 15.3 <sup>B,b</sup>
Acidificado a 27°C	224.9 $\pm$ 2.3 <sup>B,a</sup>	134.9 $\pm$ 61.1 <sup>B,b</sup>	56.0 $\pm$ 66.8 <sup>B,c</sup>
Tratamiento térmico	24.0 $\pm$ 15.8 <sup>C,a</sup>	23.8 $\pm$ 24.8 <sup>C,a</sup>	12.2 $\pm$ 18.5 <sup>B,a</sup>

Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre los tiempos de almacenamiento.

### Actividad específica de lipasa

Se detectaron diferencias significativas para la actividad específica de la lipasa respecto al tiempo, al método de conservación, y a la interacción tiempo-método de conservación (Tabla XVII).

**Tabla XVII.** Actividad específica de lipasa (U/mL de extracto  $\pm$  desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Actividad específica de lipasa (U/mL de extracto)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	100.15 $\pm$ 12.3 <sup>A,a</sup>	72.63 $\pm$ 5.90 <sup>A,b</sup>	69.41 $\pm$ 20.28 <sup>A,b</sup>
Acidificado a 4°C	6.41 $\pm$ 2.87 <sup>B,a</sup>	1.52 $\pm$ 2.54 <sup>B,a</sup>	0.07 $\pm$ 0.22 <sup>C,a</sup>
Acidificado a 27°C	6.41 $\pm$ 2.87 <sup>B,a</sup>	2.33 $\pm$ 3.44 <sup>B,a</sup>	0.96 $\pm$ 1.47 <sup>C,a</sup>
Tratamiento térmico	2.44 $\pm$ 3.71 <sup>B,b</sup>	0.37 $\pm$ 0.56 <sup>B,b</sup>	24.04 $\pm$ 3.34 <sup>B,a</sup>

Las letras mayúsculas diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre las filas indican diferencias entre los tiempos de almacenamiento.

Se observa que el extracto con mayor actividad enzimática durante todo el almacenamiento fue el congelado a comparación de los otros tres extractos sometidos a diferentes métodos de conservación. Para el caso del tratamiento térmico, se observa que en la semana 12 tiene una actividad de 24.04U/mL de extracto, manifestando una mayor actividad enzimática que en la semanas 0 y 6, donde dicha actividad es poco detectada (2.44 y 0.37U/mL de extracto, respectivamente).

### Actividad específica de proteasa

Se encontraron diferencias significativas en actividad específica de proteasa respecto al método de conservación y a la relación método de conservación vs tiempo de almacenamiento; pero no hubo diferencias respecto al tiempo de almacenamiento (Tabla XVIII). Se observó que el extracto con mayor actividad proteolítica durante todo el tiempo de almacenamiento fue el extracto con tratamiento térmico, respecto del resto de los métodos de conservación. Por otro lado, el extracto acidificado y almacenado a 27°C fue el que presentó menos actividad enzimática tipo proteasa a partir de la semana 6 de almacenamiento. En la semana cero, el extracto congelado, fue el que mostró menor actividad proteolítica de los cuatro tratamientos aplicados. Así mismo, el extracto con tratamiento térmico, no tuvo actividad enzimática en la semana cero de su almacenamiento.

**Tabla XVIII.** Actividad específica de proteasa (U/mL de extracto  $\pm$  desviación estándar) del extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Actividad específica de proteasa (U/mL de extracto)		
	Semana 0	Semana 6	Semana 12
Congelado	28.67 $\pm$ 5.61 <sup>B,b</sup>	48.85 $\pm$ 4.49 <sup>A,a</sup>	31.52 $\pm$ 24.47 <sup>B,b</sup>
Acidificado a 4°C	45.15 $\pm$ 5.80 <sup>A,a</sup>	15.85 $\pm$ 1.07 <sup>B,c</sup>	32.33 $\pm$ 3.87 <sup>B,b</sup>
Acidificado a 27°C	45.15 $\pm$ 5.80 <sup>A,a</sup>	0.70 $\pm$ 1.18 <sup>C,b</sup>	0.11 $\pm$ 0.24 <sup>C,b</sup>
Tratamiento térmico	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>C,c</sup>	54.26 $\pm$ 4.54 <sup>A,b</sup>	70.04 $\pm$ 4.86 <sup>A,a</sup>

Las letras mayúsculas diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de conservación y las letras minúsculas entre las filas indican las diferencias entre los tiempos de almacenamiento.

### Análisis microbiológico

Al momento de realizar la determinación de microorganismos fecales, en el extracto desgrasado, se observó que no hubo presencia de dichos organismos, de manera que no se volvió a hacer este análisis al extracto sometido a los diferentes métodos de conservación. En la Tabla XIX se presentan los resultados de los análisis microbiológicos del extracto sometido a los diferentes métodos de conservación.

**Tabla XIX.** Carga microbiana de hongos y levaduras en el extracto desgrasado de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento.

Tratamiento	Medio de cultivo	Inicio (UFC/mL)	Semana 6 (UFC/mL)	Semana 12 (UFC/mL)
Congelado	YPD	$5.7 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^3$	$2.5 \cdot 10^3$
	2216	$1.2 \cdot 10^3$	$4.6 \cdot 10^4$	$8.2 \cdot 10^4$
	M1	$1.9 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^3$	$2.3 \cdot 10^3$
Acidificado 4°C	YPD	N. D.	$1.1 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^2$
	2216	N. D.	$1.1 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^3$
	M1	N. D.	$1.9 \cdot 10^3$	$1.6 \cdot 10^2$
Acidificado 27°C	YPD	N. D.	$1.4 \cdot 10^3$	$2.4 \cdot 10^2$
	2216	N. D.	$1.2 \cdot 10^3$	$5.3 \cdot 10^3$
	M1	N. D.	$7.7 \cdot 10^2$	$4.7 \cdot 10^2$
Tratamiento térmico	YPD	N. D.	$1.6 \cdot 10^2$	$6.6 \cdot 10^2$
	2216	N. D.	$1.4 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^3$
	M1	N. D.	$8.8 \cdot 10^1$	$5.5 \cdot 10^2$

(UFC): unidad formadora de colonias; (YPD): medio de cultivo para hongos y levaduras totales; (2216): medio de cultivo para bacterias marinas; (M1): medio de cultivo para hongos y levaduras marinas. N. D.: UFC no detectadas.

Se observó que al momento de acidificar y aplicar el tratamiento térmico al extracto, no se detectó la presencia de microorganismos. A partir de la semana 6, en los dos tratamientos acidificados y el tratamiento térmico se detectó la presencia de bacterias y levaduras.

Durante todo el tiempo de almacenamiento, en todos los tratamientos hubo crecimiento microbiano, el cual fue en aumento durante el período de almacenamiento. En todos los casos, las bacterias (medio 2216) en la semana 12 se manifestaron en mayor cantidad que el resto de los microorganismos en todos los tratamientos.

## 7.2 Inclusión de extractos de langostilla, obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento.

En la Tabla XX se muestran los resultados del análisis químico proximal de los alimentos utilizados en el bioensayo de crecimiento. La composición química proximal de los ingredientes se muestra en el ANEXO D.

**Tabla XX.** Composición química proximal (g/100 g de materia seca excepto humedad) e hidroestabilidad de los alimentos con inclusión de 1% de los extractos de langostilla utilizados en el bioensayo de crecimiento con juveniles *L. vannamei*.

DIETA	DC	DEC	DEA4	DEA27	DTT
Humedad (%)	5.87 ± 0.03	6.25 ± 0.03	6.15 ± 0.07	5.80 ± 0.04	6.30 ± 0.04
Proteína (%)	36.37 ± 0.43	36.03 ± 0.14	36.59 ± 0.14	36.59 ± 0.14	36.72 ± 0.04
Extracto	9.84 ± 0.08	9.29 ± 0.18	10.50 ± 0.17	10.50 ± 0.17	9.56 ± 0.17
Etéreo (%)					
Cenizas (%)	9.33 ± 0.08	9.53 ± 0.03	9.46 ± 0.03	9.38 ± 0.03	9.66 ± 0.23
Fibra cruda (%)	0.67 ± 0.09	0.64 ± 0.06	0.63 ± 0.06	0.69 ± 0.01	0.62 ± 0.08
E. L. N. (%)	43.79	44.51	42.82	42.84	43.44
Energía (cal/g)	4556 ± 6.66	4504 ± 7.78	4440 ± 8.21	4480 ± 11.93	4529 ± 18.77
Hidroestabilidad	74.90 ± 1.2	74.80 ± 0.80	75.5 ± 1.3	76.26 ± 1.00	75.00 ± 0.11

(DC): Dieta control; (DEC): Dieta con extracto congelado a -2°C; (DEA4): Dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a 4°C; (DEA27): Dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a 27°C; (DTT): Dieta con extracto con tratamiento térmico a 121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>

Valores promedio ± desviación estándar de 3 réplicas.

E. L. N.: extracto libre de nitrógeno.

Los alimentos fabricados fueron isoproteicos, ya que su contenido de proteína varió de 36.0 a 36.7%, mientras que el contenido de extracto etéreo varió ligeramente de 9.3 a 10.5%. El contenido de cenizas y fibra fue muy similar entre los alimentos, y éstos fueron isoenergéticos, presentando un máximo de 4,556 cal/g el alimento DC y un mínimo de 4,440 cal/g el alimento DEA4. La hidroestabilidad de los alimentos varió ligeramente de 74.8 a 76.26% de materia seca.

### 7.2.1 Criterios de evaluación

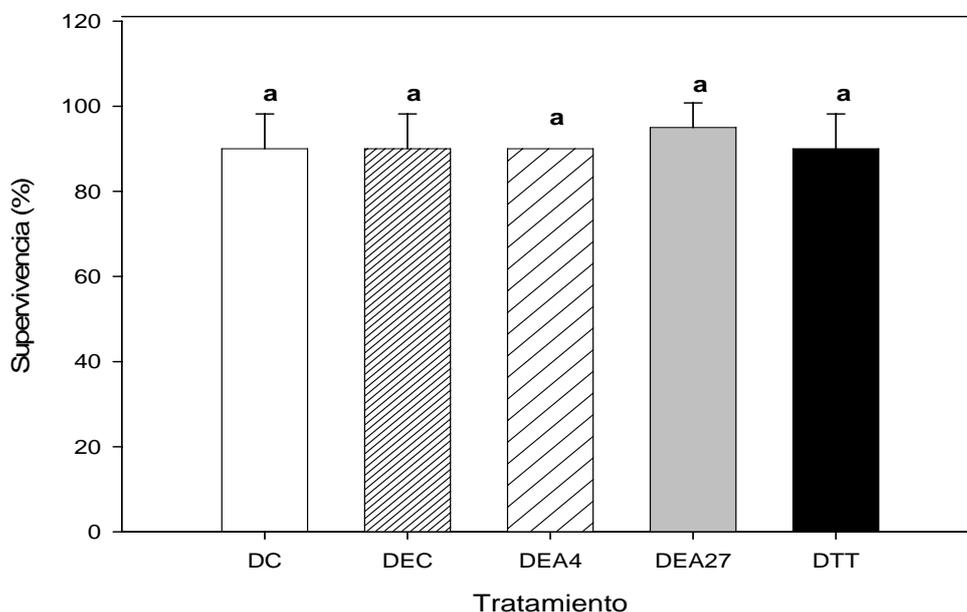
En la Tabla XXI se muestran los resultados zootécnicos al final del bioensayo de crecimiento. Los resultados parciales a los días 15 y 30 del bioensayo se muestran en el Anexo F.

**Tabla XXI.** Resultados zootécnicos al final del bioensayo de crecimiento con juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DIETA	Supervivencia (%)	Tasa de crecimiento (%)	Peso promedio final (g)	Alimento aparentemente consumido (mg/org/día)	FCA	Eficiencia proteica
<b>DC</b>	90.0 ±8.2	753.6 ±101.0	3.8 ±0.4	45.3 ± 8.7	2.7 ±0.2	1.10 ±0.1
<b>DEC</b>	90.0 ±8.2	784.1 ±74.2	4.0 ±0.4	49.9 ± 2.0	3.0 ±0.1	1.00 ±0.03
<b>DEA4</b>	90.0 ±0.0	740.8 56.4	3.8 ±0.3	47.4 ± 4.7	2.8 ±0.3	1.06 ±0.1
<b>DEA27</b>	95.0 ±5.8	910.9 85.60	4.5 ±0.4	47.2 ± 5.1	2.8 ±0.2	1.6 ±0.1
<b>DTT</b>	90.0 ±8.2	724.9 ±162.50	3.7 ±0.7	47.6 ± 3.1	2.9 ±0.3	1.02 ±0.1

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a -2°C. DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a 4°C. DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a 27°C. DTT: dieta con extracto con tratamiento térmico a 121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Valores promedio de 4 réplicas ± desviación estándar. No se detectaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos para ninguno de los criterios de evaluación.

