

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Efecto de extracto de ajo (*Allium sativum*) en dietas de camarón blanco

(*Penaeus vannamei*) sobre la melanosis post-cosecha

**Proyecto Integrador**

Previo a la obtención del título de:

**Ingeniero en Acuicultura**

Presentado por:

Gia Nicole Cepeda Tamayo

Jeimy Anallely Quimí González

Guayaquil – Ecuador

2023

## Dedicatoria

---

El presente proyecto lo dedico a mi familia. A mis padres Pilar, José, Giovanni y a mis hermanos, Gianna y Jean, quienes han sido mi apoyo y mi guía tanto en mi camino académico como personal. Ustedes son la razón de todo.

A nuestro equipo de trabajo, Ph.D. Stanislaus Sonnenholzner, Msc. Cecilia Tomalá y Dra. Jenny Rodríguez, por su inmedible paciencia, compromiso y dedicación. Sus consejos, lecciones y ejemplo los llevaremos grabados el resto de nuestra vida profesional. Esto no hubiese sido posible sin ustedes.

Este proyecto se lo dedico especialmente a Dios. Su presencia nos acompañó en la sabiduría, fortaleza y entendimiento que se requirió para llevarlo a cabo. Este documento no es más que una mera explicación de la inmensidad de su Creación.

Gia Cepeda

## Dedicatoria

---

El presente proyecto dedico a Dios por guiarme, darme sabiduría y fortaleza a través de los maravillosos padres Jimen y Cecilia, mis hermanos Roy y Jimmy quienes son el pilar fundamental de mi vida, por ser ejemplos de perseverancia, por su esfuerzo, apoyo, amor a lo largo de mi vida académica. A mi abuelita que desde el cielo es mi guía y siempre me alentó a superarme.

Jeimy Quimí

## Agradecimientos

---

Un profundo agradecimiento al personal del CENAIM que nos apoyó en la realización el presente proyecto. A Iván, Ricardo, Cristhian, Alejandro, Anita, Rosita, Nelson, Ramiro y Manuel. Solo ustedes saben y comparten el sacrificio que se requirió para su culminación.

Mis más sinceros agradecimientos a los docentes que nos ayudaron en este proyecto y en nuestra vida académica también. Especialmente al Msc. Jerry Landívar, Dr. Jorge Cuéllar-Anjel, Dr. Wilfrido Arguello, Dr. Marco Álvarez y Msc. Adrián Márquez. Su pasión por la acuicultura es la mejor enseñanza que nos han inculcado y forma ahora parte integral de nuestra vida profesional.

Finalmente, gracias a Juan Castillo. Tu incondicional apoyo, constante compañía y singular carisma fueron un pilar para este proyecto y para mi vida académica.

Gia Cepeda

## Agradecimientos

---

Mi más sincero agradecimiento a todo el personal de CENAIM que sin pensarlo brindaron su ayuda, en especial a MSc. Cecilia Tomalá por su paciencia y dedicación en la ejecución del proyecto. A los profesores que nos formaron profesionalmente, más a aquellos que dedicaron su tiempo para saber guiarnos. Gracias a los compañeros los momentos compartidos y por no hacerme sentir lejos de casa. A mis amigos David por el apoyo y perspicacia, a Anita por las risas compartidas que hicieron más ameno el proyecto, a Gia por confiar en mí como su compañera. A Gonther que, aunque no este físicamente a mi lado, su amor y lealtad durante las noches de estudios han sido parte de este logro académico.

Jeimy Quimí

## Declaración Expresa

---

Nosotras Cepeda Tamayo Gia Nicole y Quimí González Jeimy Anallely acordamos y reconocemos que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 6 de febrero del 2024.



Gia Nicole Cepeda  
Tamayo



Jeimy Anallely Quimí  
González

## Evaluadores



FORMA ELECTRONICA DE:  
JOSE JERRY LANDIVAR  
ZAMBRANO

---

**MSc. Jerry Landívar Z.**

Profesor de Materia

---

**PhD. Stanislaus Sonnenholzner**

Tutor de proyecto

## **Resumen**

Una de las principales preocupaciones que se enfrenta en la etapa de producción es el control de la melanosis del camarón. La melanosis se da por reacciones enzimáticas que se expresan en un cambio de color en los tejidos. Para neutralizar la actividad enzimática, se emplean antioxidantes como el Metabisulfito de Sodio (MBS) que previenen la melanosis. Sin embargo, este aditivo implica riesgos para la salud humana y para el medio ambiente. Por su perfil altamente antioxidante, se propuso el uso de extracto de ajo para controlar la melanosis en camarones.

Se evaluaron dos tratamientos de extracto de ajo: AJO 1 (0.036 ppm) y AJO 2 (0.180 ppm), suministrados por 10 días, y dos de cáscara de ajo: C5 y C10 (1.5 ppm), dados por 5 y 10 días respectivamente previo a la cosecha. Se corrieron múltiples pruebas para demostrar la efectividad de los extractos, las principales fueron actividad fenoloxidasa, melanosis y organoléptica. Los resultados demostraron que C5 disminuye la actividad base de la fenoloxidasa, pero no de manera significativa, este tratamiento es el que más inhibe la aparición de la melanosis retrasándola aproximadamente 36 horas post-cosecha y es el que mejor palatabilidad y receptividad presentó.

**Palabras Clave:** Camarón, melanosis, MBS, extracto, ajo

## **Abstract**

One of the main concerns faced at the production stage is the control of shrimp melanosis. Melanosis is caused by enzymatic reactions that are expressed in a change of color in the tissues. To neutralize enzyme activity, antioxidants such as Sodium Metabisulfite (MBS) are used to prevent melanosis. However, this additive poses risks to human health and the environment. Due to its highly antioxidant profile, the use of garlic extract was proposed to control melanosis in shrimps.

Two treatments of garlic extract were evaluated: AJO 1 (0.036 ppm) and AJO 2 (0.180 ppm), supplied for 10 days, and two of garlic peel: C5 and C10 (1.5 ppm), given for 5 and 10 days respectively prior to harvest. Multiple tests were run to demonstrate the effectiveness of the extracts, the main ones were phenoloxidase activity, melanosis and organoleptic. The results showed that C5 decreases the base activity of phenoloxidase but not significantly, this treatment is the one that most inhibits the appearance of melanosis delaying it approximately 36 hours postand is the best palatability and receptivity presented.

**Keywords:** Shrimp, melanosis, MBS, extract, garlic

## Índice General

Dedicatoria.....	II
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos .....	IV
Agradecimientos .....	V
Declaración Expresa .....	VI
Evaluadores.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
Índice General.....	X
Abreviaturas.....	XII
Simbología .....	XIII
Índice de figuras.....	XIV
Índice de tablas .....	XV
Capítulo 1.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Descripción del problema .....	3
1.2 Justificación del problema .....	5
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos específicos .....	6
1.4 Marco Teórico.....	6
1.4.1 Sistemas de defensa en el camarón ( <i>Penaeus vannamei</i> ).....	6
1.4.2 Melanosis en invertebrados.....	8
1.4.3 Metabisulfito de sodio en la acuicultura .....	9
1.4.4 Actividad antioxidante del ajo ( <i>A. Sativum</i> ) .....	10
1.4.5 Actividad Antibacteriana del ajo ( <i>A. Sativum</i> ) en <i>Penaeus vannamei</i> .....	11
Capítulo 2.....	12
2. Metodología.....	13
2.1 Preparación de extracto de ajo .....	13
2.1.1 Preparación de extracto diente de ajo .....	13
2.1.2 Preparación de extracto cáscara de ajo .....	13
2.2 Pruebas de concentración <i>In Vitro</i> .....	14
2.3 Prueba melanización <i>In Vivo</i> .....	14

2.3.1	Adición de extractos en el alimento.....	14
2.3.2	Prueba Preliminar.....	16
2.3.3	Prueba melanización en campo.....	17
2.3.4	Protocolo de Cosecha.....	19
2.4	Pruebas Inmunológicas .....	20
2.4.1	Determinación de hemograma en camarones .....	20
2.4.2	Determinación de Actividad Fenoloxidasa (PO) .....	20
2.4.3	Determinación de sulfitos en tejidos de camarón: Prueba Kjeldahl .....	21
2.4.4	Melanosis .....	22
2.4.5	Análisis Microbiológico de intestino de camarón .....	24
2.4.6	Prueba organoléptica.....	24
2.4.7	Análisis .....	25
2.4.7.1	Análisis estadístico.....	25
2.4.7.2	Análisis de Costos.....	26
Capítulo 3.....		27
3.	Resultados.....	28
3.1.1	In Vitro.....	28
3.1.2	Pruebas Inmunológicas In Vivo.....	28
3.1.2.1	Crecimiento y supervivencia.....	28
3.1.2.2	Análisis de Hemograma .....	29
3.1.2.3	Actividad Fenoloxidasa .....	30
3.1.3	Análisis Residual de sulfitos en tejidos de camarón: Prueba Kjeldahl.....	32
3.1.4	Análisis de Melanosis .....	33
3.1.5	Análisis Microbiológico en Intestinos .....	36
3.1.6	Análisis Organoléptico.....	36
3.1.7	Análisis de costos.....	37
Capítulo 4.....		41
4.1	Conclusiones y recomendaciones .....	42
4.1.1	Conclusiones .....	42
4.1.2	Recomendaciones .....	45
Referencias.....		46
Anexos .....		51

## **Abreviaturas**

ESPOL – Escuela Superior Politécnica del Litoral

CENAIM – Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

MBS – Metabisulfito de Sodio

CEE – Comunidad Económica Europea

EPP – Equipo de Protección Personal

PPO – Polifenol Oxidasa

PO – Fenoloxidasa

RSPCA – Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales

CNA – Cámara Nacional de Acuicultura

## **Simbología**

rcf – fuerza centrífuga relativa

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Tipo de hemocitos: (A) Hialinos, (B) Semigranuloso, (C) Granuloso .....	7
<b>Figura 2</b> Proceso de activación de la ProPPO .....	8
<b>Figura 3</b> Sistema circulatorio (A), melanosis en camarones visualizada en puntos críticos del sistema circulatorio (B). .....	9
<b>Figura 4</b> Preparación de extracto diente de ajo .....	13
<b>Figura 5</b> Preparación de extracto de cáscara se ajo .....	14
<b>Figura 6</b> Dosificación de los extractos en el alimento balanceado .....	15
<b>Figura 7</b> Diseño Experimental .....	18
<b>Figura 8</b> Procedimiento de prueba Kjeldahl.....	22
<b>Figura 9</b> Lecturas OD de muestras: actividad estimulada (laminarina) y base (cacodilato) por extractos .....	28
<b>Figura 10</b> Hemocitos diferenciados (cel/ml <sup>3</sup> ) por tratamiento .....	30
<b>Figura 11</b> Lecturas OD de muestras con actividad estimulada (laminarina) y no estimulada (cacodilato) por tratamiento.....	31
<b>Figura 12</b> Tasa de actividad fenoloxidasa por tratamiento .....	32
<b>Figura 13</b> Melanosis en cada tratamiento a partir del día 2 de refrigeración: (A) sin MBS, (B) con MBS.....	34
<b>Figura 14</b> Melanosis en cada tratamiento en camarones descongelados: (A) sin MBS, (B) con MBS.....	35
<b>Figura 15</b> UFC (Log <sub>10</sub> ) de bacterias totales y vibrios por tratamiento.....	36
<b>Figura 16</b> Punto de equilibrio del extracto de cáscara .....	40

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Adición de extracto de ajo por tratamiento</i> .....	15
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación de Melanosis</i> .....	24
<b>Tabla 3</b> <i>Porcentajes de supervivencia</i> .....	29
<b>Tabla 4</b> <i>Promedios de pesos iniciales, finales y peso ganado</i> .....	29
<b>Tabla 5.</b> <i>Concentración de sulfitos residuales en camarones tratados con MBS</i> .....	33
<b>Tabla 6</b> <i>Promedio de calificaciones de prueba de Melanosis en camarones refrigerados sin MBS</i> .....	34
<b>Tabla 7</b> <i>Promedio de calificaciones de prueba de Melanosis en camarones congelados sin MBS</i> .....	35
<b>Tabla 8</b> <i>Promedio de calificaciones de prueba organoléptica</i> .....	37
<b>Tabla 9</b> <i>Desglose de costos para la preparación del extracto de cascarilla</i> .....	38
<b>Tabla 10</b> <i>PVP de los extractos y del MBS</i> .....	39

## **Capítulo 1**

## **1. Introducción**

En Ecuador, desde el origen de la camaronicultura en los años 60, hasta hoy, se ha registrado un crecimiento exponencial de la exportación del camarón, alcanzando cifras históricas en 2023. Según la Cámara Nacional de Acuicultura (2023), para noviembre del 2023, el volumen de exportación alcanzó las 216'042,043 libras, aumentando un 14% en comparación con el mismo período del 2022.