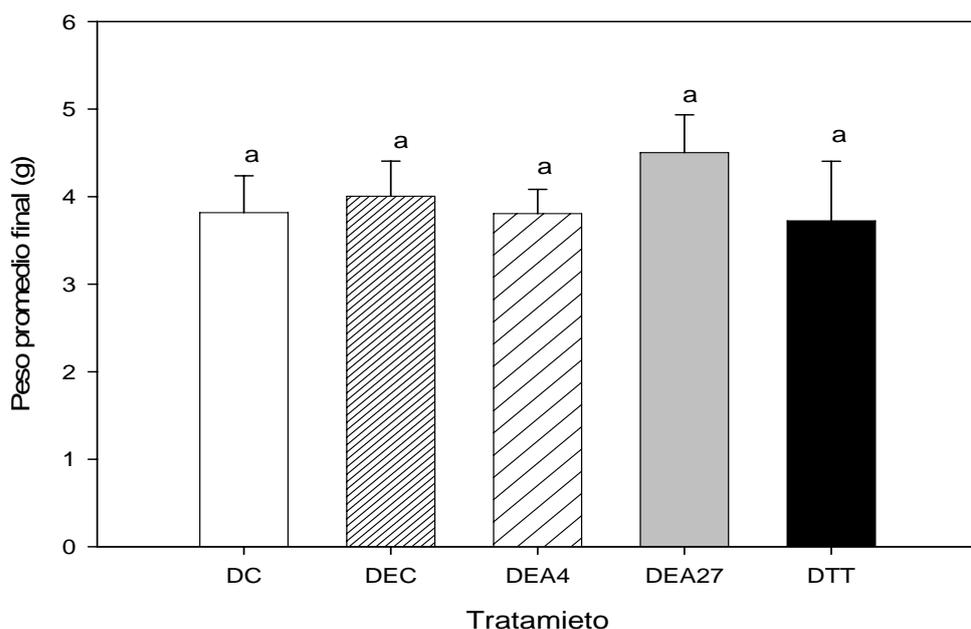
La supervivencia final fue mayor a 90% con todos los tratamientos y no se detectaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el tratamiento control (DC) y los alimentos que contenían 1% de los extractos de langostilla (Fig. 9).



**Figura 9.** Supervivencia final (%) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DTT: dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p>0.05$ ).

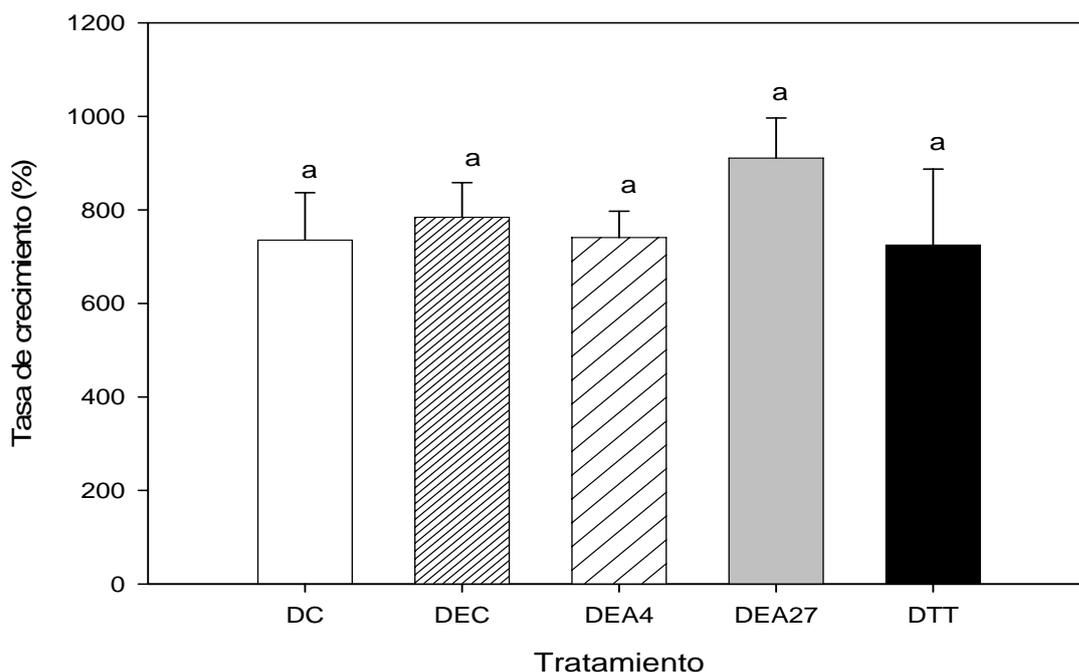
La Figura 10 muestra el peso promedio de los organismos al final del bioensayo de crecimiento. El peso promedio final varió de 3.7 g en la dieta DTT a 4.5 g con la dieta DEA27. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) entre ninguno de los tratamientos alimenticios durante el tiempo de experimentación.



**Figura 10.** Peso promedio final (g) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DEE: dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $15\text{ lb/pulg}^2$ . Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p>0.05$ ).

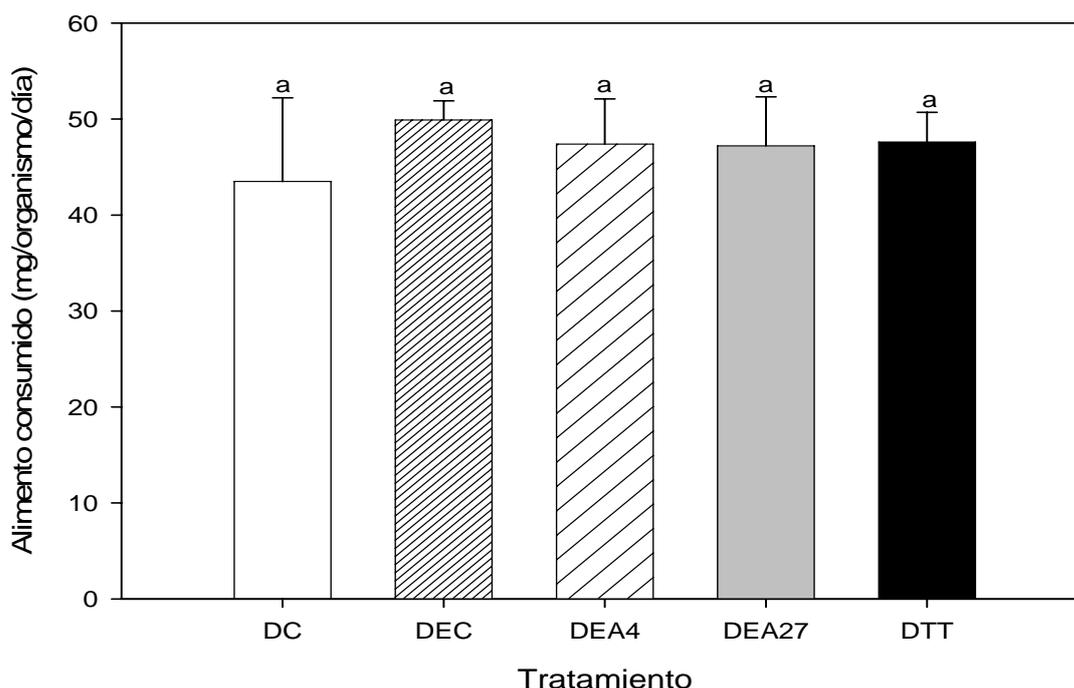
En la Figura 11 se muestran los resultados de la tasa de crecimiento (%) de juveniles en el bioensayo de crecimiento. La dieta DEA27 tuvo la mayor tasa de crecimiento de (911%), mientras que la dieta DTT tuvo el valor más bajo (725%), pero no se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos alimenticios.



**Figura 11.** Tasa de crecimiento final (%) de juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DEE: dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $15\text{ lb/pulg}^2$ . Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

En la Figura 12 se muestran los valores de alimento aparentemente consumido (g) por los organismos al día. El consumo de todos los alimentos que contenían extractos de langostilla fue mayor al del alimento control, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ninguno de los tratamientos alimenticios.



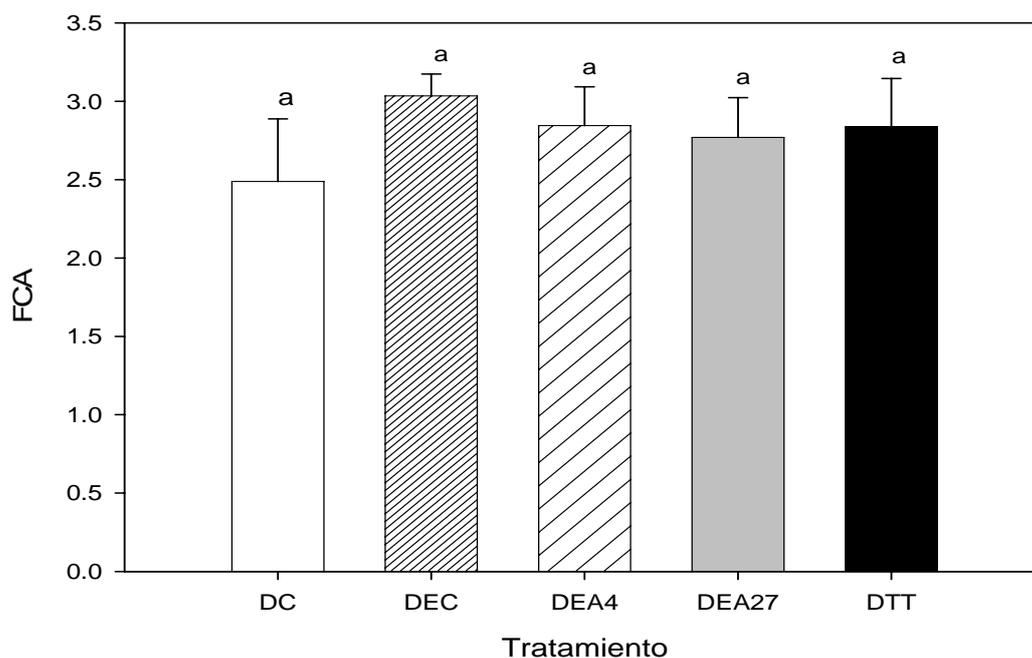
**Figura 12.** Alimento aparentemente consumido (mg/org./día) por juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 41 días con dietas que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DTT: dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

El valor máximo de alimento consumido se encontró en el tratamiento DEC (49.9 mg/org./día) y el más bajo con el alimento control (45.3 mg/org./día), mientras que los tratamientos DEA4, DEA27 y DTT tuvieron valores muy semejantes entre sí, y ligeramente superiores a 47 mg/org./día.

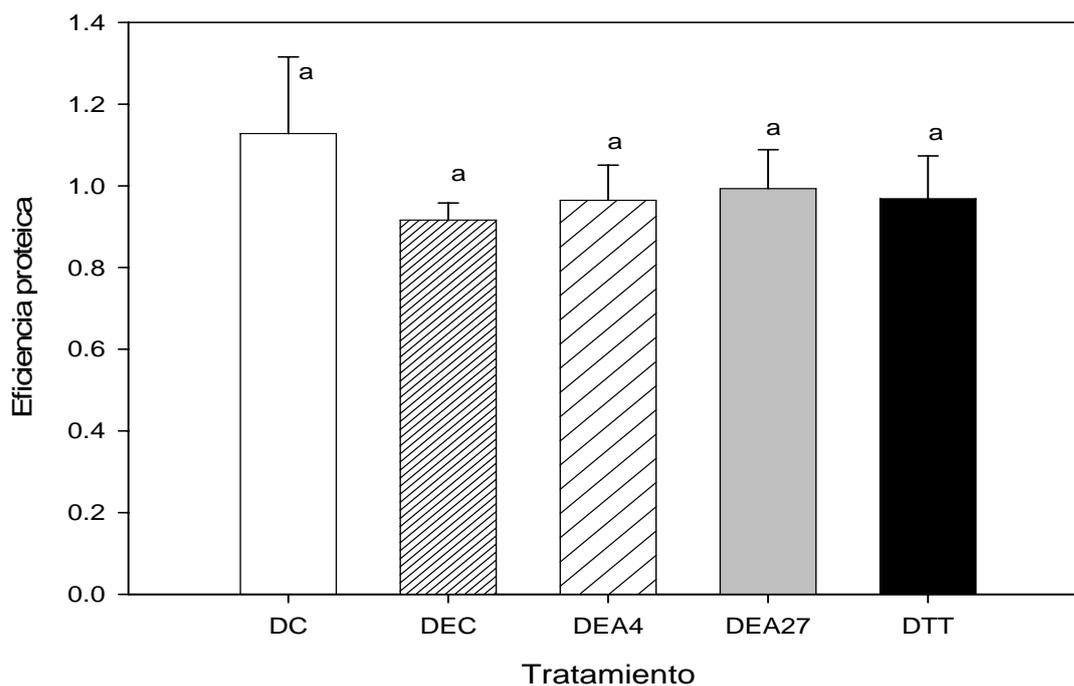
En las Figuras 13 y 14 se muestran el factor de conversión alimenticia aparente y la eficiencia proteica, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) respecto a la dieta control en ninguno de los dos parámetros zootécnicos.

El FCA más alto se presentó en el tratamiento DEC con un 2.9 y el más bajo (2.7) en el tratamiento CD. Para el caso de la eficiencia proteica, el valor máximo fue para el tratamiento DEA27 (1.06) y el más bajo fue en la dieta DC con un valor de 1.00.



**Figura 13.** Factor de conversión alimenticia final de los alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DTT dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $15\text{ lb/pulg}^2$ . Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 14.** Eficiencia proteica final de los alimentos que contienen 1% de los extractos de langostilla sometidos a diferentes métodos de conservación.