La creciente y exigente demanda externa del camarón, ha obligado a los productores acuícolas a mejorar las propiedades de dicho producto. En términos de calidad, una de las principales preocupaciones que se enfrenta en la etapa de producción es el control de la melanosis del camarón. La melanosis consiste en la decoloración u oscurecimiento inofensivo que ocurre en la cabeza, la cola, los apéndices natatorios y otras partes del cuerpo del camarón (Lucien-Brun, 2016). Se da por una serie de reacciones enzimáticas, que se expresan en un cambio de color en los tejidos que, pese a no ser un indicador del deterioro bacteriano y no cambiar el sabor ni el olor del camarón, sí afecta su presentación e imagen. De acuerdo a Bermúdez-Medrandá & Panta-Vélez (2019), esta condición de calidad afecta la comercialización del producto, siendo la melanosis la causa de mayor rechazo del producto en el mercado internacional.

La industria camaronera busca neutralizar la actividad enzimática mediante inhibidores que prevengan la melanosis y que no alteren el sabor ni la textura del camarón. En Ecuador, el producto más utilizado es el Metabisulfito de Sodio (MBS) por su eficiencia y fácil aplicación (Llerena, 2011). No obstante, el MBS implica riesgos para la salud humana y para el medio ambiente debido a que emplea sulfitos como principio activo, considerados como sustancia tóxica. Esta toxicidad se da tanto en la manipulación del MBS, al ser corrosivo e irritante, como por su consumo a través de la cadena alimenticia en personas susceptibles.

Puede causar problemas de salud a algunos consumidores, especialmente a personas que padecen asma o deficiencias de sulfito oxidasa (Lucien-Brun, 2005). Por consiguiente, agencias reguladoras como la Comunidad Económica Europea (CEE) o la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) han establecido límites máximos de concentración de sulfitos residuales en los tejidos del camarón destinados al consumo para controlar los efectos adversos que pueda tener en la salud humana.

El uso de inhibidores alternativos que contrarresten la melanosis con la misma eficiencia y menor riesgo para la salud humana puede resultar atractivo para la industria camaronera. Entre las propuestas se encuentra el uso de productos naturales para aprovechar las propiedades antioxidantes que posean. El ajo es conocido por sus numerosas bondades al aplicarse en cultivos acuícolas y su carácter altamente antioxidante lo convierte en un candidato atractivo. En los animales acuáticos, el ajo tiene propiedades antibacterianas, antiparasitarias, antioxidantes e inmunoestimulantes, y se estudia experimentalmente como promotor del crecimiento (Europa Azul, 2021).

Por consiguiente, en el presente estudio se evaluará el efecto de extracto de ajo (*Allium sativum*) suministrado en dietas para camarón blanco (*Penaeus vannamei*) con la finalidad de determinar el efecto que posee sobre la melanosis post-cosecha. Este análisis se enfocará en explorar la respuesta inhibitoria del ajo sobre la enzima fenoloxidasa para inhibir la melanosis, de manera en que se suspenda o reduzca el uso de MBS en las cosechas.

### **1.1 Descripción del problema**

El uso de MBS implica riesgos tanto para la salud humana como ambiental. Uno de los mayores riesgos relacionados al MBS se da durante la cosecha de camarones en la manipulación del químico, razón por la cual en las fichas de seguridad de dicho insumo (INEOS Calabrian, 2015; Supelco, 2023) se indica que presenta toxicidad aguda por ingestión, por vía cutánea y lesiones o irritación ocular grave. Por ello, el uso de equipo de

protección personal (EPP) es de carácter obligatorio, tales como protección ocular y facial completa, ropa que proteja las extremidades junto a guantes, botas, mandil y mascarilla con filtro para partículas.

Pese a darse en casos muy puntuales, existen también riesgos para la salud humana asociados a la ingesta de residuales de sulfitos a través de la cadena alimenticia. Según Loubes et al. (2009), se atribuye múltiples reacciones alérgicas al consumo de sulfitos, en especial en personas sensibles o asmáticas, pudiendo provocar respuestas dérmicas como urticaria, prurito, eczemas o respiratorias como constricción bronquial o rinitis; en casos graves puede llegar a generar shock anafiláctico.

Con respecto al aspecto ambiental, existe un riesgo marginal para los cuerpos acuáticos en los que los residuos de MBS son desechados. Según Rodríguez (2017) estipula, esto se debe a que tales descargas pueden provocar que los cuerpos de agua disminuyan su capacidad natural de absorber o neutralizar tales contaminantes, por lo que pierden la facultad de sustentar de manera adecuada la vida acuática.

La descarga de agua con MBS residual sin previo tratamiento en cuerpos de agua naturales reacciona con el oxígeno disuelto (OD) provocando la formación de compuestos nocivos como dióxido de azufre gaseoso ( $\text{SO}_2$ ) junto a sustancias acidificantes como bisulfato de sodio ( $\text{NaHSO}_4$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) (Aragao et al., 2008; Portillo et al., 2014). Como resultado, además de la acidificación, también se reduce la concentración natural de OD. Según Boyd & Gautier (2002), cuando el MBS se disuelve en agua, se hidroliza para formar sulfito de ácido sódico (también llamado bisulfito sódico). Cada miligramo de bisulfito de sodio puede consumir 0,15 miligramos por litro de oxígeno disuelto. Con 50.000 miligramos por litro, una solución de 5 por ciento de bisulfito de sodio puede reaccionar rápidamente con una gran cantidad de oxígeno disuelto. Cada miligramo de

bisulfito de sodio puede producir suficientes iones de hidrógeno para reducir la concentración total de alcalinidad en 0,48 miligramos por litro.

La lista de consecuencias que desencadena el uso de MBS es extensa, por lo que se vuelve imperioso el uso de sustancias menos nocivas tanto para la salud humana como para la ambiental.

La presente investigación se realizó en colaboración con el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM-ESPOL.

### **1.2 Justificación del problema**

Debido a los riesgos relacionados con el MBS, entidades reguladoras como la FDA o la CEE imponen concentraciones máximas aceptables detectables en los camarones, que va de 100 a 150 ppm, tanto por razones de inocuidad como por los riesgos a la salud, hecho que impone una obligatoriedad en los productores a regirse bajo minuciosos protocolos de cosecha con estrictos controles de tiempo y concentración.

A partir de esto, se origina la demanda de un antioxidante alternativo igual de efectivo, con el que se respete las normativas de inocuidad internacionales y que tenga menos efectos adversos. El presente estudio propone el uso del ajo como reemplazo parcial o total del MBS. Para ello se analizará la capacidad inhibidora del extracto de ajo sobre la enzima fenoloxidasa, la responsable de la melanosis. Con esto se espera evitar de manera significativa la melanosis en los tejidos del camarón, con lo que se tendrá un producto inhibidor que no representa un riesgo de calidad y menos nocivos tanto para la salud humana como la ambiental, que no altera las características organolépticas del camarón (olor y sabor) y que es de fácil manejo y administración.

Además, dada sus propiedades antibióticas y bactericidas, se espera reducir la carga bacteriológica presente en el intestino del camarón de manera significativa, enfocado en

bacterias patógenas como los vibrios, con lo cual se mejorará la calidad y salud general del camarón, si comprometer la flora intestinal.

Se espera obtener también una ventaja económica al reducir los costos de producción por la disminución del uso de MBS al reemplazarlo por el extracto de ajo en las cosechas de camarón.

### **1.3 Objetivos**

#### ***Objetivo General***

Evaluar el efecto del extracto de ajo (*Allium sativum*) en dietas de alimentación previo a cosechas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) para evitar la melanosis del cefalotórax

#### ***Objetivos específicos***

- Determinar el efecto inhibitorio del ajo a tres concentraciones sobre camarón blanco (*Penaeus vannamei*) post mortem mediante pruebas de inmunología y microbiología.
- Evaluar la apariencia, sabor, textura y olor en camarón blanco (*Penaeus vannamei*) tratado con ajo (*Allium sativum*) a través de pruebas organolépticas.
- Determinar el costo del uso de extracto de ajo como tratamiento pre-cosecha en el camarón.

### **1.4 Marco Teórico**

#### ***Sistemas de defensa en el camarón (Penaeus vannamei)***

Poseen un sistema inmune innato y un sistema circulatorio abierto. El fluido encargado de transportar nutrientes, oxígeno, hormonas y otras moléculas a los órganos se conoce como hemolinfa, equivalente a la sangre en mamíferos. La hemolinfa está compuesta por hemocitos y plasma. Se reconocen morfológicamente tres tipos de hemocitos: hialinos, semigranulosos y granulosos.

Los h. hialinos se caracterizan por no tener gránulos, disponer su núcleo en el centro y por poseer un citoplasma delgado (Figura 1A). Según Fonseca et al. (2016), estos son los responsables de iniciar la defensa contra antígenos patógenos mediante el mecanismo de coagulación, el cual los captura e inmoviliza. Los h. semigranulosos se diferencian por poseer un núcleo que puede ser redondeado o en forma de hoz y por presentar múltiples gránulos pequeños (Figura 1B). En los camarones, estas células intervienen en la fagocitosis, encapsulación y en la liberación del sistema profenoloxidasa proPPO (melanización) (Rendón & Balcázar, 2016). Los h. granulosos destacan por ser células grandes debido a que poseen gránulos extensos y una alta relación citoplasma-núcleo (Figura 1C). Estas almacenan las enzimas que constituyen el sistema proPO a un nivel más alto que los semigranulosos y, al igual que los hemocitos semigranulosos, sintetizan y almacenan las peneidinas e intervienen en la encapsulación (Valenzuela, 2013).

### Figura 1

*Tipo de hemocitos: (A) Hialinos, (B) Semigranuloso, (C) Granuloso*



Fuente: Giulianini et al., 2007

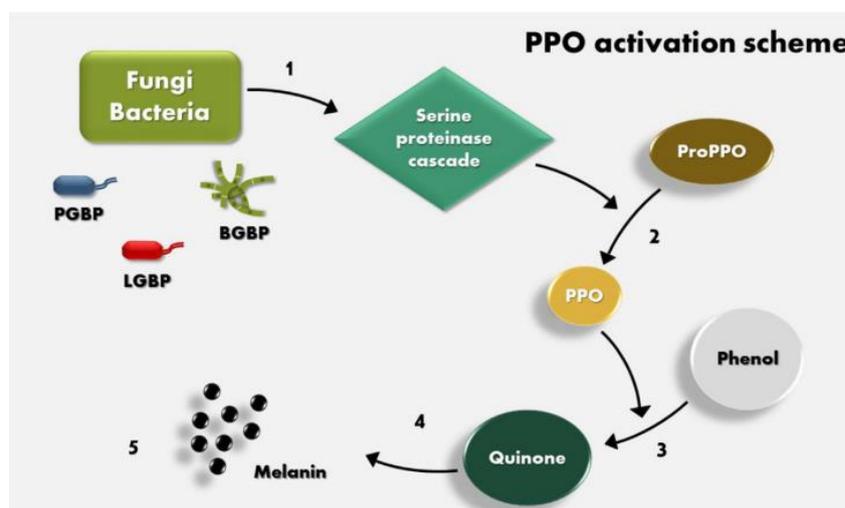
En el tejido hematopoyético del cefalotórax del camarón se originan los hemocitos y, de acuerdo con Morales & Cuéllar-, la cantidad varía de acuerdo con el ciclo de muda. Cuando ocurren infecciones los hemocitos circundantes en la hemolinfa decrecen porque se acumulan en lugares de infección, por lo que no pueden reconocerse hemocitos libres circundantes.

## *Melanosis en invertebrados*

Según Ragan (2011), la melanosis es la aparición de una coloración oscura en el camarón, la cual es producida por la reacción enzimática de polifenol oxidasa (PPO). Las PPO existen en los crustáceos como zimógenos (proPPO). De acuerdo con lo estipulado por Wang et al. (2006), la activación del ProPPO ocurre por acción de moléculas (proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos) asociados a patógenos como bacterias y hongos, lo cual desencadena una cascada de serina proteinasa. Este proceso induce a la ProPPO a convertirse en PPO activada. A partir de este punto, la PPO cataliza la conversión de fenoles en quinonas incoloras, que al oxidarse se convierten en pigmentos oscuros llamados melanina. La melanina es la sustancia responsable del oscurecimiento de los crustáceos conocida como melanosis. El proceso de activación de la ProPPO se muestra en la Figura 2.

**Figura 2**

*Proceso de activación de la ProPPO*



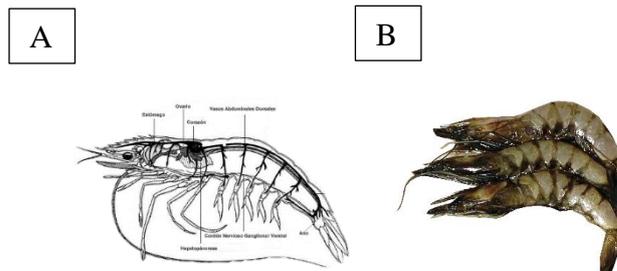
Fuente: Gonçalves & de Oliveira, 2016

Bermúdez-Medranda et al. (2019) mencionan que, pese a no alterar su valor nutricional, provoca la disminución en cualidades estéticas y en la aceptación del producto final por parte del consumidor. Es importante mencionar que, este proceso al llevarse a cabo en la

hemolinfa, el oscurecimiento empieza en el cefalotórax cerca del corazón, siguiendo por los senos branquiales, arterias ubicadas en abdomen y urópodos. Según Göpel & Wirkner (2020), se observa más melanización en las partes del sistema circulatorio donde se irriga la hemolinfa, más no se presenta directamente en la cutícula como se cree popularmente.

### Figura 3

*Sistema circulatorio (A), melanosis en camarones visualizada en puntos críticos del sistema circulatorio (B).*



### ***Metabisulfito de sodio en la acuicultura***

El MBS es usado generalmente en la industria alimenticia ya sea por su propiedad desinfectante, antioxidante o conservante. Este compuesto es una sal sódica de apariencia blanca y cristalina; su fórmula química es  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Dentro del campo de la acuicultura, es conocido por inhibir el proceso enzimático de la melanosis y el crecimiento de microorganismos como hongos y bacterias.

El mecanismo de reacción del MBS, según Lucien-Brun (2016), parte de los sulfitos ( $\text{SO}_2$ ) presentes en el compuesto, los cuales reaccionan con el oxígeno presente en los tejidos del camarón y se convierten en  $\text{SO}_4^{2-}$ . La captura del oxígeno evita que la PPO reaccione y de paso a la melanosis. Sin embargo, el efecto otorgado por el MBS no es permanente, con el tiempo y con la variación de la temperatura los residuales de sulfitos en los tejidos del camarón disminuyen, provocando que se reanude el proceso enzimático responsable de la melanosis.

En Ecuador, la práctica común es aplicar MBS a concentraciones de entre 10 y 15 %, con lo que se puede tratar de 1200 a 1500 libras de camarón. Estas concentraciones resultan en residuales de sulfito dentro de un rango aceptable para cumplir con las normativas internacionales de concentración máxima permisible.

### ***Actividad antioxidante del ajo (A. Sativum)***

De origen asiático, es una planta herbácea de la familia Alliaceae, es usado como condimento en la cocina y desde la antigüedad se le ha dado un beneficio medicinal por sus compuestos. Según Moutia et al. (2018), contiene alrededor de 200 compuestos químicos con varias propiedades. Compuesto por 65% de agua, 28% de carbohidratos, 2,3% compuestos organosulfurados, 2% proteína, 1,2% aminoácidos libres y 1,5% fibra.

Jikah & Edo (2023) afirman que las propiedades de *Allium sativum*, entre las que se encuentra la antiviral, fungicida, antibiótica, entre otras, están vinculados a los compuestos sulfurados que contiene, tal como la alicina, trisulfuro de dialilo, ajoenos, vinilhidinas, etc.

La inhibición o prevención de la melanosis se centra en eliminar uno o más de los componentes esenciales del proceso – enzima, oxígeno y/o cobre (Gokoglu & Yerlikaya, 2008). El mecanismo antioxidante del ajo para prevenir la melanosis en camarón no está claro, sin embargo, se puede atribuir a los compuestos organosulfurados. Por ejemplo, la cisteína S-alílica (SAC) previene el daño oxidativo y nitosativo a las biomoléculas, ahorra especies reactivas de oxígeno (ROS), induce enzimas antioxidantes, inhibe enzimas peroxidantes como la xantina oxidasa y la ciclooxigenasa, y quela metales como manganeso, cobre, zinc y cobalto. Al ser un agente quelante de cobre, interviene e incapacita el mecanismo de la activación de la enzima PO, debido a que esta es dependiente de iones libres de cobre, por lo que impide la formación de dicha enzima y eventualmente la generación de melanina.

### *Actividad Antibacteriana del ajo (A. Sativum) en Penaeus vannamei*

Un factor limitante dentro de la producción en la acuicultura es las enfermedades infecciosas (Pérez-Sánchez et al., 2018). La prevención y los tratamientos para enfermedades causadas por bacterias comúnmente involucran antibióticos, pero su uso descontrolado en el camarón contribuye a la generación de resistencia bacteriana.

Untari (2010), menciona que el ajo inhibe bacterias, hongos y protozoarios. Entre los compuestos organosulfurados que posee se encuentra la aliina, la cual cuando es macerada o triturada activa la enzima alinasa, que da lugar a la alicina, pues liberan compuestos sulfurados dando como resultado el olor característico del ajo. La aliina y la alicina son los compuestos bioactivos del ajo que dan los beneficios a la salud (Melguizo-Rodríguez et al., 2022). La alicina contiene efectos inhibidores sobre enzimas como las cisteínas-proteinasas y alcohol-deshidrogenasas, las cuales desempeñan funciones en infecciones causadas por hongos y bacterias (García Gómez & Sánchez-Muniz, 2000). La alicina es un compuesto que en la biología del ajo, al ser inestable tiende a convertirse en varios compuestos, como ajoenos y polisulfurados de dialilo, los cuales exhiben actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cavallito & Bailey, 1944).

## **Capítulo 2**

## 2. Metodología

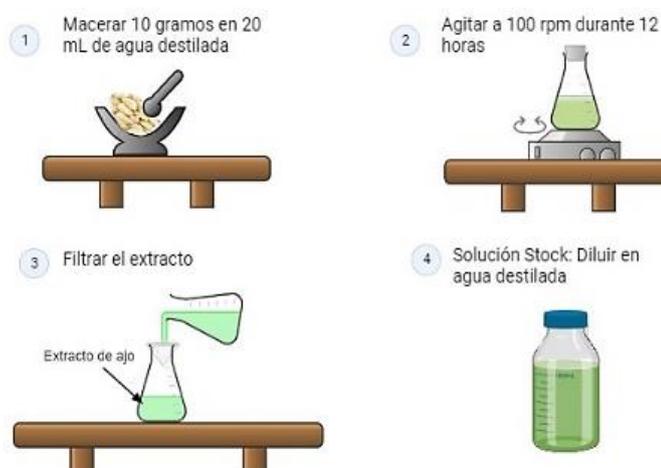
### 2.1 Preparación de extracto de ajo

#### *Extracto de diente de ajo*

Para la obtención del extracto de ajo, se maceró 10 g de ajo diluidos en 20 mL de agua destilada, con agitación constante de 100 rpm a de 25°C por 12 horas (Agurto et al., 2022). Transcurrido este tiempo, se purificó la solución con filtro de 8 micras para eliminar excedentes sólidos y se preservó en refrigeración.

#### **Figura 4**

##### *Preparación de extracto diente de ajo*



#### *Extracto de cáscara de ajo*

Para la preparación de extracto de cáscara de ajo (Figura 4), se empleó una relación de 0,5 gramos de cáscara en 20 mL de agua destilada, la cual fue llevada a un microondas a 200°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se purificó la solución con filtro de 8 micras para eliminar excedentes sólidos y se preservó en refrigeración.

## Figura 5

### Preparación de extracto de cáscara se ajo



## 2.2 Pruebas de concentración *In Vitro*

De los extractos obtenidos, a partir de lo usado en otros estudios (Agurto et al., 2022) se evaluaron concentraciones de extracto de ajo puro (0.036 y 0.180 mg/) y de extracto crudo de cáscara de ajo (1.5 ppm) basándose en los resultados que menciona (Noda et al., 2019). Se realizó pruebas de actividad fenoloxidasas a partir de hemolinfa extraída de camarones sanos de 7 gramos promedio, con la finalidad de evaluar la actividad inhibitoria de dichas concentraciones.

## 2.3 Pruebas *In Vivo*

### *Adición de extractos en el alimento*

Previo a la preparación de la dieta, se realizó una solución stock de los extractos de diente de ajo y cascarilla de ajo a las concentraciones establecidas previamente en el ensayo *in vitro* (Tabla 1). Preparada la solución, se la añadió al alimento comercial (28% de proteína) dejándolo 10 minutos en reposo para su respectiva absorción en el pellet. Finalmente, se adicionó aceite de pescado como sellante y con la finalidad de mejorar la palatabilidad (Figura 6).

**Tabla 1** Adición de extracto de ajo por tratamiento

Tratamiento	Nomenclatura	Descripción	Relación
Tratamiento Control	CONTROL	No se aplicó extracto	NA
Tratamiento A	AJO1	Extracto de Ajo a 0,036 ppm	36 ug/kg
Tratamiento B	AJO2	Extracto de Ajo a 0,180 ppm	180 ug/Kg
Tratamiento C5	C5	Extracto de cáscara de ajo suministrado por 5 días a 1.5 ppm	1500 ug/Kg
Tratamiento C10	C10	Extracto de cáscara de ajo suministrado por 10 días a 1.5 ppm	ug/K g

**Figura 6**

*Dosificación de los extractos en el alimento balanceado*



### ***Prueba Preliminar***

A partir de los resultados evaluados *in vitro*, las concentraciones fueron empleadas en un estudio preliminar *in vivo* para observar el grado de melanización del camarón después de la cosecha y determinar la metodología al llevar la prueba a campo.

Previo a la siembra de los camarones se instaló un sistema en la sala experimental #6 del CENAIM, con 9 gavetas cada una con 40 L de agua de mar filtrada, donde se colocaron barras calentadoras para mantener una temperatura de 30°C; 6 de las gavetas se usaron como acuarios y las sobrantes como reservorio.

Del CENAIM ubicado en San Pedro-Santa Elena, fueron tomados sesenta camarones con peso promedio de 7 gramos, se distribuyeron en 3 tratamientos: Control (sin extracto); Ajo 1 (0,036 mg/L) y Ajo 2 (0,0180 mg/L) de extracto de ajo. Cada tratamiento constó de 2 réplicas. Estuvieron aproximadamente 1 día en aclimatación para luego empezar con la alimentación, aplicada en dos dosis al 5 % de biomasa durante 10 días, manteniendo un recambio de 50% y aireación constante.