DC: dieta control. DEC: dieta con extracto congelado a  $-2^{\circ}\text{C}$ . DEA4: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . DEA27: dieta con extracto acidificado a pH 4.3 y almacenado a  $27^{\circ}\text{C}$ . DTT dieta con extracto con tratamiento térmico a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $15\text{ lb/pulg}^2$ . Valores promedio de 4 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Evaluación del extracto desgrasado de langostilla conservado con diferentes métodos

Vega-Villasante y colaboradores (2002) proponen que el extracto de langostilla puede ser utilizado en los alimentos para camarón como aditivo por la variedad de componentes no nutricios que contiene. Galicia-González (2001) encontró que un hidrolizado enzimático de langostilla tiene propiedades atrayentes en alimentos para camarón. Sin embargo, estos tipos de extractos tienen gran cantidad de actividad de agua si no son debidamente deshidratados o estabilizados. De acuerdo a Zhang y colaboradores (2002) la desventaja de utilizar este tipo de productos es su rápida descomposición, precisamente por la presencia de agua, la cual favorece la proliferación de microorganismos y la modificación de sus propiedades fisicoquímicas y calidad nutricia. En el presente estudio se propuso aplicar diferentes métodos de conservación que evitaran o reducirían la degradación de un extracto desgrasado de langostilla con la intención de preservar sus propiedades y evitando la proliferación de microorganismos. Sin embargo, la aplicación de un método de conservación altera las condiciones iniciales de los componentes del extracto. El manejo, almacenaje y embalaje, tanto de los ingredientes como de los alimentos formulados, hacen que con el tiempo se pierda su valor nutricional inicial (Díaz *et. al*, 2004; Singh, 2000).

#### **Rendimiento y composición proximal**

Dada la preocupación por mejorar la calidad en la alimentación de los camarones de cultivo, se han buscado nuevas alternativas con el propósito de mejorar el consumo del alimento suministrado y al mismo tiempo que los organismos alcancen tallas máximas en el menor tiempo posible. De ahí que surja la inquietud de buscar nuevas alternativas para la mejora de los alimentos formulados para animales de cultivo.

La langostilla roja *P. planipes* ha sido estudiada con el fin de ser utilizada como un insumo en la acuicultura ya sea como ingrediente o como aditivo para mejorar las condiciones de los alimentos formulados (Vega-Villasante *et al.*, 2004). Sin embargo, para que un recurso natural sea considerado viable para su explotación, debe tomarse en cuenta la disponibilidad del mismo y la factibilidad de su explotación. En la Tabla III se muestra que el rendimiento porcentual del extracto completo de langostilla respecto a la langostilla entera es aproximadamente del 50%. Así mismo, el rendimiento del extracto desgrasado de langostilla respecto al extracto completo de langostilla es del 60%, es decir, más de la mitad del total del extracto; estos cálculos resultan positivos si se considera utilizar a la langostilla como un insumo ya que aún después de la

realización de operaciones unitarias, el rendimiento que se obtiene es relativamente alto en términos de peso; lo que nos da una aceptable viabilidad técnica de disponer del recurso.

Aurioles-Gamboa (1995) menciona que la langostilla roja es un recurso abundante, pero no explotado, y posteriormente, Vega-Villasante y colaboradores (2002) proponen utilizarla de manera industrial en acuicultura. Sin embargo, aunque estos autores mencionen tanto las mejores temporadas de captura y su utilización dentro del campo de la acuicultura, valdría la pena hacer un estudio de costo-beneficio de lo que representaría su explotación y su aplicación ya formalmente en la industria de alimentos balanceados.

Por otro lado, el análisis de la composición química proximal del extracto arroja datos interesantes, ya que son un punto de referencia para poder utilizar la langostilla como aditivo o como un ingrediente. Sin embargo, es importante hacer el seguimiento de las pérdidas generales que va sufriendo la langostilla y el extracto, por las operaciones unitarias realizadas para la obtención del mismo. Castro-González y colaboradores (1995) realizaron un estudio sobre la composición proximal de la langostilla entera sometida a varios tratamientos, y mencionan que dicha composición varía de acuerdo a los tratamientos a los que ésta sea sometida.

De acuerdo a la Tabla IV, en la composición proximal de la langostilla, el porcentaje de fibra cruda es de 8.7%. Estos valores son menores a los reportados por Castro-González y colaboradores (1995); ellos reportan un porcentaje de fibra de 12.4%. De acuerdo a los autores antes mencionados, encontrar un porcentaje alto en fibra cruda es válido ya que la langostilla, al ser un crustáceo, contiene un exoesqueleto con una alta concentración de quitina; la cual es el componente principal del exoesqueleto de dichos organismos. Este compuesto es considerado un derivado de polisacáridos formado por unidades de N-acetil-glucosamina en enlaces  $\beta$  (1-4). Sin embargo, en los resultados de la Tabla IV se observa que los porcentajes de fibra son algo bajos. Ahora bien, este fenómeno se puede atribuir a la variación estacional y al lugar de muestreo, y a la talla de captura. De acuerdo a Aurioles-Gamboa (1995), la langostilla roja tiene una distribución amplia por la costa Oeste de Baja California. Así mismo, Castro-González y colaboradores (1995) hacen hincapié en establecer la época y zona de captura para llevar a cabo una explotación razonable que permita utilizar a la langostilla como un recurso para la alimentación tanto humana como animal.

Para el caso del extracto completo y extracto desgrasado de langostilla, no se pudo analizar el contenido de fibra cruda. Vega-Villasante y colaboradores (2002) presentaron un análisis proximal del extracto completo de langostilla liofilizado donde

reportan un porcentaje de fibra cruda de 0.04% el cual es muy pequeño a comparación del resto de los componentes del extracto lo que indica que la fibra se mantiene en los residuos sólidos (prensado de langostilla), los cuales podrían ser empleados para la obtención de quitina y quitosana, que son productos con alta demanda en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y otras.

En la Tabla IV, se observa que el porcentaje de proteína cruda para la langostilla entera fue de 37.6%, semejante al reportado por Goytortúa-Bores y colaboradores (2006) para una harina de langostilla utilizada como sustituto de harina de pescado en alimentos para camarón. Estos autores proponen utilizar a la langostilla como un sustituto parcial de la harina de pescado. Para el caso de nuestro estudio, este valor no es tan trascendental como el porcentaje de proteína cruda de los extractos. De acuerdo a Castro-González y colaboradores (1995), la composición química de la langostilla también se ve afectada por el tratamiento al que esté sometido. En la misma Tabla IV se observa que hay una variación en la composición de los extractos después de haber desgrasado el extracto completo. Éste contenía 36.8% de proteína, muy semejante al reportado para la langostilla entera, pero al momento de someterlo a una centrifugación, el extracto aumenta su porcentaje a 53.5%. Este efecto es importante resaltarlo ya que de acuerdo a Vega-Villasante y colaboradores (2002) el extracto de langostilla contiene sustancias solubles en agua capaces de ejercer efectos positivos (alcanzar la talla máxima en menos tiempo) en el camarón de cultivo y mejorar su salud. Estos componentes químicos son en su mayoría proteínas (enzimas digestivas y antioxidantes) y péptidos tipo insulina, por mencionar algunos; los cuales se ven concentrados en el extracto desgrasado.

Otro dato a resaltar es el contenido de extracto etéreo, el cual disminuyó a 0.05%, lo cual indica que la técnica de separación de lípidos por centrifugación es adecuada.

En general, se observa que aunque únicamente se realicen dos operaciones físicas al extracto, desde su obtención por prensado, hasta el desgrasado, se tiene un efecto marcado en su composición proximal, con lo que las características químicas como físicas del extracto original cambian, y por lo tanto, es posible que se manifiesten distintos efectos al momento de utilizarlo en alimentos para animales.

### **Caracterización del extracto de langostilla**

Es importante conocer las condiciones iniciales tanto del extracto completo de langostilla como del extracto desgrasado de langostilla, ya que son fundamentales para ver los posibles cambios en el extracto después de su manejo, ya que esto tiene influencia en el costo-beneficio para poder utilizarlo como insumo. De acuerdo a Singh

(2000) parte de la pérdida de las propiedades de los alimentos se da en el procesamiento, en donde se deben tomar en cuenta las condiciones del ambiente, tales como la temperatura y la calidad de luz, por mencionar algunas.

En el caso de los carotenos totales, en la Tabla V se observa que con la centrifugación se pierde el 90% de los carotenos. Al eliminar los lípidos del extracto completo, se disminuye el efecto que puede tener este, tal como lo mencionado por Vega-Villasante (2003) en relación al beneficio proporcionado por los carotenos como la astaxantina libre (Coral-Hinostroza, 2000) o los ácidos grasos presentes en la langostilla (Villarreal, 1995). Al momento de desgrasar el extracto, gran parte de los carotenos permanecen en el aceite de langostilla. Esto es porque los carotenos son moléculas hidrofóbicas los cuales por su estructura química y propiedades físicas son insolubles en agua, pero solubles en solventes (Badui, 1999).

De acuerdo a los resultados de este estudio, se observa que en el extracto desgrasado de langostilla hay 1% aproximadamente de carotenos totales. Esto puede deberse a que hay carotenos que se encuentran asociados a proteínas y a la fracción lipídica que permanece en el extracto, aún después de haberlo centrifugado (Coral-Hinostroza, 2000). Es por esta razón, todavía después de desgrasar el extracto se detectan carotenos totales.

La concentración de proteínas solubles del extracto desgrasado de langostilla es menor a la del extracto completo de langostilla (6.0 y 8.3 mg/mL de extracto, respectivamente). La reducción de proteínas solubles observada es posible explicarla debido al manejo que tuvo el extracto antes de realizar los análisis químicos. Hay que recordar que el extracto tiene un alto contenido de agua y que los componentes de éste, entre otros, proteínas y enzimas, son vulnerables a la degradación favorecida por cambios de temperatura y por la manipulación para la obtención del extracto. De acuerdo a la metodología para la obtención del extracto completo, se fueron prensando lotes de 700 g de langostilla aproximadamente hasta completar 20 kg. Como la caracterización se realizó sobre el volumen de extracto, una vez que se habían terminado de prensar los 20 Kg de langostilla; el extracto sufrió una manipulación y un tiempo de almacenamiento previo a ser sometidos a los métodos de conservación, los cuales posiblemente pudieron afectar la concentración original de proteínas solubles. Esto se ve reflejado en la concentración de las proteínas y en la actividad enzimática del extracto después de haber sido desgrasado el extracto completo (Tablas V y VI).

El extracto completo de langostilla sufre también otros cambios en su composición al momento de extraer el aceite. Este efecto se ve reflejado en los valores de pH. De acuerdo a la Tabla V, hay una disminución de pH que trae consigo una

mayor acidez en el extracto. Este efecto es importante recalcarlo, ya que este compuesto contiene una serie de biomoléculas sensibles a las variaciones de pH, como es el caso de las enzimas, las cuales, al momento de desgrasar, pueden incrementar su actividad enzimática o ser inhibida, según sea el caso (Stryer, 2005). Este efecto dependerá del pH óptimo de cada una de las enzimas participantes. Si esta actividad enzimática es mayor, al disminuir el pH a 7.8, provocará en el extracto una degradación más agresiva que a un pH de 8.1. Es por esta razón, que uno de los métodos de conservación que se plantean aplicar más adelante es una acidificación, con la intención de inhibir enzimas que autodestruyen el extracto.

Para poder utilizar el extracto como un insumo, se deben de tomar en cuenta las condiciones sanitarias del producto. En las Normas Oficiales Mexicanas se hace mención a dichas condiciones. De acuerdo a la Norma Oficial NOM-021-PESC-1994, la cual regula alimentos balanceados, ingredientes y los productos alimenticios no convencionales utilizados en la acuicultura y el ornato, menciona que los alimentos e ingredientes deben estar libres de coliformes fecales. Para el caso de los dos extractos, no se detectó la presencia de UFC de coliformes totales (ver Tabla VII). Esto es muy positivo si se desea explotar como recurso ya que al no existir dichos microorganismos, no hay que adicionar al proceso y costo de producción, la eliminación de dichos organismos.

Se detectaron mesofílicos aerobios (bacterias con capacidad de crecer en medio 2216), así como mohos y levaduras (medio YPD y M1). Aún sin aplicar un método de conservación que detuviera la actividad microbiana, los dos extractos no rebasan el límite máximo permitido de carga microbioana; de acuerdo a la Norma Oficial, que dice que no se debe rebasar el valor de  $1 \cdot 10^4$  UFC/mL. En el extracto desgrasado de langostilla se presentaron valores de:  $9 \cdot 10^2$ ;  $2 \cdot 10^3$  y  $2.1 \cdot 10^3$  para YPD, 2216 y M1, respectivamente, por lo que puede considerarse apropiado para su uso en la alimentación de animales cultivados.

## **Vida de anaquel**

### **a) Composición proximal**

En el caso del contenido de humedad, conforme va pasando el tiempo se observa que todos los tratamientos pierden agua. Para el caso de los alimentos congelados, las bajas temperaturas hacen que se formen cristales con lo que van perdiendo agua, al mismo tiempo aumenta la concentración de solutos en el líquido no congelado y con lo cual, se rompen células tisulares (Desorier, 2000). Al momento de acidificar el extracto con ácido acético, sufre alteraciones las cuales provocan un

incremento en la humedad del extracto en la semana 6 de su almacenamiento, sin embargo, no es una variación significativa hasta la semana 12 de su almacenamiento, donde ya se observa una humedad 88% aproximadamente en los dos extractos acidificados. A lo largo del tiempo de almacenamiento, todos los extractos pierden agua en donde los cuatro tratamientos reportan una humedad aproximada de 90%. Este efecto posiblemente es provocado por la evaporación de agua durante el tiempo de almacenamiento del extracto (ver Tabla VIII).