Tras dicho período se cosecharon los camarones. Cada unidad experimental primero fue sometida a tratamiento de temperatura (agua y hielo) para causar un shock térmico en los camarones. Posteriormente, a la mitad de la población de cada unidad se le aplicó el tratamiento con MBS al 0%, 1.25%, 5% y 10%; la otra mitad fue recolectada para extraer hemolinfa y realizar la prueba de actividad fenoloxidasas. De los camarones tratados con MBS, un grupo fue congelado y otro refrigerado para evaluar la presencia de melanosis según el transcurso del tiempo y según el método de preservación (congelación o refrigeración).

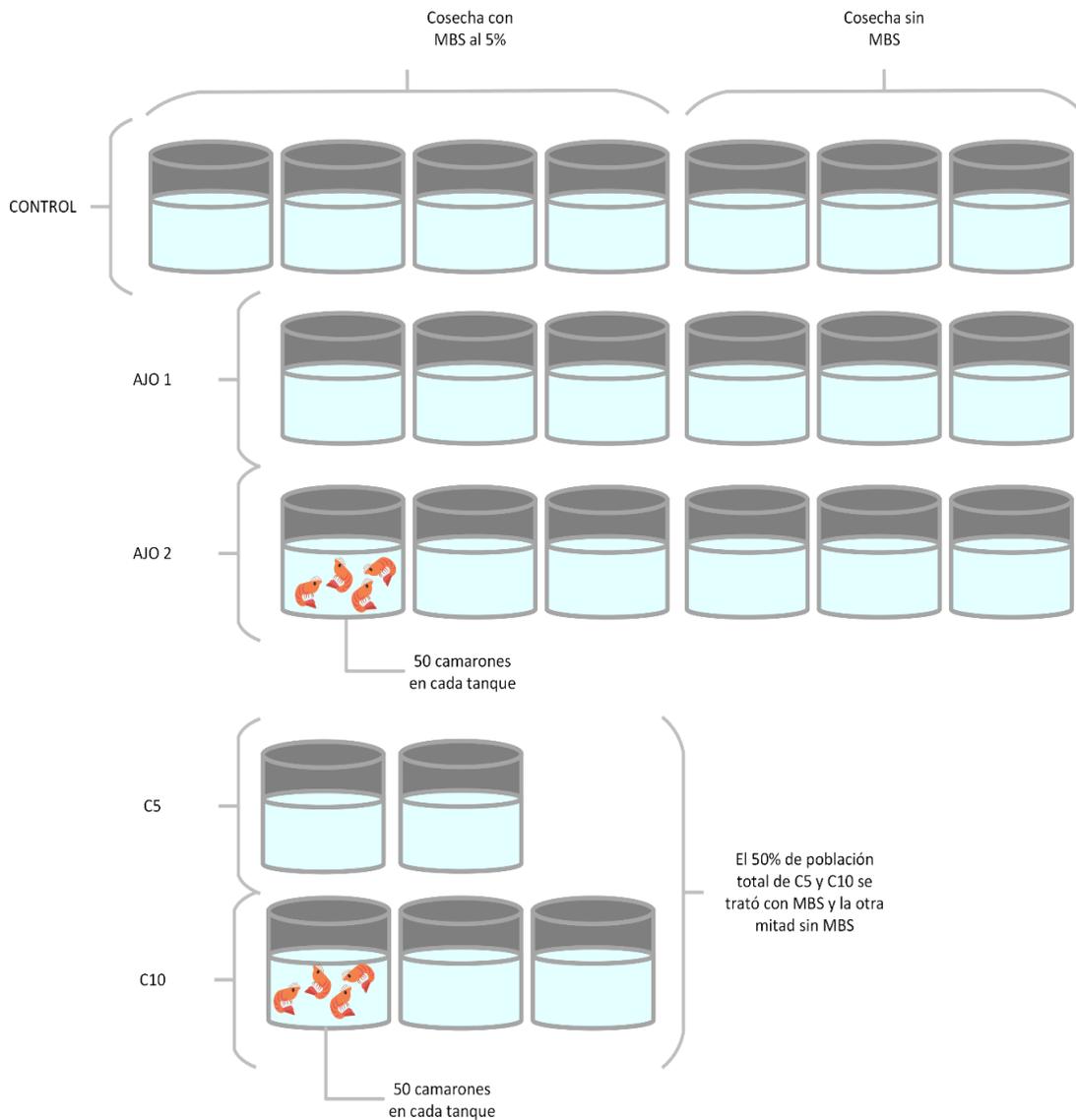
### ***Prueba en campo***

En la estación experimental del CENAIM en Palmar-Santa Elena, se prepararon 24 tanques (1 TN) con agua del reservorio de camaronera a una salinidad promedio de 34 ppm y temperatura promedio de 29°C. Se realizó el 50% de recambio de agua diario y se mantuvo aireación constante.

Se colectaron 1200 camarones con peso promedio de 11 gramos. Los camarones fueron distribuidos en las 24 unidades experimentales con 50 individuos en cada una. Se establecieron 5 tratamientos: Tratamiento Control (CONTROL): 7 réplicas; Tratamiento A (AJO 1): 6 réplicas; Tratamiento B (AJO 2): 6 réplicas; Tratamiento Cáscara (C10); 3 réplicas; Tratamiento Cáscara (C5): 2 réplicas. Los tanques réplica fueron distribuidos de manera aleatoria y se aclimataron los animales en dichos tanques una semana antes de empezar a suministrar los tratamientos a través del alimento (28% de proteína).

Este ensayo se realizó 10 días previo a la cosecha. Los tanques se ubicaron en la camaronera al aire libre y se llenaron con agua del canal reservorio con la finalidad de acercar las condiciones de los tanques a la natural. Se estableció la dosis de alimentación diaria del 5% de la biomasa de cada unidad experimental. En el gráfico a continuación se ilustra el diseño experimental empleado.

**Figura 7**  
*Diseño Experimental*



Aleatoriamente se escogieron 3 réplicas de los tratamientos Control, Ajo 1 y Ajo 2 para ser sometidos a el tratamiento con MBS; en los en los tratamientos C10 y C5 la población total se dividió en dos, una para ser tratada con MBS y la otra sin MBS. De cada unidad experimental se extrajo de los camarones la hemolinfa para la prueba de actividad fenoloxidasa y los intestinos para la prueba de microbiología. En el caso de los tratamientos Control, Ajo 1 y Ajo 2 se tomaron 10 animales, para C5 y C10 5 animales de cada replica. Posterior a la cosecha y

tratamiento, los camarones fueron ordenados en empaques, etiquetados y colocados en gavetas con camas de hielo para su transporte a los laboratorios del CENAIM.

Adicionalmente, se realizó un control de la supervivencia y de la ganancia de peso considerando los datos de la población y peso inicial y final, al momento de la cosecha. Esto se llevó a cabo con el objetivo de determinar si las múltiples propiedades del ajo, como la inmunoestimulación, influyen en dichos aspectos. Los resultados se presentan como porcentaje de supervivencia y peso inicial, final y ganancia de peso en gramos

### ***Protocolo de Cosecha***

Todos los camarones cosechados provenientes de los diferentes tratamientos fueron sumergidos en tanques (gavetas) que contenían agua salada y hielo, a 4°C. Por un lapso de 2 a 3 minutos se sometieron a los animales a un shock térmico. Esta práctica tiene el objetivo de minimizar el estrés de los camarones dado que se limita su capacidad para sentir dolor, además de mantener la calidad e inocuidad de estos, razón por la cual es considerada como una práctica humanitaria y está aprobada por la Real Sociedad para la Prevención de la Crueldad a los Animales (RSPCA).

Se preparó Metabisulfito al 5% en los contenedores con hielo. Esta concentración es la mitad de lo que normalmente se emplea en el país para las cosechas, con lo que se espera reducir de igual manera la cantidad de sulfitos residuales en los tejidos de los camarones. Se decidió emplear menos MBS con el objetivo de determinar la factibilidad de reducir el uso de MBS en cosechas reales al suministrar extracto. Para ello, se emplearon gavetas en las que se diluyó el MBS en agua salada; el volumen de agua empleada para la disolución representó el 60% del volumen final. Posteriormente, se completó el otro 40% del volumen requerido con hielo. Se sumergieron a los camarones en el tratamiento químico durante 10 minutos.

## **2.4 Pruebas Inmunológicas**

### ***Determinación de hemograma en camarones***

El hemograma se realizó para evaluar el estado general de salud de los camarones sometidos a los tratamientos de extractos. La hemolinfa del camarón fue retirada del seno ventral ubicado en la base del primer segmento abdominal usando una jeringa de 1 ml que contiene 100  $\mu$ L de solución de citrato de sodio (10%) como describen Muñoz et al. (2000). Posteriormente se realizó un pool (100  $\mu$ L/ tanque) de hemolinfa por cada tratamiento Control, Ajo 1, Ajo 2, C10 y C5.

Se determinaron los recuentos totales de hemocitos (THC) para camarones individuales (n=10, por Tratamiento) utilizando una cámara de Neubauer. La hemolinfa se recogió directamente en una solución fijadora que consistía en formaldehído al 3.7%, El porcentaje relativo de las diferentes poblaciones de hemocitos (recuento diferencial de hemocitos o DHC) se estimó en frotis húmedos de hemolinfa fijos contados, bajo un microscopio de contraste de fases.

### ***Determinación de Actividad Fenoloxidasasa (PO)***

Esta prueba se realizó según el protocolo implementado por Hernández-López et al. (1996). Con ella se determinó la actividad PO a través de la medición espectrofotométrica del pigmento rojo DOPA cromo, el cual proviene de la oxidación del substrato enzimático L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Para esta técnica, la hemolinfa fue centrifugada por 10 minutos a 800 rcf y 4°C en la microcentrifugadora (Eppendorf 5415 R) para separar el plasma de los hemocitos. Se repartió 50  $\mu$ L de la solución sobrenadante con el contenido celular de hemocitos en una microplaca de 96 pocillos; de cada muestra se colocó tres réplicas. Para evaluar la actividad PO en la hemolinfa se realizaron dos mediciones: a) actividad base que consiste en la reacción normal

de la enzima proPPO inactiva cuando el camarón está vivo y b) la actividad estimulada que consiste en la reacción de la PPO activada luego de la cosecha por medio de la aplicación  $\beta$ -glucanos (laminarina). Esto se realizó con el fin de relacionar la actividad base y estimulada para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos usados. Para medir la actividad estimulada se le agregó 50  $\mu$ L de una solución estimulada compuesta de Cacodilato de Sodio 100 mM (pH 7), Cloruro de calcio 1M, agua destilada y laminarina (2mg). Para medir la actividad base (no estimulada) se colocó 50  $\mu$ L de Cacodilato de Sodio 10mM. Se incubó por 75 minutos a temperatura ambiente.

Concurrido el tiempo se colocó 50  $\mu$ L de solución L-Dopa (3mg L-Dopa + 1ml Cacodilato de sodio 10mM), para incubarse durante 10 minutos a temperatura ambiente y sin exposición de luz. Posteriormente, se determinó la absorbancia en lector de microplacas Varioskan Lux a 490 nm, evitando en todo momento la presencia de luz sobre la placa. Se realizó las lecturas a los 0, 5, 10 y 15 minutos tras la última incubación.

Los resultados presentados son las lecturas a los 15 minutos y se expresaron en unidades de D.O. Además, se presenta la relación entre la actividad base y estimulada como “tasa” con el objetivo de visualizar la diferencia de manera puntual.

## **2.5 Determinación de sulfitos en tejidos de camarón**

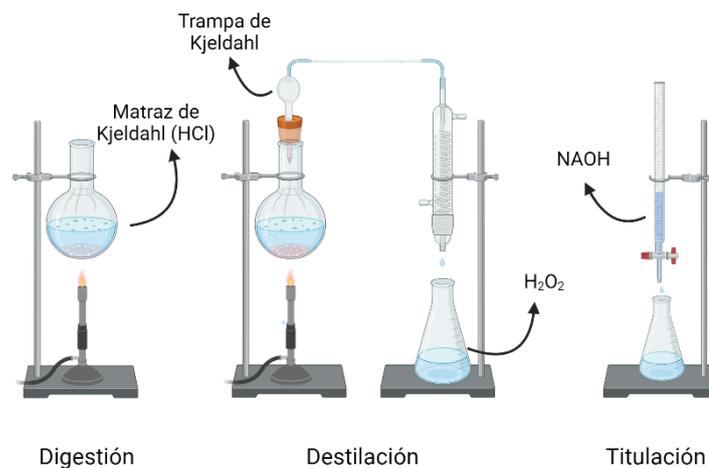
Los camarones tratados con MBS fueron analizados mediante técnica Kjeldahl para determinar la concentración de sulfitos residuales en sus tejidos. Esta técnica fue originalmente propuesta por Johann Kjeldahl en 1883 como técnica para determinar las concentraciones de nitrógeno orgánico y proteínas en materia orgánica. Sin embargo, se ha modificado dicha técnica en empacadoras ecuatorianas con el fin de controlar la cantidad residual de sulfitos en los tejidos de los camarones destinados al consumo humano tras el tratamiento de MBS aplicado en la cosecha.

El fundamento del método consiste en la digestión de materia orgánica que convierten los sulfitos en dióxido de azufre calentándolos con una solución de reflujo de ácido clorhídrico. Una corriente de nitrógeno transporta el gas  $\text{SO}_2$  a través de un condensador hasta el peróxido de hidrógeno, que oxida el  $\text{SO}_2$  a ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico se titula con hidróxido de sodio. El contenido de sulfito de la muestra es proporcional al ácido sulfúrico generado (Labomersa, 2022).

Los camarones fueron analizados en el laboratorio de calidad de una empresa empackadora comercial en Daule-Ecuador. Los resultados se presentan en ppm de sulfitos.

### Figura 8

#### *Procedimiento de prueba Kjeldahl*



### 2.6 Determinación de Melanosis

Después de la cosecha, se recolectaron 4 animales de cada replica por tratamiento para ser ubicados de manera ordenada en un recipiente, mismos que fueron llevados a refrigeración y congelación con la finalidad de observar el desarrollo de la melanosis y tomar evidencia fotográfica. Tras aproximadamente dos semanas en congelación ( $-20^\circ\text{C}$ ), estos camarones fueron sacados a la intemperie para evaluar la melanosis conforme se iban descongelando. Los refrigerados ( $5.5^\circ\text{C}$ ), se mantuvieron bajo estas condiciones por un

periodo de cinco días y se realizaron valoraciones cada 24 horas, las cuales consistieron en una revisión física junto con la toma de evidencias fotográficas.

Para las observaciones de inhibición de melanosis, se analizó únicamente los camarones que no fueron tratados con MBS. Aquellos en los que se usó MBS al 5% se descartaron debido a un excedente de sulfitos, por lo que al no presentar melanosis no fueron considerados como un punto de comparación confiable.

La determinación del grado de melanosis se realizó en base a una escala numérica de calificación empleada en estudios (Otwell et al., 1986) para evaluar la coloración del camarón la cual va de 0 a 10, como se especifica a continuación:

#### Grados de clasificación

- 0 melanosis ausente
- 2 melanosis suave en rostrum y urópodos
- 4 melanosis suave en rostrum, urópodos, cefalotórax y pereíopodos
- 6 melanosis moderada en rostrum, urópodos, cefalotórax, pereíopodos y pleópodos
- 8 melanosis severa en rostrum, urópodos, cefalotórax, pereíopodos y pleópodos
- 10 melanosis severa en el cefalotórax y abdomen

A partir de la calificación otorgada, se determina el nivel de aceptabilidad del producto junto a su clasificación. En la tabla a continuación se detalla la descripción de lo que implica cada calificación con respecto a la coloración del camarón.

**Tabla 2***Clasificación de Melanosis*

<b>Grado de Melanosis</b>	<b>Aceptabilidad del producto</b>	<b>Clasificación</b>
0	Aceptado	Leve
2		
4	Devaluado	Moderado
6		
8	No aceptable	Fuerte
10		

Fuente: Otwell et al., 1986

**2.7 Análisis microbiológico de intestino de camarón**

Los camarones cosechados que no recibieron tratamiento de MBS fueron los disectados para extraer sus intestinos. Debido a que el extracto se suministró mediante la dieta, se fijó como órgano target el intestino de los camarones junto al contenido del mismo. Tras macerar las muestras, se realizaron 6 diluciones seriadas: 1:10 (-1), 1:100 (-2), 1:1000 (-3), 1:10000 (-4), 1:100000 (-5) y 1:1000000 (-6). De la dilución -1 a -3 se sembró en cajas Petri con agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS), mientras que en agar Marino (AM) y agar Triptona-Soja (TSA) se sembró de -3 a -6. Cada siembra contó con dos réplicas. Se incubó a 30°C por aproximadamente 24 horas. Tras este periodo se realizó el conteo de colonias de manera manual; se consideró el crecimiento de vibrios y bacterias totales. Para los resultados se presenta el promedio de las UFC al Log10 por tratamiento.

**2.8 Prueba organoléptica**

Los camarones de cada tratamiento fueron cocinados en agua destilada hirviendo durante tres minutos. Estos fueron servidos en orden aleatorio, sin nombre y sin detallar lo realizado

durante el experimento con la finalidad de evitar sesgos en los comensales y así poder obtener una opinión imparcial. Los comensales fueron 15 personas pertenecientes al personal del CENAIM los cuales, tras la degustación y observación de los camarones, contestaron una encuesta en donde se calificó los siguientes criterios del 1 al 5 (1 más bajo; 5 más alto):

- Color
- Apariencia
- Sabor
- Textura

Una vez terminada la degustación y la calificación, se preguntó a los comensales si sintieron rastros de sabor a ajo o algo fuera de lo normal en la carne del camarón. Se pidió opiniones o apreciaciones tras explicar el experimento al que los camarones fueron sometidos. La información de las encuestas fue tabulada y los resultados se presentan como promedios por cada criterio.

## **2.9 Análisis**

### *Análisis estadístico*

Para realizar los análisis de los datos recopilados se empleó el software estadístico RStudio. Para las pruebas en las que no se obtuvo homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett, se realizó un análisis Kruskal Wallis. Se realizaron pruebas de normalidad seguido de un análisis de varianza ANOVA de una vía para las pruebas de fenoloxidasa y microbiología. Posteriormente se aplicó la prueba post hoc de Diferencia Significativa Honesta de Tukey, conocida como HSD por sus siglas en inglés.

### *Análisis de Costos*

Los costos de los extractos fueron calculados para determinar si el uso de estos representa una ventaja económica frente al MBS. Se calculó el costo fijo, el costo variable unitario y se fijó el precio de venta al público (PVP) de los extractos de ajo y de cáscara.

Los costos fueron calculados a partir de las concentraciones de los extractos incluidos en el alimento, la cantidad de alimento suministrado para 2500 libras de camarón (a 5% de biomasa) y el precio comercial del ajo.

En base a los datos de exportación de camarón proporcionados por la Cámara Nacional de la Acuicultura (CNA), se estimó el gasto nacional en MBS durante el periodo de enero a noviembre del 2023 junto al gasto hipotético de los extractos para la misma cantidad de libras exportadas. Esto se realizó con la finalidad de determinar el ahorro teórico que representaría el reemplazo del MBS por el extracto de ajo y de cáscara en la producción de camarón.

## **Capítulo 3**

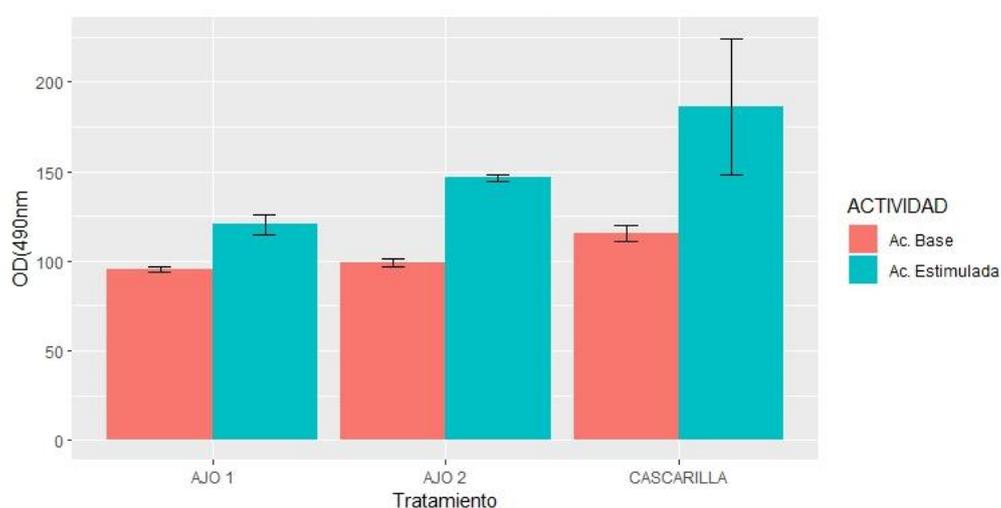
### 3. Resultados

#### 3.1 In Vitro

La prueba de actividad fenoloxidasas con los extractos diluidos a diferentes concentraciones demostró que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad base y la actividad estimulada de cada uno de los extractos. Este resultado probablemente indique que se ha producido una inhibición de la enzima con los extractos a determinada concentración (AJO 1: 0,036 ppm; AJO 2: 0,180 ppm; Cascarilla: 1,5 ppm).

#### Figura 9

*Lecturas OD de muestras: actividad estimulada (laminarina) y base (cacodilato) por extractos*



#### 3.2 Pruebas

##### *Crecimiento y supervivencia*

Mediante el análisis estadístico no paramétrico Kruskal- Wallis, se encontró la no existencia de diferencias significativas ( $p\text{-value} = 0.32$ ) en la supervivencia entre tratamientos durante los 10 días de cultivo.

**Tabla 3***Porcentajes de supervivencia*

<b>Tratamiento</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
AJO 1	86 <sup>a</sup>
AJO 2	92 <sup>a</sup>
C5	84 <sup>a</sup>
C10	92 <sup>a</sup>
CONTROL	93 <sup>a</sup>

En relación con el crecimiento durante el periodo de cultivo, se encontró que el tratamiento C5 fue significativamente menor ( $p > 0.05$ ) con respecto a los demás tratamientos con excepción del control.

**Tabla 4***Promedios de pesos iniciales, finales y peso ganado*

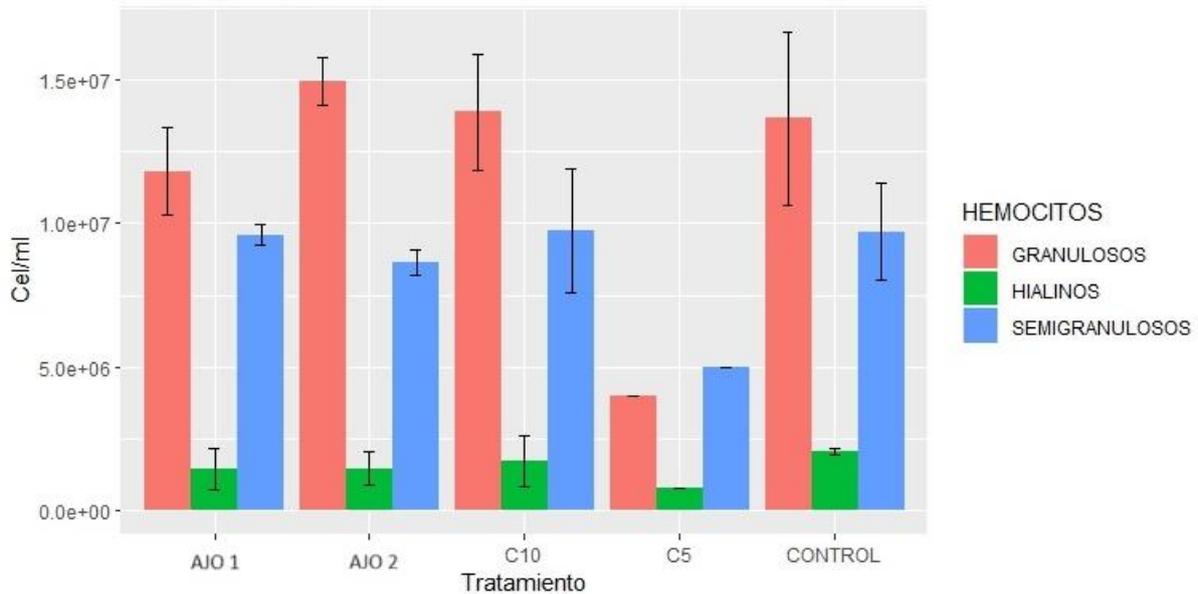
<b>Tratamiento</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>Peso Final (g)</b>	<b>Peso Ganado (g)</b>
AJO 1	11,14	14,33 <sup>b</sup>	3,19
AJO 2	11,15	14,47 <sup>b</sup>	3,32
C5	11,18	13 <sup>a</sup>	1,82
C10	11,17	14 <sup>ab</sup>	2,83
CONTROL	11,16	14,3 <sup>b</sup>	3,14

***Análisis de Hemograma***

Para el hemograma se realizó un conteo total y diferenciado de cada tipo de hemocito para cada tratamiento. Los resultados que se muestran en la Figura 10 son las células por cada ml de hemolinfa para cada tipo de hemocito.