En cuanto al contenido de cenizas, se observó que hay variaciones en relación al método de conservación aplicado y al tiempo de almacenamiento. Este efecto puede deberse al tratamiento al que el extracto fue sometido. Se puede observar en la Tabla IX que al inicio del almacenamiento el extracto sometido a un tratamiento térmico tuvo menor contenido de cenizas con respecto a los otros tres. Este efecto varía en la semana 6, en donde se observa que hay mayor proporción de cenizas en el extracto congelado y con el tratamiento térmico. Ahora bien, la composición proximal está calculada en porcentajes, es decir que al momento que se altera un componente se altera la proporción del resto de los otros, así pues, al aplicar diferentes tratamientos al extracto, la respuesta en relación a su composición proximal puede verse afectada significativamente (Castro-González, 1995; Desorier, 2000).

En el caso del contenido de proteína cruda, se observa que al inicio, el extracto que contiene un porcentaje más elevado es el extracto sometido al tratamiento térmico. Así mismo, se observa que respecto al tiempo de almacenamiento, este porcentaje en este tratamiento disminuye, ya que pasa de un valor de 59% a 52%. Este mismo efecto se observó e inclusive más marcado en el tratamiento acidificado a 27°C en donde al inicio del almacenamiento hay un contenido de 53.5% de proteína cruda, y en la semana 12 se encontró en 46.6% (ver Tabla X). En general, en todos los tratamientos, excepto en el congelado, se observa una disminución en el porcentaje de proteína cruda. El efecto del almacenamiento provoca una degradación, la cual viene dada por la actividad de las enzimas presentes en el extracto o la presencia de carga microbiana que esté utilizando la proteína como sustrato y ejerciendo un efecto negativo en la calidad nutricia del extracto.

En relación al extracto etéreo, se observa en la Tabla XI que se detecta un porcentaje muy pequeño de lípidos totales, el cual a través del tiempo no tiene un cambio significativo, esto es importante por dos cosas: en primer lugar, indica que el proceso mecánico para desgrasar el extracto es efectivo, y por otro lado, indica que los métodos de conservación no afectan a la porción lipídica del extracto o que al ser tan pequeña, los cambios no son detectables por el método empleado.

### **b) Evaluación de pH**

Se observó que el pH de los extractos se mantuvo constante durante todo el tiempo de almacenamiento (ver Tabla XIII), lo cual es adecuado, ya que de acuerdo a los estatutos propuestos por la Federal Drug Administration de Estados Unidos (FDA, 2000) en el código de regulaciones federales (Título 21 parte 113), los alimentos acidificados deben mantener su pH por debajo de 4.6. El que los extractos mantengan su pH constante durante el tiempo que permanezcan almacenados es muy importante, en especial en los alimentos acidificados ya que una variación drástica de pH provoca el incremento de carga microbiana y, en el menor de los casos, un cambio en la apariencia del producto hasta provocar su deterioro.

### **c) Concentración de carotenos totales**

En la Tabla XIV se observa que las concentraciones de carotenos al inicio del almacenamiento son diferentes entre los tratamientos de conservación, inclusive, se observa que al añadir ácido acético al extracto, se incrementa la concentración de carotenos. Este efecto puede deberse a que al ser carotenos asociados a proteínas, al disminuir el pH hay una desnaturalización de proteínas, lo cual puede influenciar en la percepción de incremento en la concentración de carotenos (Von-Elbe y Schwartz, 1996). Este incremento puede ser causado por la inactivación de la enzima lipoxigenasa presente en los tejidos que contienen carotenos, la cual cataliza la descomposición oxidativa de los carotenos.

Así mismo, el extracto sometido a un tratamiento térmico sufre un decremento en su contenido de carotenos a lo largo del tiempo de almacenamiento. Von-Elbe y Schwartz (1996), mencionan que los carotenos son sensibles a los cambios de temperatura, de manera que el decremento presentado en la concentración de los carotenos totales en el extracto con tratamiento térmico, se debe a la degradación por calor que sufrieron los carotenos totales.

### **d) Proteínas solubles**

En todos los tratamientos hay un decremento en la concentración de proteínas solubles. El tratamiento que mostró un mayor deterioro fue el extracto acidificado y almacenado a 27°C, en el que se encontró en la semana 12 una concentración de proteínas solubles de 0.41mg/mL (ver Tabla XV). Este efecto se debe posiblemente a la variación de pH en los extractos. De acuerdo a Lehninger (1993) la variación de pH en las proteínas solubles, altera su estructura terciaria, inclusive hasta su desnaturalización. Como consecuencia de esta desnaturalización, las proteínas sufren una alteración conocida como coagulación y, finalmente, una precipitación. Así mismo,

para el caso del tratamiento acidificado a 4°C pudo retrasar la desnaturalización de las proteínas por más tiempo (por acción microbiana) a diferencia del acidificado a 27°C. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla V, las proteínas solubles del tratamiento acidificado a 27°C fueron las que sufrieron una mayor degradación desde la semana 6. El decremento en la concentración de proteína entre la semana cero y la 6 fue muy marcado (de 5.30 a 1.63 mg/mL) y continuó hasta la semana 12 en donde prácticamente llegan a desaparecer. En general, se observa que la concentración de proteínas solubles decrece con respecto al tiempo de almacenamiento. Este efecto es de esperarse más marcadamente en el extracto congelado y en los acidificados a 4°C y 27°C, pero no en el extracto tratado térmicamente, el cual pasó por un proceso de esterilización al inicio, y donde las proteínas solubles desde el principio ya deberían estar desnaturalizadas. El extracto con tratamiento térmico presenta, una concentración relativamente baja de proteínas solubles. De acuerdo a Desorier (2000), las proteínas sufren un proceso de desnaturalización la cual se puede llevar a cabo por calor en presencia de humedad. Cuando las proteínas son desnaturalizadas, pierden su función biológica por la pérdida de su configuración de la molécula nativa. Sin embargo, en el presente trabajo, aún después del tratamiento térmico, se observa una disminución de proteínas solubles durante el almacenamiento (ver Tabla XV). Esto se puede deber a un manejo inadecuado, donde se encontró actividad microbiana en este tratamiento, lo cual puede explicar la disminución tanto de proteínas solubles como de actividad enzimática para este tratamiento, como se discutirá más adelante.

Finalmente, se esperaría que en el congelado no hubiese tanta pérdida de proteínas solubles. Aunque la congelación es un método de conservación que detiene el deterioro de los alimentos por la disminución de la temperatura (Singh, 2000); al momento de descongelar el extracto para ser utilizado, hay posibilidad de degradación proteica por la actividad enzimática y microbiana, provocando el descenso de la cantidad de proteínas presentes.

### **e) Actividad enzimática**

#### **- Actividad específica de amilasa**

En la Tabla XVII se muestran los valores de actividad enzimática de amilasa. Se observa como en los análisis anteriores, al momento de aplicar el tratamiento térmico o de acidificación a los extractos, la actividad enzimática disminuye. Los extractos menos afectados fueron los tratamientos acidificados, mientras que el más afectado fue el del tratamiento térmico. Como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, el tratamiento térmico provoca la pérdida de la estructura nativa de las proteínas que provoca la pérdida de su función biológica (Desorier, 2000). Sin embargo, aunque es poca la actividad enzimática en este tratamiento a lo largo de su almacenamiento, se detecta actividad amilolítica, pero no es un cambio significativo a través del tiempo de almacenamiento. Este efecto se debe posiblemente a la actividad enzimática provocada por la carga microbiana contaminante en el extracto, incorporada después del tratamiento térmico, como se mostrará más adelante. En esa misma Tabla, se observa que el extracto acidificado a 4°C no pierde su actividad amilolítica en la sexta semana de almacenamiento, sino es hasta la semana 12 en donde la actividad amilolítica se disminuye a más de la mitad. Ahora bien, ciertamente hay actividad enzimática, el problema es que con este método experimental, no se puede distinguir si estas enzimas pertenecen al extracto o a la carga microbiana generada en el mismo durante el almacenamiento.

#### **Actividad específica de lipasa**

En relación a la actividad lipolítica, se observa que al aplicar tanto un tratamiento acidificado como uno térmico, hay una pérdida muy progresiva de la actividad enzimática. En la Tabla XVIII se presentan los resultados de la actividad lipolítica de los extractos sometidos a los diferentes métodos de conservación. Al momento de acidificar los extractos y de aplicar tratamiento térmico, la actividad enzimática disminuye de 100 U/mL de extracto hasta 6.4 y 2.4 U/mL respectivamente.

El efecto provocado por la acidificación puede ser la desnaturalización de las lipasas por cambio de pH. De acuerdo a Whitaker (1996) el pH óptimo de la lipasa pancreática es neutro (pH 7.0). Para el caso de los camarones peneidos, Forrellat-Barrios y colaboradores (2004) mencionan que las lipasas presentes en *Litopenaeus vannamei* y *Farfantepenaeus notialis* presentan su máxima actividad a pH 8, mientras que para el caso de *Farfantepenaeus californiensis* se registra un máximo de actividad tipo lipasa a pH de 9 y 11. El pH al que está sometido el extracto es de 4.3, posiblemente esta disminución de pH en los extractos influyó la desaparición de la actividad de las lipasas en los tratamientos antes mencionados.

### **Actividad proteolítica**

Al inicio del almacenamiento, los tratamientos acidificados e inclusive el extracto con tratamiento térmico, presentaron mayor actividad proteolítica que el extracto congelado. A lo largo del tiempo se observa un incremento de actividad en el extracto congelado y en el extracto con tratamiento térmico. Para el caso del extracto acidificado a 4°C se observa un decremento en la actividad en la sexta semana de almacenamiento y vuelve a incrementar en la semana 12. Esto posiblemente se deba a la carga microbiana presente en el extracto. El único tratamiento en donde se observó un decremento a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento fue en el tratamiento acidificado a 27°C (ver Tabla XIX).

El incremento de actividad proteolítica para el caso del tratamiento térmico posiblemente pueda deberse a la presencia de microorganismos, y ésta a la manera de embasar el extracto, ya que los frascos en donde se embotelló ya habían sido utilizados con anterioridad. Además, el cerrado de las botellas pudo no ser completamente hermético, y por lo tanto, permitir el ingreso y proliferación de microorganismos que pudieron contribuir al deterioro del extracto sometido a este tratamiento. Por otro lado, Vega-Villasante y colaboradores (1995), mencionan que las proteasas presentan su máxima actividad a pH 8.0; si se observa la Tabla XIII, el extracto sometido al tratamiento térmico tuvo valores de pH de 8.1 que son óptimos para la acción proteolítica.

De igual manera que se han hecho estudios para caracterizar la actividad enzimática de camarones peneidos, sería recomendable también hacer un estudio exhaustivo sobre la actividad enzimática del extracto de langostilla para poder tomar decisiones sobre el método de conservación más adecuado, si se desea conservar la actividad enzimática del mismo. Pero también para identificar cuál es el origen de la actividad enzimática en el extracto, es decir, si es proviene de la langostilla y permanece a través del tiempo, o si la actividad está incrementada por la presencia de microorganismos.

### **f) Análisis microbiológico**

Como ya se ha mencionó en los resultados de actividad microbiana en los extractos completo y desgrasado de langostilla (ver Tabla VII), no se detectó la presencia de coliformes fecales, por tanto, no se realizó más esta prueba a lo largo del almacenamiento. La ausencia de coliformes fecales en el extracto es muy positivo, y permite su utilización como un insumo en alimentos, ya que, de acuerdo a las Normas Oficiales como la NOM-130-SSA1-1995 y la NOM-021-PESC-1994, no debe haber

presencia de *E. coli* en los alimentos, ya sea para consumo humano o para animales de cultivo.

En la Tabla XX se presentan los valores de actividad microbiana presente en el extracto de langostilla. Se observa que al inicio del almacenamiento hay un efecto positivo, desde el punto de vista de la eliminación de la actividad microbiana, en los extractos acidificados y con un tratamiento térmico. Sin embargo, a lo largo del tiempo se comienza a detectar la presencia de microorganismos. En la semana 12 de almacenamiento, se observa que hay mayor carga de bacterias con capacidad de crecer en el medio 2216, lo cual era de esperarse si se toma en cuenta que se está trabajando con un extracto de origen marino. Dichos organismos están clasificados de acuerdo a la NOM-130-SSA1-1995 como mesófilos aerobios.

Por otro lado, la NOM-021-PESC-1994 estipula que el límite máximo permitido de carga microbiana para alimentos e ingredientes es de  $10^4$  UFC/mg en base sólida. En el caso particular de este trabajo, se valoró un líquido que además se utilizó como aditivo, es decir en dosis muy pequeñas. Si se observa la Tabla XX, se aprecia que inclusive los valores más altos no sobrepasan el límite máximo permitido, a excepción del extracto congelado en el medio 2216 en la semana 12. Sin embargo, hay que hacer mención que de acuerdo al resto de los análisis realizados, la vida de anaquel de los extractos pudiera ser menor a las 12 semanas ya que no hay seguridad de que los extractos se encuentren en las condiciones óptimas al cabo de 12 semanas de almacenamiento.

Así mismo, como se ha mencionado en párrafos anteriores, la presencia de actividad enzimática de amilasa y proteasa, se puede justificar por la presencia de carga microbiana. Al mismo tiempo, se observa que el tratamiento térmico no tuvo las condiciones asépticas durante el almacenamiento, lo cual permitió la presencia de dichos microorganismos.