**Figura 10**

*Hemocitos diferenciados (cel/ml<sup>3</sup>) por tratamiento*



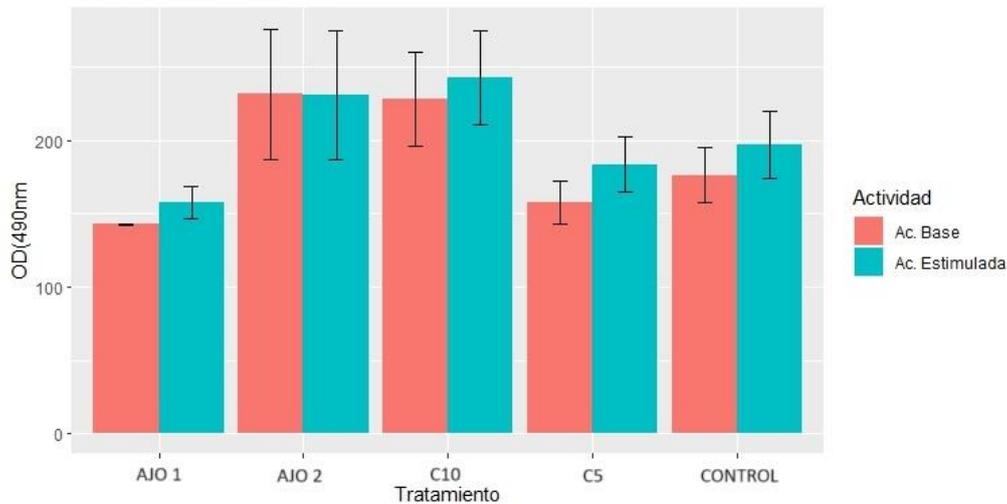
Pese a que no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos para los diferentes tipos de hemocitos, se puede destacar una disminución importante de los h. hialinos, una reducción de los hemocitos granulosos en favor de los semigranulosos del tratamiento C5.

#### ***Actividad Fenoloxidasa***

En la Figura 11 se muestra la actividad fenoloxidasa, evidenciando una disminución de la actividad base con respecto a la actividad estimulada con laminarina, lo cual es el resultado esperado con excepción del tratamiento AJO 2 en el cual no se evidenció cambio al agregar laminarina.

## Figura 11

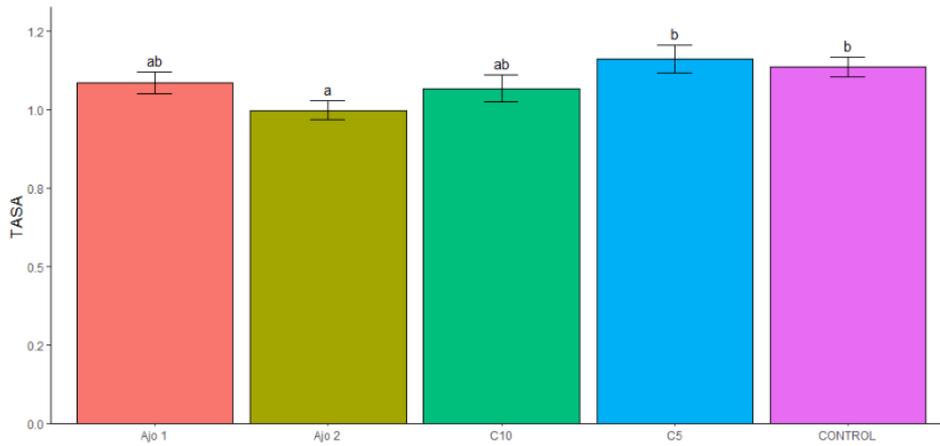
*Lecturas OD de muestras con actividad estimulada (laminarina) y no estimulada (cacodilato) por tratamiento*



La tasa entre actividad estimulada y la actividad base se presenta en la Figura 12. El análisis estadístico encontró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre AJO 2 y tratamiento control y C10, siendo el que menor actividad estimulada presente. El tratamiento C5 es el que mayor tasa posee, siendo el que más respondió a la suministración del extracto al bajar los niveles de actividad base; no obstante, no presenta diferencias significativas frente al control, al igual que C10 y AJO 1.

**Figura 12**

*Tasa de actividad fenoloxidasa por tratamiento*



### **3.3 Análisis de sulfitos en tejidos de camarón**

Esta prueba permitió conocer la concentración de residuales de sulfitos presentes en los tejidos de los camarones que fueron sometidos al tratamiento químico con MBS en la cosecha. Se registró concentraciones entre 102 hasta 161 ppm; el valor máximo permitido por la FDA es de 150 ppm. Los elevados niveles de sulfito encontrados en los tejidos de los camarones, probablemente se dieron por una exposición prolongada de los camarones en la solución de MBS, superior a los 2-3 minutos recomendados en el protocolo estándar con concentraciones de 10-15% de MBS.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos en ppm. Para el tratamiento de cáscara de ajo se unificó C5 y C10 como una sola muestra debido a la falta de camarones.

**Tabla 5.**

*Concentración de sulfitos residuales en camarones tratados con MBS*

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de sulfitos (ppm)</b>
AJO 1	140.8
AJO 2	161
CÁSCARA	132
CONTROL	102

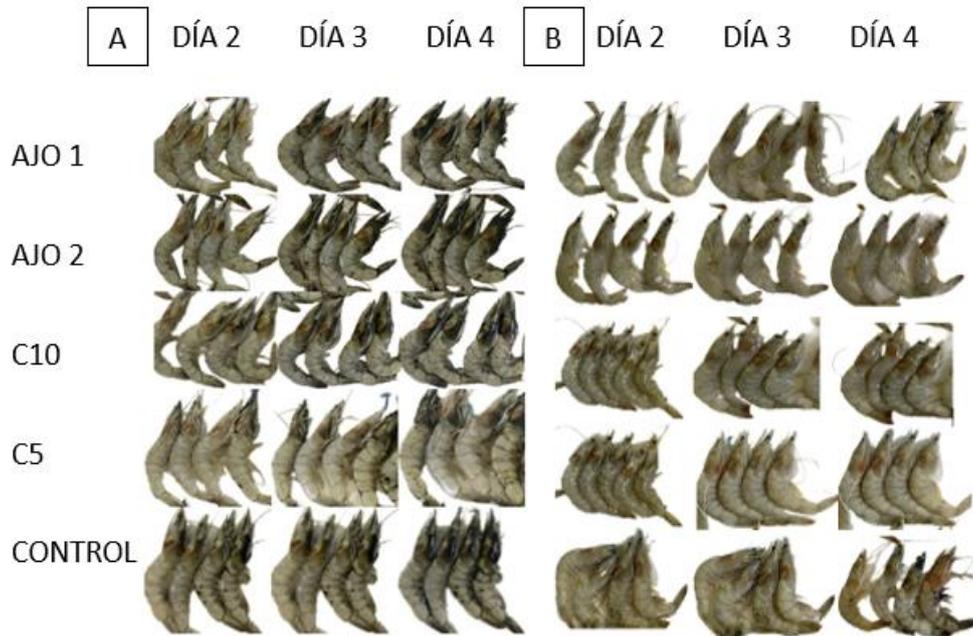
### **3.4 Análisis de Melanosis**

Desde la probable sobreexposición (tiempo) de los camarones en la solución de MBS, estos no mostraron signos de melanización dentro del periodo de evaluación post-cosecha. Según Carranza, (2002), en concentraciones de 100 a 150 ppm de sulfitos, los camarones se preservan hasta 12 horas. Sin embargo, en nuestro estudio, los camarones no presentaron melanización hasta el tercer día. Dado este inconveniente, solo se evaluaron los camarones que fueron sumergidos en agua con hielo sin MBS de la prueba *In vivo* de campo.

La melanosis se desarrolló en los camarones refrigerados y congelados. se mantuvieron en refrigeración y en congelación. Los camarones refrigerados se melanizarón más rápidamente que los camarones congelados, siendo esto lo esperado. Según estudios (Bodán Bustamante & Ojeda López, 2019), la melanosis se presenta en camarones refrigerados luego de las 36 horas post-cosecha. Sin embargo, en este proyecto tratamientos como el C5 desarrollaron una melanosis recién el tercer día, es decir cerca de las 72 horas después de la cosecha.

**Figura 13**

*Melanosis en cada tratamiento a partir del día 2 de refrigeración: (A) sin MBS, (B) con MBS*



**Tabla 6**

*Promedio de calificaciones de prueba de Melanosis en camarones refrigerados sin MBS*

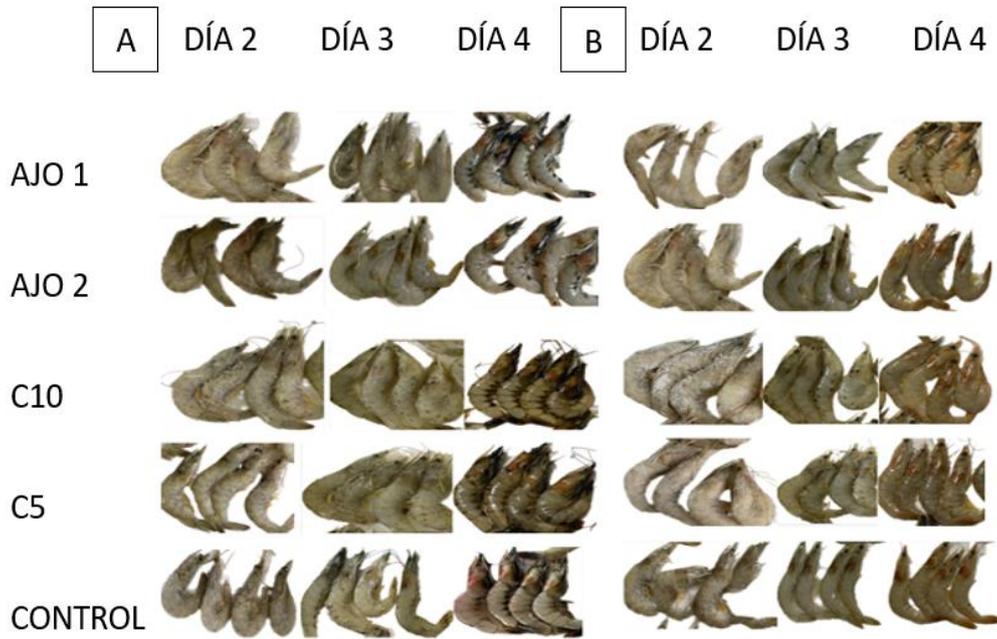
Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
AJO 1	0	0,8	2,5	4,0
AJO 2	0	1,3	3,2	4,3
C5	0	0,8	2,0	3,0
C10	0	1,2	3,3	4,2
CONTROL	0	2,1	3,4	4,8

Los camarones que fueron congelados por 15 días y luego se descongelaron se presentan en la figura 14. Cabe indicar que durante el periodo de congelación ninguno de los tratamientos mostró signos de melanosis. Una vez descongelados, se observó que los

tratamientos AJO 1 y C5 se mantuvieron prácticamente libre de melanosis hasta el tercer día con calificaciones menores a 1.5 (Tabla 7).

**Figura 14**

*Melanosis en cada tratamiento en camarones descongelados: (A) sin MBS, (B) con MBS*



**Tabla 7**

*Promedio de calificaciones de prueba de Melanosis en camarones congelados sin MBS*

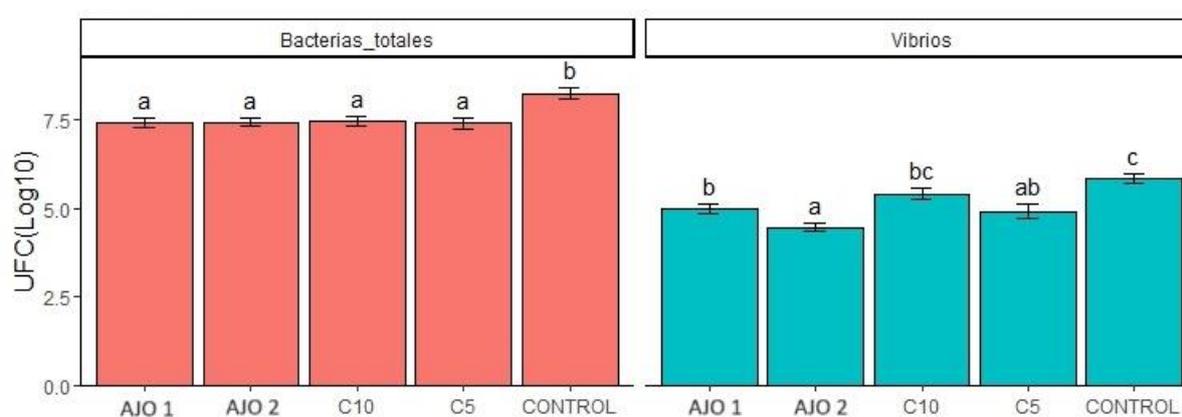
Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
AJO 1	0	0,67	0,83	1,33
AJO 2	0	0,83	1,33	3,33
C5	0	0,25	1,5	3,25
C10	0	0,17	2,17	4,67
CONTROL	0	2,17	3	4

### 3.5 Análisis microbiológico en intestinos

El cultivo de bacterias totales y bacterias del género *Vibrio* se presentan en la Figura 15. El análisis encontró una reducción estadísticamente significativa de todos los tratamientos con ajo ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control. De manera similar los tratamientos con ajo con excepción del tratamiento C10, también se encontró una relación significativa con el conteo de vibrios totales ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control. El tratamiento AJO 2, presento menor conteo de vibrios presente con respecto a los demás tratamientos de ajo, con excepción de C5.

**Figura 15**

*UFC (Log10) de bacterias totales y vibrios por tratamiento*



### 3.6 Análisis Organoléptico

En la Tabla 8 se presenta el promedio de la calificación otorgada por los comensales. Estos aseguraron además que no se percibía ningún rastro de sabor a ajo en los camarones.

Para esta prueba se unificaron los tratamientos C5 y C10 debido a la falta de camarones para la prueba. El tratamiento con cáscara logro el promedio más alto, seguido por AJO 1. Los resultados demuestran que la inclusión de extracto de ajo y de la cáscara de ajo aumenta la palatabilidad del camarón, mejorando las características gustativas evaluadas.

**Tabla 8***Promedio de calificaciones de prueba organoléptica*

<b>Tratamiento</b>	<b>AJO 1</b>	<b>AJO 2</b>	<b>TC (CÁSCARA)</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Color</b>	3,6	3,4	3,9	3
<b>Apariencia</b>	3,73	3,2	3,9	2,80
<b>Sabor</b>	4,07	3,67	4	2,87
<b>Textura</b>	3,73	3,6	4,1	2,87

Estos resultados revelan la factibilidad de suministrar microdosis de extracto de ajo o de cáscara de ajo como parte de la dieta de alimentación diaria con la finalidad de obtener menos melanización de los tejidos de manera significativa tras la cosecha mientras se potencia características como su palatabilidad o apariencia física.

### **3.7 Análisis de costos**

En la Tabla 9 se presentan los costos de producción del extracto de cáscara, considerando los materiales necesarios para su elaboración y considerando rubros tales como devaluación de la maquinaria requerida por el tiempo de uso requerido. Los datos presentados fueron calculados en base a lo usado en el estudio. Para la materia prima (ajo) se estimó un precio de \$5 (1000 g) en el supermercado Mi Comisariato. En la Tabla 9 se presentan de manera individual con las cantidades requeridas de cada implemento, dando como resultado que el producto tiene un costo de producción de \$15,75.

**Tabla 9***Desglose de costos para la preparación del extracto de cascarilla*

<b>Materiales</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario</b>	<b>Costo Total</b>
Ajo (50g)	1	\$0,25	\$0,25
Agua destilada (L)	1	\$1,19	\$1,19
Vasos de precipitación (500mL)	1	\$5,20	\$5,20
Filtros de 20 micras	1	\$3,91	\$3,91
Embudo (5cm)	1	\$3,70	\$3,70
Microondas (tiempo de uso)	5	\$0,15	\$0,75
Matraz de Erlenmeyer (500mL)	1	\$6,00	\$6,00
<b>TOTAL</b>			<b>\$15,75</b>

Se calculó además el precio de venta al público (PVP) a partir de la cantidad de ajo necesaria para la misma biomasa de camarón entero (2500 lb) que se trata con un saco de 25 kg de MBS (Tabla 10). Se considera no solo el gasto en materia prima, pero también la mano de obra. El desglose de los cálculos se toda esta sección se encuentra en Anexos.

Los resultados demuestran una reducción significante en los precios de los extractos frente al MBS, logrando un ahorro aproximado del 82% para el extracto de ajo y del 78% para el extracto de cáscara.

**Tabla 10***PVP de los extractos y del MBS*

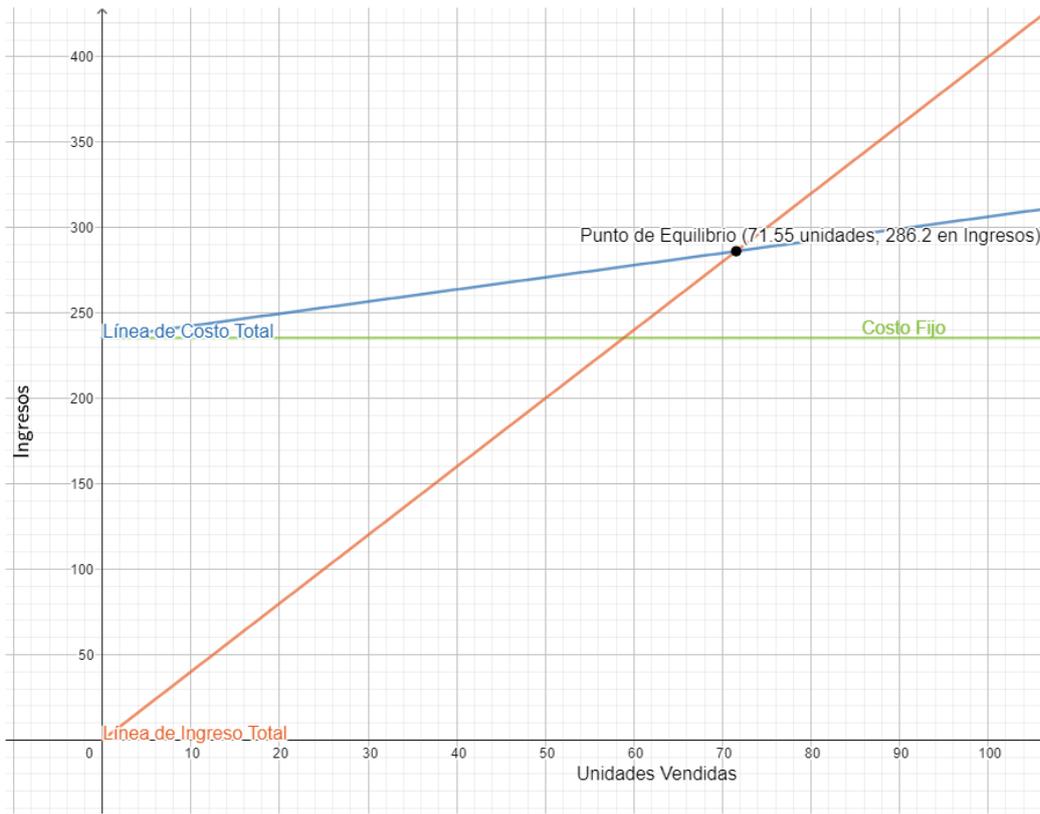
<b>Tratamiento</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Lb de camarón</b>	<b>PVP</b>
MBS	25 Kg		\$ 17,55
Extracto de ajo	0,32 L	2500	\$ 3,20
Extracto de cáscara	44 L		\$ 4,00

Con ello se realizó el cálculo del punto de equilibrio, con el cual se determina la cantidad de unidades que se necesitan vender para ver comenzar a obtener ganancias netas (Figura 16). Este cálculo se realizó para el extracto de cáscara, el cual el que mejores resultados presentó. Los resultados demuestran que es necesaria la venta de aproximadamente 72 L para comenzar a tener ganancias netas, demostrando la factibilidad de considerar la venta del extracto como negocio. El desglose de los cálculos para el punto de equilibrio se encuentra en la sección de anexos.

Es importante destacar que los datos presentados en esta sección son calculados en base a los requerimientos del proyecto, a menor escala. Sin embargo, al llevar la producción a escala mayor los costos de producción se disminuirán significativamente, además que podrían formar parte del sistema de economía circular de empresas que tiene como materia prima el diente de ajo con el desecho de las cáscaras de ajo la cual puede ser aprovechada con totalidad, pudiéndose obtener una ganancia neta mayor y de manera más rápida.

**Figura 16**

*Punto de equilibrio del extracto de cáscara*



Por consiguiente, el extracto de cáscara de ajo es económicamente asequible de reproducir y viable para ser implementado como aditivo en el alimento previo a la cosecha en reemplazo del MBS. Este hecho no solo implica un ahorro económico, pero también disminuye riesgos al ser eco-amigable y no implicar consecuencias para la salud humana.

## Capítulo 4

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

### **4.1 Conclusiones**

El presente estudio se llevó a cabo con el principal objetivo de evaluar la capacidad antioxidante del extracto de ajo, disminuyendo la generación basal de radicales de oxígeno con la finalidad de disminuir la melanización del tejido del camarón, pero sin comprometer su respuesta autoinmune.

La influencia de la administración del extracto de ajo mediante la dieta se evaluaron múltiples pruebas, entre ellas el hemograma. Del conteo diferenciado realizado se observó que los camarones del tratamiento C5 y AJO 2 disponían la mayor cantidad de h. granulares y una de las cantidades más bajas de h. hialinos, denotando un excelente estado de salud. La inmunidad de los camarones está especialmente mediada por los hemocitos debido a que son capaces de identificar cuerpos extraños (antígenos), con lo que activan respuestas de defensa como fagocitosis o encapsulación. En estudios de la respuesta inmunitaria del camarón (Montesdeoca et al., 2002) se sugieren relaciones directas entre la cantidad de cada tipo de hemocitos en la hemolinfa y el estado de salud del camarón. Así, una alta presencia de h. hialinos indicaría una infección o estado de salud bajo, los h. semigranulosos un estado regular y los h. granulosos un estado saludable.

No obstante, es de suma importancia mencionar que los estudios de estado de salud a través de la hemolinfa no suelen ofrecer resultados confiables. Morales & Cuéllar-Anjel (2014) explican que esto es debido a que la cantidad de hemocitos presente en los camarones está ligada a múltiples factores y es muy susceptible a cambios aun siendo de la misma población, sexo o estadio. Por esta razón, no existen valores de referencia definidos para sus parámetros hemato-inmunológicos, lo cual imposibilita el establecimiento de un patrón de normalidad en crustáceos que pueda ser empleado en estudios como hemogramas.