Para el caso de los extractos acidificados se propone llevar un control del acidificado. La acidificación no puede sustituir el saneamiento y cuidados que se debe tener con los alimentos. La regulación 21 CFR en su sección 110 propuesta por la FDA (2002), conocido como "Buenas prácticas de manufactura" menciona que al acidificar los alimentos, no quedan exentos de una descomposición por bacterias, hongos o levaduras. Para evitar dicha descomposición, usualmente algunos alimentos se calientan a 80°C aproximadamente o más, y se empacan en caliente. Este proceso puede matar levaduras y la mayoría de esporas de hongos que pueden contener los envases y la superficie de las tapas (Desorier, 2000).

El presente estudio se realizó utilizando un extracto desgrasado de langostilla elaborado experimentalmente en el laboratorio, pero en el contexto de su potencial

elaboración a nivel industrial, podría ser obtenido durante la fabricación de harina de langostilla, y con ello aprovechar la totalidad de esta materia prima. En ese caso, la langostilla entera fresca sería sometida a un proceso de cocción, operación que desde un principio eliminaría carga microbiana y algunas enzimas que promueven la degradación del extracto, para posteriormente ser prensada. Por una parte, se propone utilizar el prensado de langostilla para la fabricación de harina o la obtención de quitina, y por otra, el líquido obtenido sería el extracto completo de langostilla. Este líquido se centrifugaría para separar el aceite, como se hace en las plantas harineras, y el producto resultante sería el equivalente al extracto desgrasado de langostilla evaluado aquí. Este método, a diferencia del que se usó en este trabajo, implicaría la cocción previa al prensado que recibe la langostilla, por lo que será interesante evaluar en un futuro próximo las propiedades físicas, químicas y microbiológicas, así como la vida de anaquel de extractos obtenidos con ese procedimiento a nivel industrial, y también su valor nutricional o funcional como aditivo en alimentos para animales acuáticos y terrestres.

## **8.2 Inclusión de extractos de langostilla, obtenidos por distintos métodos de conservación, como aditivos en alimentos para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la utilización del alimento.**

Como era de esperarse al momento de diseñar los alimentos utilizados aquí, no se encontraron diferencias significativas en su composición química proximal al incluir el extracto desgrasado de langostilla al 1%, por lo que éstos fueron isoproteicos e isolipídicos. Así mismo, no se encontraron diferencias marcadas en la hidroestabilidad de los diferentes alimentos, lo cual es importante para poder comparar los efectos provocados por los tratamientos alimenticios.

La alta supervivencia obtenida durante el bioensayo de crecimiento (>90%) y el buen crecimiento registrado en todos los organismos, son muestras de que el experimento se llevó a cabo bajo condiciones de cultivo adecuadas, y por tanto, los efectos observados son atribuibles a los tratamientos alimenticios.

En el caso del peso promedio final de los camarones, la dieta con el extracto acidificado y almacenado a 27°C tuvo un peso final de 4.5 g, que es mayor al obtenido con la dieta control que fue de 3.8 g. Así mismo, con la dieta DEC se obtuvo un peso promedio de 4.0 g, ligeramente superior al de la DC. A pesar de que en general los pesos de los camarones alimentados con los alimentos que contenían alguno de los extractos de langostilla fueron mayores a los del tratamiento control, no se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, ni durante, ni al final del bioensayo (día 41). Estos resultados no son los esperados, pues en base a estudios previos, el efecto que se esperaba era que el peso fuera mayor en las dietas con alguno de los extractos de langostilla, como fue reportado por Vega-Villasante y colaboradores (2004) y Gutiérrez-Leyva (2003) que afirman que el extracto de langostilla promueve la actividad metabólica mejorando así el crecimiento de los animales, por lo cual puede ser utilizado como aditivo alimentario funcional en alimentos para camarón.

A nivel de la tasa de crecimiento porcentual se observó el mismo patrón de comportamiento que para el peso promedio, y el análisis estadístico confirma que no hay diferencias significativas entre la dieta control y aquellas que contienen el extracto de langostilla sometido a los distintos tratamientos. Estos resultados parecen indicar que los extractos sufrieron daños durante su conservación y almacenamiento, propiciando la pérdida de las propiedades promotoras del crecimiento, como los péptidos tipo insulina, que favorecen el crecimiento.

Galicia-González (2001) reporta que un hidrolizado enzimático de langostilla es un buen attractante y provoca fagoestimulación. Posteriormente, Gutiérrez-Leyva (2003) menciona que el extracto de langostilla desgrasado y liofilizado tiene capacidad attractante en los alimentos para camarón, lo cual provoca también una fuerte ingestión del alimento. En el presente estudio se observó una tendencia a que los alimentos que contenían los extractos de langostilla fueran más consumidos que el alimento control. La dieta control fue la menos consumida (45.3 mg/org/día) comparada con las demás, y particularmente con la dieta con extracto congelado, la cual obtuvo el valor más alto (49.9 mg/org/día). No obstante, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre las dietas. Es importante mencionar que la desviación estándar de los datos de consumo de alimento fue muy elevada en el caso del alimento control, debido a que dos de las 4 réplicas empleadas para este tratamiento mostraron valores altos y las otras dos réplicas mostraron valores bajos, lo cual contribuyó a que no se detectaran diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante lo anterior, hay elementos para pensar que los alimentos con los extractos de langostilla sí tuvieron un efecto atrayente, ya que durante el bioensayo se observó que los camarones experimentaron un “frenesí alimenticio”, como lo describen Vega-Villasante y colaboradores (2004), en el cual al momento de distribuir el alimento en los acuarios donde se usaron las dietas que contenían los extractos de langostilla, y en especial con el extracto congelado, se observaron movimientos natatorios rápidos de búsqueda y acercamiento de los camarones hacia los alimentos, así como manipulación de los pellets con los apéndices torácicos y mandíbulas, provocando turbidez en el agua, mismo que no fue observado en los camarones del tratamiento control sin langostilla. Desafortunadamente, en este bioensayo dicho comportamiento de los organismos no fue medido cuantitativamente, por lo que habrá que hacer experimentos específicos de atractabilidad, palatabilidad y cuantificación precisa del consumo de alimento para poder comprobar que los extractos de langostilla conservados por diferentes métodos y almacenados durante 12 semanas aún mantienen su poder attractante y fagoestimulante.

El factor de conversión alimenticia más alto se observó en las dietas que contienen 1% del extracto de langostilla sometido a los diferentes métodos de conservación, mientras que el FCA más bajo se presentó en los animales que consumieron la dieta control (2.5). Para el caso de la eficiencia proteica, el valor más alto se encontró para la dieta control, aunque al igual que en los demás parámetros

zootécnicos antes mencionados, estadísticamente no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Aunque no se cuenta con un argumento contundente para explicar la ausencia de efecto benéfico de la inclusión de los extractos en las dietas sobre los parámetros zootécnicos, y particularmente sobre la ingesta de alimento y el crecimiento de los organismos, se pueden plantear hipótesis para tratar de explicar lo ocurrido. Los estudios realizados hasta ahora sobre la inclusión de extractos de langostilla como aditivos en alimentos formulados para camarones, han utilizado el extracto completo (Vega-Villasante, 2002) y el extracto desgrasado (Gutiérrez-Leyva, 2003) liofilizados, que inmediatamente fueron incluidos en los alimentos para camarón, es decir, que no fueron almacenados por mucho tiempo antes de su utilización.

Existe la posibilidad también de que la langostilla empleada en esta ocasión haya tenido propiedades distintas desde un principio, pues no fue del mismo lote de captura del que usaron los autores arriba citados, y como ha sido reportado por Aurióles-Gamboa (1995) y Castro-González y colaboradores (1995), la composición química de estos organismos puede variar en función de la zona de captura y la estación del año, y es altamente probable que sus propiedades funcionales también varíen. En este sentido, se hace necesario el realizar un estudio más extenso para caracterizar la composición química de la langostilla en diferentes sitios de captura, así como a lo largo del tiempo para determinar si sus propiedades de alimento funcional para el camarón sufren cambios marcados, lo cual debe ser tomado en cuenta si se desea explotar comercialmente este recurso.

También es factible que la langostilla utilizada en el presente trabajo haya perdido algunas de sus propiedades por el hecho de haber sido mantenida en congelación por varios meses antes de elaborarse el extracto desgrasado y de aplicarse los métodos de conservación evaluados aquí. No obstante, es importante mencionar que el mismo extracto desgrasado y congelado utilizado aquí fue empleado en otra investigación, realizada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR, como aditivo en alimentos experimentales y comerciales para camarón *L. vannamei*, y en ella sí se observó un efecto benéfico, tanto en el alimento consumido, como en el crecimiento ponderal de los organismos, aunque éste efecto fue dependiente del nivel de inclusión en la dieta, y del tipo de dieta, es decir, que a medida que se aumentó la cantidad del extracto en los alimentos de 0 a 3, 6 y 9%, aumentó su poder fagoestimulante y promotor del crecimiento (Civera-Cerecedo comunicación personal,

2006), pero sólo a los niveles de inclusión de 6 y 9% en las dietas se detectaron efectos significativos ( $p < 0.05$ ), mientras que al 3% de inclusión no hubo diferencias con respecto a los alimentos control. Es plausible entonces pensar que la congelación de la langostilla, y posteriormente haberla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas hayan alterado su calidad inicial, y que por ello no se mostraron sus bondades cuando los extractos fueron incluidos al 1% en los alimentos del presente trabajo.

En los estudios realizados anteriormente en el CIBNOR sobre los extractos de langostilla, se ha encontrado que los extractos promueven el consumo del alimento y el crecimiento de los camarones. Sin embargo, en ninguno de esos estudios se había evaluado el efecto de someter el extracto a tratamientos térmicos o químicos (acidificación) como medios de conservación y almacenarlos durante 12 semanas, y la medida en que esto altera sus propiedades químicas y físicas, microbiológicas, así como su valor como aditivo en alimentos para camarón, tal como se realizó en el presente trabajo. Al parecer, dichas propiedades sí se vieron negativamente afectadas por los tratamientos de conservación, aunque no se puede afirmar de manera contundente, ya que desafortunadamente, no se pudo contar aquí con un tratamiento control de extracto liofilizado, que fuera evaluado como aditivo en alimentos justo después de haber sido elaborado (tiempo cero), y a través del tiempo (semanas 6 y 12). En futuras investigaciones, habrá que asegurarse de evaluar extractos con esas características, para poder discriminar más claramente entre la calidad inicial de la langostilla (extracto recién elaborado) y los efectos causados por los métodos de conservación y por el tiempo de almacenamiento. De igual manera, será interesante evaluar los extractos obtenidos con estos y otros métodos de conservación, por ejemplo el secado por aspersión, a niveles de inclusión más elevados en el alimento, así como calcular el costo beneficio de su utilización como aditivos o ingredientes en los alimentos para camarón y otras especies.

## 9. CONCLUSIONES

- La conservación del extracto desgrasado de langostilla por congelación, acidificación o tratamiento térmico provocó diferentes cambios en sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas a lo largo de las 12 semanas de almacenamiento, mismos que variaron en función del método de conservación empleado.
- El extracto de langostilla congelado fue el extracto que mantuvo sus propiedades físicas y químicas sin cambios tan agresivos en cuanto a humedad, proteína cruda, pH, actividad amilolítica, lipolítica y proteolítica. La carga microbiana incrementó durante las doce semanas de almacenamiento.
- En los extractos acidificados a 4 y 27°C, al inicio de los tratamientos tuvieron los mismos efectos sobre todas las propiedades físicas, químicas y microbiológicas. Sin embargo, a partir de la sexta semana de almacenamiento, empezaron a perder dichas propiedades como es el caso de la proteína cruda, pH, carotenos totales, proteínas solubles, actividad amilolítica, lipolítica y proteolítica. Efecto que se vio incrementado en la semana 12 de almacenamiento.
- El extracto con un tratamiento térmico fue el que más afectó las propiedades químicas y microbiológicas. Hubo un incremento de la carga microbiana en la sexta semana de almacenamiento, la cual se incrementó hasta la semana 12. Esto provocó un incremento en la actividad proteolítica en este extracto.
- En todos los extractos no se rebasa el límite máximo permitido de microorganismos de acuerdo a la norma con clave NOM-021-PESC-1994.
- De acuerdo a las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los extractos; se propone el extracto congelado hasta la sexta semana de almacenamiento como una alternativa para utilizar al extracto de langostilla desgrasado en alimentos para camarón.

- Aparentemente, los cambios sufridos al cabo de 12 semanas de almacenamiento con los diferentes métodos de conservación atenuaron la capacidad de los extractos para servir como fagoestimulantes y de promover el crecimiento del camarón, ya que al ser incluidos como aditivos al 1% en alimentos para *L. vannamei* no se alcanzaron a detectar diferencias significativas en ninguno de los criterios zootécnicos de evaluación. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que al utilizarlos a mayores niveles de inclusión en el alimento se puedan manifestar su efecto benéfico.
- Se deberán hacer evaluaciones de la calidad del extracto antes y después de aplicar estos métodos de conservación y almacenarlo durante menor tiempo, se sugieren 6 semanas, así como probar otros métodos de conservación, por ejemplo secado por aspersión, a fin de determinar cuáles son las condiciones óptimas para preservar la funcionalidad del extracto de langostilla como aditivo alimentario.

## 10. RECOMENDACIONES

- Identificar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas que se desee conservar del extracto de langostilla para aplicar un método de conservación adecuado.
- Analizar en los extractos la presencia de poliaminas, aminoácidos libres y péptidos tipo insulina para evaluar más detalladamente las propiedades químicas de los extractos sometidos a diferentes métodos de conservación.
- Si se desea aplica un tratamiento acidificado, se recomienda un calentamiento previo que elimine la posible carga microbiana en los recipientes donde se va almacenar.
- Buscar otras alternativas de bajo costo que permitan preservar el extracto de langostilla, así como los componentes nutricios y no nutricios del mismo, ya que la compra de maquinaria para un tratamiento térmico, congeladores y/o refrigeradores, representa un gasto extra a la elaboración del extracto.
- Hacer un estudio del efecto del extracto de langostilla sometido a los mismos métodos de conservación en dietas experimentales para crecimiento de camarón, pero con diferentes niveles de inclusión del extracto en la dieta y con el extracto obtenido al cabo de la sexta semana de almacenamiento.

## 11. LITERATURA CITADA

- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist*. 16 Edition. Arlington, Virginia, USA. 935p.
- Auriolles-Gamboa, D. y Balart, E. F. (1995) La langostilla: biología, ecología y aprovechamiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Auriolles-Gamboa, D. (1995) Distribución y abundancia de la langostilla bentónica (*Pleuroncodes planipes*) en la Plataforma Continental de la Costa Oeste de Baja California. 59-78pp. En Auriolles-Gamboa, D. y Balart, E. F. (Eds.) *La langostilla: biología, ecología y aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Arango, G., José Ignacio (2000) Resumen de la evaluación de la utilización de la astaxantina en nutrición de camarones, Avances en Nutrición Acuícola III, Ecuador, 423- 432pp
- Badui-Dergal, S., (1999) Química de los alimentos, 3ra. Edición, Pearson Education, México, D. F.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
- Castro-González, M. I. (1993) Procesos tecnológicos aplicados a la langostilla *Pleuroncodes planipes* Stimpson y cambios en su composición química a diferentes latitudes para su aprovechamiento en alimento animal. Tesis de maestría. UNAM. México, D. F.
- Castro-González, M. I.; Carrillo-Domínguez, S.; Pérez-Gil Romo, F. y Carrillo-Calvo C. (1995) Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos. Capítulo 10. 163-179pp. En Auriolles-Gamboa, D. y Balart, E. F. (Eds.) *La langostilla: biología, ecología y aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.

- Carrillo O., Vega-Villasante, F., Nolasco, H., y Gallardo, N. (2000) Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. pp. 90-101. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A., y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Mérida Yucatán, México.
- Civera-Cerecedo, R., Goytortúa-Bores, E., Rocha-Meza, S. and Green-Yee, A. (1992) Utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal as protein source for *Penaeus vannamei* juveniles. Abs. Annual Conf. World Aquacult. Soc. 21-25.
- Civera, R. and Guillaume, J. C. (1989) Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture. (77) 145-156.
- Civera, R., Villarreal, F., Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Rocha, S., González, M., Goytortúa, E. and Camarillo, M. 1994. Digestive enzyme activity and growth of *Penaeus californiensis* fed diets containing red crab, *Pleuroncodes planipes*, meal as a protein source. Abstract. World Aquaculture '94, New Orleans. Louisiana, USA.
- Código de regulaciones federales (1985): alimentos acidificados. Título 21, parte 114. Centro de Seguridad de Alimentos y Nutrición Aplicada
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA): [www.sagarpa.gob.mx/conapesca](http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca)
- Coral-Hinostroza, G. N.; Astaxantina de langostilla, *Pleuroncodes planipes* (Stimpson) y su efecto en la pigmentación muscular de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, (Walabaum) Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Desrosier, N. W. (1999) Elementos de tecnología de alimentos, CECSA, México, D. F.
- Desrosier, N. W. (2000) Conservación de los alimentos, CECSA, México, D. F.

- Díaz, V., Fraga, I., Fraga, R., González, M., Pérez, O., Escobar, A., Contreras, R. y Morales, N., (2004) Variación en la calidad del pienso artificial durante el almacenamiento y su efecto sobre el Camarón *Litopenaeus schmitti*. *III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*
- FAO (2002) *Yearbook of Fishery Statistics*. Aquaculture production. FAO Statistics. Vol. 90 No.2 Roma. pp. 1-30.
- Fenemma, O. R., (1996) *Food Chemistry*, 3th. Edition, Marcel Dekker, Inc., USA
- Fernández-Milán, A.; (1996) Evaluación de dietas con inclusión de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente protéica. Efectos sobre la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles de camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis de licenciatura SEIT.
- Forrellat-Barrios, A.; del Monte-Martínez, A.; Estévez-Lao, T.; Boburg-Castroconde, B.; Nolasco-Soria, H. y Carrillo-Franés, O. (2004) Caracterización de lipasas en tres especies de camarones pendidos. Su importancia en la digestión. *III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*
- Galicia-González A. (2001). Determinación del valor nutricional de un hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para juveniles de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 78p.
- Galicia-González, A. (2003) Utilización de hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como aditivo en alimentos para juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Goytortúa-Bores, E. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Ingeniería en Alimentos. UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. México. 112 p.

- Goytortúa-Borés, E.; Civera-Cerecedo, R., Rocha-Meza, S., Green-Yee, A., Partial replacement of red crac (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture* 256 (2006) 414-422
- Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler (1998) *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*, INRA editions, France
- Gutiérrez-Leyva, R., (2002), *Calidad nutricional de dos productos a base de langostilla (Pleuroncodes planipes) como fuente de proteína o aditivo alimentario en alimentos balanceados para juveniles de camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. Tesis de licenciatura, UABCS, La Paz, B. C. S.
- Hernández-González, G., (1999), *Evaluación del valor nutricional de una harina de langostilla (Pleuroncodes planipes) fabricada a nivel industrial, como insumo protéico en dietas para camarones pendedos*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Universidad de Sonora; Hermosillo, Sonora
- Hernández-Saavedra, N. Y. (1990), *Levaduras marinas aisladas en la costa occidental de Baja California Sur, México*. Tesis de licenciatura. UNAM. Los Reyes, Iztacala
- Man, D. and A. Jones (2000) *Shelf-life evaluation of foods* 2<sup>th</sup>. Edition ASPEN publish, Gaithersburg, Maryland
- Miller, Dennis D., (2001) *Química de alimentos: Manual de laboratorio*, Limusa Willey, México, D. F.
- Molina-Poveda, C., Escobar, V., Gamboa-Delgado, J., Cadena, E., Orellana, F. y Piña, P. (2002) *Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil Litopenaeus vannamei (Boone)*. *Avances de nutrición acuícola VI. Memorias de Simposio internacional de nutrición acuícola*. Cancún Quintana Roo, México
- Navarro Alfano, M. (1998) *La liofilización de productos farmacéuticos*, SINTEFARMA 4(1)

- Norma Mexicana NMX-AA-42-1987, Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Esterichia coli* presuntiva
- Norma Oficial Mexicana NOM-012-PESC-1994, Regula alimentos balanceados, los ingredientes para su elaboración y productos alimenticios no convencionales, utilizados en la acuicultura y ornato, importado y nacionales, para su comercialización y consumo en la República Mexicana
- NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias
- Hersom, A. C. (1980) Conservas alimenticias, ARCIBIA, S. A., Zaragoza, España
- Ruttanapornvareesakul, Y.; Ikeda, M.; Hara, K.; Osako, K.; Kongpun, O. and Nozaki, Y.; (2005) Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fisheries science* 71: 220-228
- Singh, R.P (2000) "Scientific principles of shelf-life evaluation" Chapter 1 in "Shelf-life evaluation of foods" 3-21pp. In Man, D. and A. Jones (Eds.) Shelf-life evaluation of foods" 2<sup>th</sup>. Edition ASPEN publish, Gaithersburg, Maryland
- Spinelli, J.; Lehnan, L. and Wieg, D. (1974) Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient, *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 1025-1029
- Tacon, A. G. (1989) Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados, manual de capacitación, Programa Cooperativo Gubernamental, FAO-Italia
- Vega-Villasante, F.; Béquer-Zúñiga, U; Hernández, N.; Nolasco-Soria, H.; Carrillo-Franés, O.; (2004) Langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) como alimento funcional en el crecimiento, supervivencia y composición corporal de larvas de camarón (*Litopenaeus schmitti*) III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura

- Vega-Villasante, F.; Nolasco, H. and Civera, R.; (1993) The digestive enzymes of de Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*-I. Propieties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 547-550
- Vega-Villasante, F.; Nolasco, H. and Civera, R.; (1995) The digestive enzymes of de Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*-II. Propieties of protease activity in de whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 123-129
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Fallarero, A. and Carrillo-Franés, O. 2002, Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Ghalatehidae) as a potencial food aditive, considerations for a new fishery along the Mexico Pacific coast. *Hidrobiológica* 12(2):119-128
- Vega-Villasante F.; Flores-Tom A.; Carrillo-Farnés O.:(2002), Alimentos Funcionales en la nutrición del camarón: ¿el futuro? / *Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*
- Vega-Villasante, F., Gutiérrez-Leyva, R., Carrillo-Franés, O., Delgado, G. y Civera-Cerecedo, R.,(2004) El extracto de Langostilla Roja *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatehidae) como aditivo alimentario funcional en alimentos para juveniles de *Litopenaeus vannamei*. *III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*
- Villareal, H. (1995) *Utilización de la langostilla en la acuicultura*. Capítulo 11, 179-206pp. En Aurióles-Gamboa, D. y Balart, E. F. (Eds.) *La langostilla: biología, ecología y aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S.
- Von-Elbe, J. H. and Schwartz, S. J. (1996) *Colorants*. Chapter 10. pp 651-722. In Fennema, O. (Eds.) *Food chemistry* 3<sup>th</sup>. Edition. Marcel Dekker, Inc. New York
- Whitaker, J. R. (1996) *Enzymes*. Chapter 7. pp 433-530. In Fennema, O. (Eds.) *Food chemistry* 3<sup>th</sup>. Edition. Marcel Dekker, Inc. New York

- Zhang, N.; Yahashita, Y. and Nozaki, Y., 2002, Effect of protein hydrolysate from antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils. *Fisheries science* 68:672-679

**ANEXO A: Caracterización del extracto de langostilla****TABLA A1.** Análisis de varianza para los valores de pH del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	377.9441	1	377.9441	527363.8	0.000000
Método de conservación	0.1291	1	0.1291	180.1	<b>0.000178</b>
Error	0.0029	4	0.0007		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA A2.** Análisis de varianza para la concentración de carotenos totales del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	1.707269	1	1.707269	199486.4	0.000000
Método de conservación	1.204575	1	1.204575	140748.9	<b>0.000000</b>
Error	0.000034	4	0.000009		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA A3.** Análisis para la concentración de proteínas solubles del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	306.0998	1	306.0998	25649.05	0.000000
Método de conservación	7.6815	1	7.6815	643.66	<b>0.000014</b>
Error	0.0477	4	0.0119		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA A4.** Análisis para la actividad amilolítica del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	1229443	1	1229443	33530.25	0.000000
Método de conservación	56067	1	56067	1529.09	<b>0.000003</b>
Error	147	4	37		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA A5.** Análisis para la actividad lipolítica del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	85124.74	1	85124.74	201.9478	0.000142
Método de conservación	3392.30	1	3392.30	8.0478	<b>0.047017</b>
Error	1686.07	4	421.52		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA A6.** Análisis para la actividad proteolítica del extracto de langostilla

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	6578.074	1	6578.074	195.4959	0.000152
Método de conservación	266.667	1	266.667	7.9252	<b>0.048064</b>
Error	134.593	4	33.648		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**ANEXO B: Tablas de los estadísticos de los análisis químico proximales del extracto sometido a diferentes métodos de conservación y almacenado durante 12 semanas**

**TABLA B1a.** Análisis de varianza bifactorial para la % Humedad de un extracto de sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	289609.7020	1.0000	289609.7020	581675.4647	<b>0.0000</b>
Método de conservación	6.6472	3.0000	2.2157	4.4502	<b>0.0127</b>
Tiempo	19.5184	2.0000	9.7592	19.6012	<b>0.0000</b>
Método de conservación*Tiempo	64.0698	6.0000	10.6783	21.4471	<b>0.0000</b>
Error	11.9493	24.0000	0.4979		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA B1b.** Prueba de Tukey para el % humedad del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0	<b>0.0106</b>	0.9209	1.0000	0.5412	0.5452	1.0000	0.5832	<b>0.0226</b>	0.1908	<b>0.0026</b>	<b>0.0387</b>	
C	6	<b>0.0106</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0039</b>	<b>0.0002</b>	0.6498	<b>0.0039</b>	<b>0.0002</b>	1.0000	<b>0.0001</b>	1.0000	1.0000	
C	12	0.9209	<b>0.0004</b>		0.9923	0.9998	<b>0.0366</b>	0.9923	0.9999	<b>0.0007</b>	0.9490	<b>0.0002</b>	<b>0.0012</b>
A4	0	1.0000	<b>0.0039</b>	0.9923		0.7982	0.3031	1.0000	0.8318	<b>0.0085</b>	0.3821	<b>0.0010</b>	<b>0.0148</b>
A4	6	0.5412	<b>0.0002</b>	0.9998	0.7982		<b>0.0071</b>	0.7982	1.0000	<b>0.0002</b>	0.9999	<b>0.0001</b>	<b>0.0003</b>
A4	12	0.5452	0.6498	<b>0.0366</b>	0.3031	<b>0.0071</b>		0.3031	<b>0.0083</b>	0.8355	<b>0.0014</b>	0.3008	0.9285
A27	0	1.0000	<b>0.0039</b>	0.9923	1.0000	0.7982	0.3031		0.8318	<b>0.0085</b>	0.3821	<b>0.0010</b>	<b>0.0148</b>
A27	6	0.5832	<b>0.0002</b>	0.9999	0.8318	1.0000	<b>0.0083</b>	0.8318		<b>0.0002</b>	0.9997	<b>0.0002</b>	<b>0.0003</b>
A27	12	<b>0.0226</b>	1.0000	<b>0.0007</b>	<b>0.0085</b>	<b>0.0002</b>	0.8355	<b>0.0085</b>	<b>0.0002</b>		<b>0.0002</b>	0.9980	1.0000
TT	0	0.1908	<b>0.0001</b>	0.9490	0.3821	0.9999	<b>0.0014</b>	0.3821	0.9997	<b>0.0002</b>		<b>0.0001</b>	<b>0.0002</b>
TT	6	<b>0.0026</b>	1.0000	<b>0.0002</b>	<b>0.0010</b>	<b>0.0001</b>	0.3008	<b>0.0010</b>	<b>0.0002</b>	0.9980	<b>0.0001</b>		0.9866
TT	12	<b>0.0387</b>	1.0000	<b>0.0012</b>	<b>0.0148</b>	<b>0.0003</b>	0.9285	<b>0.0148</b>	<b>0.0003</b>	1.0000	<b>0.0002</b>	0.9866	
Media	<b>90.14</b>	<b>87.67</b>	<b>91.02</b>	<b>90.39</b>	<b>91.43</b>	<b>88.86</b>	<b>90.39</b>	<b>91.39</b>	<b>87.86</b>	<b>91.83</b>	<b>87.32</b>	<b>88.00</b>	
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA B2a.** Análisis de varianza bifactorial para la % Cenizas de un extracto de sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	21988.11	1	21988.11	295721.9	0.000000
Método de conservación	43.88	2	21.94	295.1	<b>0.000000</b>
Tiempo	28.68	3	9.56	128.6	<b>0.000000</b>
Método de conservación*Tiempo	78.77	6	13.13	176.6	<b>0.000000</b>
Error	1.78	24	0.07		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ )

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA B2b.** Prueba de Tukey para el % cenizas del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0		0.99999	0.99999	<b>0.00014</b>	<b>0.00701</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00061</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.99245
C	6	0.99999		1.00000	<b>0.00014</b>	<b>0.02219</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00180</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.89749
C	12	0.99999	1.00000		<b>0.00014</b>	<b>0.02219</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00180</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.89749
A4	0	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>		<b>0.00014</b>	0.68262	0.99722	<b>0.00015</b>	0.99482	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A4	6	<b>0.00701</b>	<b>0.02219</b>	<b>0.02219</b>	<b>0.00014</b>		<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.99263	<b>0.00015</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00060</b>
A4	12	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.68262	<b>0.00014</b>		0.99450	<b>0.00014</b>	0.15416	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A27	0	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.99722	<b>0.00014</b>	0.99450		<b>0.00014</b>	0.68730	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A27	6	<b>0.00061</b>	<b>0.00180</b>	<b>0.00180</b>	<b>0.00015</b>	0.99263	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>		<b>0.00020</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00017</b>
A27	12	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.99482	<b>0.00015</b>	0.15416	0.68730	<b>0.00020</b>		<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
TT	0	<b>0.00014</b>		<b>0.00263</b>	<b>0.00014</b>								
TT	6	<b>0.00014</b>	<b>0.00263</b>		<b>0.00014</b>								
TT	12	0.99245	0.89749	0.89749	<b>0.00014</b>	<b>0.00060</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00017</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	
Media		<b>26.85200</b>	<b>26.74100</b>	<b>26.74100</b>	<b>23.97700</b>	<b>25.85600</b>	<b>23.53000</b>	<b>23.76300</b>	<b>25.61400</b>	<b>24.20900</b>	<b>21.64100</b>	<b>20.55100</b>	<b>27.09400</b>
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA B3a.** Análisis de varianza bifactorial para la % de Proteína cruda de un extracto de sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	99542.82	1	99542.82	1789061	0.000000
Método de conservación	63.34	2	31.67	569	<b>0.000000</b>
Tiempo	13.18	3	4.39	79	<b>0.000000</b>
Método de conservación*Tiempo	67.05	6	11.17	201	<b>0.000000</b>
Error	1.34	24	0.06		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA B3b.** Prueba de Tukey para el % de proteína cruda del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0		1.000000	1.000000	0.365396	0.370410	0.756127	<b>0.000196</b>	<b>0.035059</b>	0.340823	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000916</b>
C	6	1.000000		1.000000	0.433163	0.308385	0.684712	<b>0.000217</b>	<b>0.026780</b>	0.282002	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000709</b>
C	12	1.000000	1.000000		0.433163	0.308385	0.684712	<b>0.000217</b>	<b>0.026780</b>	0.282002	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000709</b>
A4	0	0.365396	0.433163	0.433163		<b>0.001777</b>	<b>0.007907</b>	<b>0.030799</b>	<b>0.000206</b>	<b>0.001567</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>
A4	6	0.370410	0.308385	0.308385	<b>0.001777</b>		0.999938	<b>0.000143</b>	0.979167	1.000000	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	0.227956
A4	12	0.756127	0.684712	0.684712	<b>0.007907</b>	0.999938		<b>0.000143</b>	0.758273	0.999858	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	0.066444
A27	0	<b>0.000196</b>	<b>0.000217</b>	<b>0.000217</b>	<b>0.030799</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>		<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>
A27	6	<b>0.035059</b>	<b>0.026780</b>	<b>0.026780</b>	<b>0.000206</b>	0.979167	0.758273	<b>0.000143</b>		0.985219	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	0.896739
A27	12	0.340823	0.282002	0.282002	<b>0.001567</b>	1.000000	0.999858	<b>0.000143</b>	0.985219		<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	0.250752
TT	0	<b>0.000143</b>		<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>								
TT	6	<b>0.000143</b>											
TT	12	<b>0.000916</b>	<b>0.000709</b>	<b>0.000709</b>	<b>0.000143</b>	<b>0.227956</b>	<b>0.066444</b>	<b>0.000143</b>	0.896739	0.250752	<b>0.000143</b>	<b>0.000143</b>	
Media	<b>53.497</b>	<b>53.52</b>	<b>53.52</b>	<b>53.985</b>	<b>53.01</b>	<b>53.133</b>	<b>54.722</b>	<b>52.771</b>	<b>52.999</b>	<b>50.662</b>	<b>46.724</b>	<b>52.465</b>	
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA B4a.** Análisis de varianza bifactorial para la % de extracto etéreo de un extracto de sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	2.035449	1	2.035449	197.4470	0.000000
Método de conservación	0.027600	2	0.013800	1.3387	0.281074
Tiempo	0.057784	3	0.019261	1.8684	0.161901
Método de conservación*Tiempo	0.339319	6	0.056553	5.4859	<b>0.001076</b>
Error	0.247412	24	0.010309		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias

**TABLA B4b.** Prueba de Tukey para el % de extracto etéreo del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0		<b>0.013198</b>	<b>0.013198</b>	0.930266	0.020335	0.434600	0.992568	0.116405	0.986250	0.319531	0.956390	0.458318
C	6	<b>0.013198</b>		1.000000	0.277569	1.000000	0.808828	0.136109	0.996064	0.160962	0.901745	0.232824	0.787807
C	12	<b>0.013198</b>	1.000000		0.277569	1.000000	0.808828	0.136109	0.996064	0.160962	0.901745	0.232824	0.787807
A4	0	0.930266	0.277569	<b>0.277569</b>		0.371296	0.998062	0.999999	0.847364	1.000000	0.989208	1.000000	0.998698
A4	6	<b>0.020335</b>	1.000000	1.000000	0.371296		0.892964	0.193118	0.999374	0.225744	0.955255	0.316880	0.877235
A4	12	0.434600	0.808828	0.808828	0.998062	0.892964		0.966801	0.999569	0.979708	1.000000	0.995123	1.000000
A27	0	0.992568	0.136109	0.136109	0.999999	0.193118	0.966801		0.620805	1.000000	0.914131	1.000000	0.973208
A27	6	0.116405	0.996064	0.996064	0.847364	0.999374	0.999569	0.620805		0.676174	0.999980	0.795309	0.999317
A27	12	0.986250	0.160962	0.160962	1.000000	0.225744	0.979708	1.000000	0.676174		0.940256	1.000000	0.984106
TT	0	0.319531	0.901745	0.901745	0.989208	0.955255	1.000000	0.914131	0.999980	0.940256		0.978986	1.000000
TT	6	0.956390	0.232824	0.232824	1.000000	0.316880	0.995123	1.000000	0.795309	1.000000	0.978986		0.996511
TT	12	0.458318	0.787807	0.787807	0.998698	0.877235	1.000000	0.973208	0.999317	0.984106	1.000000	0.996511	
Media		<b>0.0433</b>	<b>0.39159</b>	<b>0.39159</b>	<b>0.16659</b>	<b>0.37594</b>	<b>0.24331</b>	<b>0.13331</b>	<b>0.30829</b>	<b>0.14069</b>	<b>0.26095</b>	<b>0.15784</b>	<b>0.23998</b>
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**ANEXO C: Tablas de los estadísticos de la valoración de los análisis químicos del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación durante 12 semanas de almacenamiento**

**TABLA C1A.** Análisis de varianza bifactorial para los valores de pH

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	1323.747	1	1323.747	345075.2	<b>0.000000</b>
Método de conservación	121.378	3	40.459	10546.9	<b>0.000000</b>
Tiempo	0.066	2	0.033	8.6	<b>0.001555</b>
Método de conservación*Tiempo	0.159	6	0.027	6.9	<b>0.000233</b>
Error	0.092	24	0.004		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas (P<0.05)

**TABLA C1b.** Prueba de Tukey para el valor de pH del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0		0.09558	0.95585	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00234</b>	<b>0.00369</b>	<b>0.00021</b>
C	6	0.09558		0.74187	<b>0.00014</b>								
C	12	0.95585	0.74187		<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00020</b>	<b>0.00024</b>	<b>0.00014</b>
A4	0	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>		0.96825	0.84525	1.00000	<b>0.00110</b>	<b>0.00173</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A4	6	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.96825		0.15932	0.96825	<b>0.00017</b>	<b>0.00019</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A4	12	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	0.84525	0.15932		0.84525	<b>0.05528</b>	<b>0.08362</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A27	0	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	1.00000	0.96825	0.84525		<b>0.00110</b>	<b>0.00173</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A27	6	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00110</b>	<b>0.00017</b>	0.05528	0.00110		1.00000	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
A27	12	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00173</b>	<b>0.00019</b>	0.08362	0.00173	1.00000		<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>
TT	0	<b>0.00234</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00020</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>		1.00000	0.96825
TT	6	<b>0.00369</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00024</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	<b>0.00014</b>	1.00000		0.92168
TT	12	<b>0.00021</b>	<b>0.00014</b>	0.96825	0.92168								
Media		<b>7.80000</b>	<b>7.63330</b>	<b>7.73000</b>	<b>4.32330</b>	<b>4.39000</b>	<b>4.23670</b>	<b>4.32330</b>	<b>4.05670</b>	<b>4.06670</b>	<b>8.05000</b>	<b>8.04000</b>	<b>8.11670</b>
Semana	0		6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	TT

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA C2a** Análisis de varianza bifactorial para la concentración de carotenos totales

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	0.370784	1	0.370784	14867.17	<b>0.00</b>
Método de conservación	0.004193	3	0.001398	56.04	<b>0.00</b>
Tiempo	0.089515	2	0.044757	1794.61	<b>0.00</b>
Método de conservación*Tiempo	0.045679	6	0.007613	305.26	<b>0.00</b>
Error	0.002394	96	0.000025		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas (P<0.05)

**TABLA C2b.** Prueba de Tukey para carotenos totales del extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación almacenado durante 12 semanas

C	0		<b>0.00012</b>	0.82895	<b>0.00012</b>								
C	6	<b>0.00012</b>		0.86958	<b>0.00012</b>	0.99732	<b>0.00013</b>	<b>0.00012</b>	0.52277	1.00000	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.17587</b>
C	12	<b>0.00012</b>	0.86958		<b>0.00012</b>	0.24680	<b>0.01109</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00840</b>	0.96853	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00108</b>
A4	0	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	1.00000	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A4	6	<b>0.00012</b>	0.99732	0.24680	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.98419	0.97260	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.78739
A4	12	<b>0.00012</b>	0.00013	<b>0.01109</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00018</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A27	0	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	1.00000	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A27	6	<b>0.00012</b>	0.52277	<b>0.00840</b>	<b>0.00012</b>	0.98419	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		0.30962	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.99998
A27	12	<b>0.00012</b>	1.00000	0.96853	<b>0.00012</b>	0.97260	<b>0.00018</b>	<b>0.00012</b>	0.30962		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.07925
TT	0	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>								
TT	6	0.82895	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>								
TT	12	<b>0.00012</b>	0.17587	<b>0.00108</b>	<b>0.00012</b>	0.78739	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.99998	0.07925	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	
Media		<b>0.08439</b>	<b>0.03336</b>	<b>0.02939</b>	<b>0.12729</b>	<b>0.03573</b>	<b>0.02033</b>	<b>0.12729</b>	<b>0.03865</b>	<b>0.03259</b>	<b>0.05380</b>	<b>0.08022</b>	<b>0.04008</b>
Semana	0		6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	TT

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA C3a.** Análisis de varianza bifactorial para la concentración de proteínas solubles

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	1279.497	1	1279.497	25948.74	<b>0.0000</b>
Método de conservación	65.711	3	21.904	444.21	<b>0.0000</b>
Tiempo	267.863	2	133.931	2716.18	<b>0.0000</b>
Método de conservación*Tiempo	48.400	6	8.067	163.60	<b>0.0000</b>
Error	4.734	96	0.049		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas (P<0.05)

**TABLA C3b.** Prueba de Tukey para la concentración de proteínas solubles con un nivel de confianza de 95%

C	0		<b>0.00078</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.01887</b>	<b>0.10456</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.01887</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
C	6	<b>0.00078</b>		<b>0.00012</b>	0.99839	0.91997	<b>0.00012</b>	0.99839	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
C	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>								
A4	0	<b>0.01887</b>	0.99839	<b>0.00012</b>		0.99998	<b>0.00012</b>	1.00000	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A4	6	0.10456	0.91997	<b>0.00012</b>	0.99998		<b>0.00012</b>	0.99998	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A4	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00081</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.11576
A27	0	<b>0.01887</b>	0.99839	<b>0.00012</b>	1.00000	0.99998	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>
A27	6	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00081</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.90992</b>
A27	12	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>							
TT	0	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>								
TT	6	<b>0.00012</b>		<b>0.00012</b>									
TT	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.11576	<b>0.00012</b>	<b>0.90992</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	
Media		<b>5.69010</b>	<b>5.20560</b>	<b>2.37470</b>	<b>5.30490</b>	<b>5.36850</b>	<b>1.14510</b>	<b>5.30490</b>	<b>1.62840</b>	<b>0.41173</b>	<b>4.28770</b>	<b>3.11980</b>	<b>1.46230</b>
Semana	0		6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	TT

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA C4a.** Análisis de varianza bifactorial para la actividad específica de amilasa

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	2291628	1	2291628	2760.844	0.000000
Método de conservación	843648	3	281216	338.796	<b>0.000000</b>
Tiempo	318422	2	159211	191.810	<b>0.000000</b>
Método de conservación*Tiempo	166921	6	27820	33.516	<b>0.000000</b>
Error	79684	96	830		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas (P<0.05)

**TABLA C4b.** Prueba de Tukey para la concentración actividad específica de amilasa con un nivel de confianza de 95%

C	0		0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
C	6	0.000119		0.726795	0.985449	0.962680	0.000119	0.985449	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
C	12	0.000119	0.726795		0.999886	0.999991	0.000119	0.999886	0.000121	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
A4	0	0.000119	0.985449	0.999886		1.000000	0.000119	1.000000	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
A4	6	0.000119	0.962680	0.999991	1.000000		0.000119	1.000000	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
A4	12	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119		0.000119	0.000119	0.126526	0.999966	0.999956	1.000000
A27	0	0.000119	0.985449	0.999886	1.000000	1.000000	0.000119		0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119
A27	6	0.000119	0.000119	0.000121	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119		0.000122	0.000119	0.000119	0.000119
A27	12	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.126526	0.000119	0.000122		0.445580	0.456651	0.070801
TT	0	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.999966	0.000119	0.000119	0.445580		1.000000	0.999323
TT	6	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.999956	0.000119	0.000119	0.456651	1.000000		0.999172
TT	12	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	0.000119	1.000000	0.000119	0.000119	0.070801	0.999323	0.999172	
Media		<b>352.22</b>	<b>241.56</b>	<b>215.11</b>	<b>224.9</b>	<b>222.7</b>	<b>15.3</b>	<b>224.89</b>	<b>134.89</b>	<b>56</b>	<b>24</b>	<b>24.222</b>	<b>12.222</b>
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA C5a.** Análisis de varianza bifactorial para la actividad específica de lipasa

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	61077.2	1	61077.19	1121.534	0.000000
Método de conservación	117461.2	3	39153.74	718.963	<b>0.000000</b>
Tiempo	1794.7	2	897.37	16.478	<b>0.000001</b>
Método de conservación*Tiempo	6817.4	6	1136.23	20.864	<b>0.000000</b>
Error	5228.0	96	54.46		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas (P<0.05)

**TABLA C5b.** Prueba de Tukey para la concentración actividad específica de lipasa con un nivel de confianza de 95%

C	0		<b>0.00012</b>										
C	6	<b>0.00012</b>		<b>0.99872</b>	<b>0.00012</b>								
C	12	<b>0.00012</b>	<b>0.99872</b>		<b>0.00012</b>								
A4	0	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>		<b>0.81440</b>	<b>0.80274</b>	1.00000	0.99000	0.91723	0.99204	0.84720	<b>0.00022</b>
A4	6	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.81440</b>		<b>1.00000</b>	0.81440	0.99997	1.00000	0.99995	1.00000	<b>0.00012</b>
A4	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.80274</b>	<b>1.00000</b>		0.80274	0.99996	1.00000	0.99993	1.00000	<b>0.00012</b>
A27	0	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	1.00000	0.81440	0.80274		<b>0.99000</b>	<b>0.91723</b>	0.99204	0.84720	<b>0.00022</b>
A27	6	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.99000	0.99997	0.99996	<b>0.99000</b>		<b>1.00000</b>	1.00000	0.99999	<b>0.00012</b>
A27	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.91723	1.00000	1.00000	<b>0.91723</b>	<b>1.00000</b>		1.00000	1.00000	<b>0.00012</b>
TT	0	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.99204	0.99995	0.99993	0.99204	1.00000	1.00000		<b>0.99998</b>	<b>0.00012</b>
TT	6	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	0.84720	1.00000	1.00000	0.84720	0.99999	1.00000	<b>0.99998</b>		<b>0.00012</b>
TT	12	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00022</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00022</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.00012</b>	
Media		<b>100.150</b>	<b>72.630</b>	<b>69.630</b>	<b>6.410</b>	<b>1.520</b>	<b>0.070</b>	<b>6.410</b>	<b>2.330</b>	<b>0.960</b>	<b>2.440</b>	<b>0.370</b>	<b>20.040</b>
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	TT	TT	TT	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>

**TABLA C6a.** Análisis de varianza bifactorial para la actividad específica de proteasa

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	104141.7	1	104141.7	1602.827	<b>0.000000</b>
Método de conservación	10348.1	3	3449.4	53.089	<b>0.000000</b>
Tiempo	324.1	2	162.0	2.494	0.087937
Método de conservación*Tiempo	42014.2	6	7002.4	107.772	<b>0.000000</b>
Error	6237.5	96	65.0		

Valores fijos: Tratamiento (método de conservación; con cuatro niveles: congelado, acidificado a 4°C, acidificado a 27°C y tratamiento térmico; T: tiempo con tres niveles: semana 0, semana 6 y semana 12) Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**TABLA C6b.** Prueba de Tukey para la concentración actividad específica de proetasa con un nivel de confianza de 95%

C	0		<b>0.0002</b>	0.9998	<b>0.0021</b>	<b>0.0470</b>	0.9981	<b>0.0021</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
C	6	<b>0.0002</b>		<b>0.0010</b>	0.9980	<b>0.0001</b>	<b>0.0021</b>	0.9980	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	0.9560	<b>0.0001</b>
C	12	0.9998	<b>0.0010</b>		<b>0.0251</b>	<b>0.0044</b>	1.0000	<b>0.0251</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
A4	0	<b>0.0021</b>	0.9980	<b>0.0251</b>		<b>0.0001</b>	<b>0.0470</b>	1.0000	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	0.4175	<b>0.0001</b>
A4	6	<b>0.0470</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0044</b>	<b>0.0001</b>		<b>0.0021</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0070</b>	<b>0.0041</b>	<b>0.0038</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
A4	12	0.9981	<b>0.0021</b>	1.0000	<b>0.0470</b>	<b>0.0021</b>		<b>0.0470</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
A27	0	<b>0.0021</b>	0.9980	<b>0.0251</b>	1.0000	<b>0.0001</b>	<b>0.0470</b>		<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	0.4175	<b>0.0001</b>
A27	6	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0070</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>		1.0000	1.0000	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
A27	12	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0041</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	1.0000		1.0000	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
TT	0	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0038</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	1.0000	1.0000		<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>
TT	6	<b>0.0001</b>	<b>0.9560</b>	<b>0.0001</b>	0.4175	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	0.4175	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>		<b>0.0040</b>
TT	12	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0040</b>									
Media		<b>28.67</b>	<b>48.85</b>	<b>31.52</b>	<b>45.15</b>	<b>15.85</b>	<b>32.33</b>	<b>45.15</b>	<b>0.70</b>	<b>0.11111</b>	<b>0.00</b>	<b>54.26</b>	<b>70.04</b>
Semana	0	6	12	0	6	12	0	6	12	0	6	12	
Tratamiento	C	C	C	A4	A4	A4	A27	A27	A27	E	E	E	

C: congelado, A4: acidificado a pH 4.3 almacenado a 4°C, A27: acidificado a pH 4.3 almacenado a 27°C; TT: tratamiento térmico a 121°C y 15lb/plg<sup>2</sup>



**ANEXO E: Análisis estadístico de bioensayo de crecimiento de juveniles de camarón *itopeaeus vannamei***

**TABLA E1.** Análisis de varianza Supervivencia final (%)

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	12281011	1	12281011	937.5723	0.000000
Dieta	50241	4	12560	0.9589	<b>0.458133</b>
Error	196481	15	13099		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**TABLA E2.** Análisis de varianza del peso promedio final (%)

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	318.3860	1	318.3860	1222.591	0.000000
Dieta	0.7523	4	0.1881	0.722	<b>0.590123</b>
Error	3.9063	15	0.2604		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**TABLA E3.** Análisis de varianza de la tasa de crecimiento (%)

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	12281011	1	12281011	937.5723	0.000000
Dieta	50241	4	12560	0.9589	<b>0.458133</b>
Error	196481	15	13099		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**TABLA E4.** Análisis de varianza del alimento aparente consumido

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	0.045070	1	0.045070	1656.513	0.000000
Dieta	0.000043	4	0.000011	0.393	0.810475
Error	0.000408	15	0.000027		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**TABLA E4.** Análisis de varianza del Factor de conversión alimenticia (FCA)

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	157.3041	1	157.3041	2888.759	0.000000
Dieta	0.1910	4	0.0477	0.877	0.500878
Error	0.8168	15	0.0545		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**TABLA E5.** Análisis de varianza de la eficiencia proteica

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercepto	21.94509	1	21.94509	2613.600	0.000000
Dieta	0.02344	4	0.00586	0.698	0.605152
Error	0.12595	15	0.00840		

SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: suma de medias p: confianza

**ANEXO F: Resumen del bioensayo de crecimiento para juveniles de *Litopenaeus vannamei* con tratamientos con el 1% de inclusión de extracto de langostilla sometido a diferentes métodos de conservación.**

**TABLA F1.** Bioensayo de crecimiento a los 15 días

DIETA	Supervivencia (%)	Tasa de crecimiento (%)	Peso promedio final (g)	Alimento aparente consumido (mg/organismo/día)	Eficiencia proteica	FAC
<b>DC</b>	100 ±0.0	224.6 ±32.5	1.50 ±0.1	33.25 ±2.4	1.5 ±0.1	1.96 ±0.1
<b>DEC</b>	100 ±0.0	218.5 ±35.5	1.50 ±0.2	33.63 ±2.0	1.5 ±0.3	2.09 ±0.43
<b>DEA4</b>	100 ±0.0	233.7 ±20.5	1.50 ±0.1	33.13 ±2.0	1.5 ±0.1	1.89 ±0.14
<b>DEA27</b>	100 ±0.0	238.5 ±23.7	1.50 ±0.1	33.5 ±0.6	1.6 ±0.1	1.82 ±0.15
<b>DTT</b>	100 ±0.0	222.3 ±30.4	1.45 ±0.1	31.92 ±3.1	1.5 ±0.2	1.92 ±0.29

(DC): Dieta control; (DEC): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y congelado a -2°C; (DEA4): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y acidificado a pH 4.3 y almacenado a 4°C; (DEA27): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y acidificado a pH 4.3 y almacenado a 27°C; (DTT): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y tratamiento térmico

TABLA F2. Bioensayo a los 30 días

DIETA	Supervivencia (%)	Tasa de crecimiento (%)	Peso promedio final (g)	Alimento aparente consumido (mg/organismo/día)	Eficiencia proteica	FAC
DC	92.5	529.6	3.0	40.74	1.6	1.9
	±5.0	±51.7	±0.3	±6.0	±0.2	±0.2
DEC	92.5	532.5	2.86	44.03	1.5	2.01
	±9.6	±51.4	±0.2	±2.7	±0.1	±0.01
DEA4	95.0	546.1	3.0	41.49	1.5	1.9
	±5.8	±86.6	±0.4	±2.9	±0.1	±0.1
DEA27	95.0	587.2	3.06	43.11	1.6	1.87
	±5.8	±56.0	±0.3	±4.5	±0.1	±0.14
DTT	95.0	536.8	2.88	40.76	1.5	1.92
	±5.8	±95.2	±0.4	±3.9	±0.1	±0.15

(DC): Dieta control; (DEC): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y congelado a -2°C; (DEA4): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y acidificado a pH 4.3 y almacenado a 4°C; (DEA27): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y acidificado a pH 4.3 y almacenado a 27°C; (DTT): Dieta de extracto de langostilla desgrasado y tratamiento térmico