Dicha mejoría en el estado de salud también se puede atribuir a la capacidad inmunoestimulante y antibiótica que posee el ajo, hecho que se demuestra en la prueba de bacteriología al lograr una disminución significativa de bacterias totales y de vibrios. Estos resultados concuerdan con lo estipulado por otros autores (Agurto, 2011; Sharma & Patel, 2009; Vaseeharan et al., 2011), los cuales indican la efectividad del ajo para tratar problemas causados por vibriosis, incluyendo aquellos importantes dentro de la acuicultura como el *V. harveyi* o *V. parahaemolyticus*.

No obstante, la principal la prueba para determinar la influencia del ajo es la de la actividad fenoloxidasa. Esta sugiere que el extracto sí logra inhibir la enzima fenoloxidasa al bajar los niveles de la actividad base, en especial el tratamiento de cáscara de ajo (C5). Es importante recalcar que la enzima fenoloxidasa cumple un rol importante en el sistema inmunológico del camarón, razón por la cual no es aconsejable que los niveles de inhibición lleguen a 0. Según Bower et al. (1994), entre los mecanismos de defensa de los crustáceos se encuentra la melanización mediada por el sistema fenoloxidasa, el cual se activa ante la presencia de antígenos y resulta en una serie de reacciones enzimáticas que terminan en la producción de melanina. La melanina es un pigmento de coloración entre parda y negra, al que se le adjudican diversas propiedades biológicas como la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Fonseca et al., 2016).

Por consiguiente, el nivel de inhibición de la enzima fenoloxidasa lograda con el tratamiento de extracto de cáscara de ajo (C5) permite el correcto funcionamiento del sistema inmunológico de los camarones mientras que consigue disminuir significativamente el nivel de melanosis en los tejidos tras la cosecha de estos. Este hecho se corrobora una vez más con el hemograma al demostrar que los tratamientos de extractos mejoran el estado de salud de los camarones que recibieron el mismo tratamiento.

En la prueba de melanosis se expresó físicamente los resultados obtenidos de la prueba de actividad fenoloxidasa, misma que fue crucial para determinar el efecto físico que tiene la administración de los extractos. Esta demostró que los camarones tratados con extractos se mantenían dentro del rango aceptable de melanosis por más tiempo de lo estandarizado en otros estudios (Bodán Bustamante & Ojeda López, 2019). Estos resultados representan una ventaja importante debido a que sugieren que la administración de extracto de ajo otorga una mayor cantidad de horas de preservación sin necesidad de usar MBS para el transporte y comercialización del camarón, cerca de 36 horas más de lo estándar, mientras mantiene los niveles de melanización dentro de los niveles aceptables de calidad.

Además, entre los múltiples beneficios del ajo se suma, según los resultados de la prueba organoléptica, la mejora de características gustativas como el color, la textura, el olor y la apariencia sin comprometer su calidad o palatabilidad. Se demostró mediante testimonios que no hay rastro de sabor a ajo y, por contrario, aquellos camarones tratados con extracto fueron los más agradables tanto en presentación como en degustación. Esto puede constituir una ventaja en la recepción del camarón en empresas empacadoras al mejorar dichas características en las cuales se basa la calificación del camarón para determinar su precio y aceptación.

Si bien la administración del ajo no parece mejorar el cultivo en aspectos como ganancia de peso o supervivencia debido a que son factores que están ligados a múltiples afecciones externas, los extractos sí contribuyen y mejoran otros aspectos como se ha demostrado en el presente estudio.

Por consiguiente, el extracto de ajo sí es efectivo para disminuir la melanosis post-cosecha, en especial el extracto de cáscara de ajo al ser suministrados mediante la dieta 5 días previo a la cosecha, es decir, el tratamiento C5 (1.5 ppm). Este, como se ha demostrado, es el

tratamiento que mejor resultado presentó en la mayoría de las pruebas, logrando inhibir efectivamente la enzima fenoloxidasa, preservando mejor el camarón y consiguiendo evitar la aparición de melanosis en un grado no aceptable hasta aproximadamente 3 días después de la cosecha y otorgando a los camarones mejor receptibilidad por parte de los comensales mejorando su palatabilidad. Además, es el tratamiento que mejor estado de salud mostró según el hemograma y es uno de los que logró bajar más las UFC de vibrios y bacterias totales.

#### ***4.2 Recomendaciones***

- Se sugiere calcular la biomasa que será cosechada a partir de muestreos con la finalidad de determinar de manera exacta la cantidad necesaria de MBS para su respectivo tratamiento y evitar exceso de sulfitos residuales en los tejidos del camarón.

- Se recomienda realizar otro tipo de prueba de laboratorio que permita determinar residuales de sulfitos absorbidos por los tejidos del camarón, como la Monier-William o Biolands las cuales son pruebas certificadas y no adaptadas como la prueba Kjeldahl, con lo cual se obtendría resultados más confiables y exactos.

- Para las pruebas de bacteriología se sugiere realizar pruebas más específicas para comprobar minuciosamente el alcance inhibitor y antibiótico del extracto de ajo, tales como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) o antibiogramas.

- Se sugiere probar el extracto de ajo a distintas temperaturas con la finalidad de determinar la factibilidad de poder incorporarlo al peletizado durante su producción en planta sin perder la propiedades antioxidantes y bactericidas del ajo.

## Referencias

- Agurto, M. (2011). Selección y evaluación de concentraciones de extractos naturales con potencial actividad antibacterial antioxidante e inmunoestimulante sobre el camarón *litopenaeus vannamei* [Universidad Técnica de Machala].  
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1817>
- Agurto, M., Rodríguez, J., Domínguez, C., Tomalá, C., & Malavé, R. (2022). Immunomodulatory and anti-vibrio properties of plant extract to manage the health of the shrimp *Penaeus vannamei* | AquaTechnica, Revista Iberoamericana de Acuicultura. <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/aquatechnica/article/view/4776>
- Aragao, J., Castro, C., & Costa-Lotufo, L. (2008). Toxicidade do metabissulfito de sódio em *Mysidopsis juniae*. 41(1), 24-29.
- Bermúdez-Medranda, A. E., & Panta-Vélez, R. P. (2019). Efectos del 4-hexilresorcinol y metabisulfito de sodio sobre la melanosis en camarones frescos (*Penaeus vannamei*). Revista bio ciencias, 6. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e465>
- Bodán Bustamante, R. J., & Ojeda López, C. H. (2019). Evaluación del desarrollo de melanosis post mortem en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), en la empresa CAMANICA, GRUPO NUEVA PESCANOVA [Other, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua]. <https://repositorio.unan.edu.ni/13809/>
- Bower, S. M., McGladdery, S. E., & Price, I. M. (1994). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. 4, 1-199.
- Boyd, C. E., & Gautier, D. (2002, agosto 1). Sodium bisulfite treatments improve shrimp appearance but require proper disposal—Responsible Seafood Advocate. Global Seafood Alliance. <https://www.globalseafood.org/advocate/sodium-bisulfite-treatments-improve-shrimp-appearance-but-require-proper-disposal/>

- Cámara Nacional de Acuicultura. (2023). Estadísticas. <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Carranza, E. (2002). Análisis de residuos de sulfitos en camarón entero [Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/a0bf5102-0762-4df1-8f6b-9deaa705bc36/content>
- Cavallito, C. J., & Bailey, J. H. (1944). Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *Journal of the American Chemical Society*, 66(11), 1950-1951. <https://doi.org/10.1021/ja01239a048>
- Europa Azul. (2021). El ajo se erige como el mejor sustitutivo de los antibióticos en la acuicultura. Recuperado de <https://europa-azul.es/el-ajo-acuicultura/>
- Fonseca, E., González, R., & Rico, R. (2016). Sistema inmune de los camarones. *Revista AquaTIC*, 38, Article 38. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/99>
- García Gómez, L. J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2000). Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3), 219-229.
- Giulianini, P. G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S., & Ferrero, E. A. (2007). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron (Oxford, England: 1993)*, 38(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.019>
- Gokoglu, N., & Yerlikaya, P. (2008). Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(6), 1004-1008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01553.x>

- Gonçalves, A. A., & de Oliveira, A. R. M. (2016). Melanosis in crustaceans: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 791-799.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.011>
- Göpel, T., & Wirkner, C. (2020). The circulatory system of *Penaeus vannamei* Boone, 1931—Lacunar function and a reconsideration of the “open vs. Closed system” debate. *281(4-5)*, 500-512. <https://doi.org/10.1002/jmor.21117>
- INEOS Calabrian. (2015). Hoja de Datos de Seguridad: Metabisulfito de Sodio.  
[https://www.ineos.com/globalassets/ineos-group/businesses/ineos-enterprises/businesses/ineos-calabrian/resource-center/safety-data-sheets/meta\\_2016\\_sds\\_rev3\\_spanish.pdf](https://www.ineos.com/globalassets/ineos-group/businesses/ineos-enterprises/businesses/ineos-calabrian/resource-center/safety-data-sheets/meta_2016_sds_rev3_spanish.pdf)
- Jikah, A., & Edo, G. (2023). Mechanisms of action by sulphur compounds in *Allium sativum*. A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 9, 100323.  
<https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100323>
- Labomersa. (2022). Monier Williams – Método oficial para la determinación de metabisulfitos en camarón / AOAC 990.28.  
<https://labomersa.com/2022/10/26/monier-williams-metodo-oficial-para-la-determinacion-de-metabisulfitos-en-camaron-aoac-990-28/>
- Llerena, C. (2011). Evaluación del proceso de Absorción del sulfito de sodio en el músculo del camarón (*L. vannamei*) para el control de la melanosis [Escuela Superior Politécnica del Litoral].  
<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30220>
- Loubes, M., Vidales, S., & Almada, C. (2009). Evaluación sensorial de crustáceos tratados con inhibidores de la melanosis. *La Alimentación Cárnica*, 162, 38-43.
- Lucien-Brun, H. (2005). Prevenir la melanosis en camarones.  
<https://www.globalseafood.org/advocate/preventing-melanosis-in-shrimp/>

- Lucien-Brun, H. (2016). Decisiones críticas para la cosecha y empaque de camarón, Parte 2.  
<https://www.globalseafood.org/advocate/decisiones-criticas-para-la-cosecha-y-empaque-de-camaron-parte-2/>
- Melguizo-Rodríguez, L., García-Recio, E., Ruiz, C., Luna-Bertos, E. D., Illescas-Montes, R., & J. Costela-Ruiz, V. (2022). Biological properties and therapeutic applications of garlic and its components. *Food & Function*, 13(5), 2415-2426.  
<https://doi.org/10.1039/D1FO03180E>
- Montesdeoca, M., Amano, Y., Echeverría, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., & Rodríguez, J. (2002). La Respuesta Inmunitaria Celular del Camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su Sutilidad en el Control de la Enfermedad en los Estanques. 8(1). <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8742/1/10.pdf>
- Morales, V., & Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA.  
[https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf\\_revistas/Guia\\_Tecnica\\_Patologia\\_Inmunologia\\_de\\_Camarones\\_Penaeidos.pdf](https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia_Tecnica_Patologia_Inmunologia_de_Camarones_Penaeidos.pdf)
- Moutia, M., Habti, N., & Badou, A. (2018). In Vitro and In Vivo Immunomodulator Activities of *Allium sativum* L. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 2018, 4984659. <https://doi.org/10.1155/2018/4984659>
- Noda, Y., Asada, C., Sasaki, C., & Nakamura, Y. (2019). Effects of Hydrothermal Methods such as Steam Explosion and Microwave Irradiation on Extraction of Water Soluble Antioxidant Materials from Garlic Husk. *Waste and Biomass Valorization*, 10(11), 3397-3402. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0353-3>
- Otwell, W. S., Marshall, M., & Martin, R. E. (1986). Studies on the use of sulfites to control shrimp melanosis (Blackspot) (Presented at the 11th Annual Meeting of the Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas, January 14,

- 1986, Tampa, Florida) (Número 46). University of Florida, Department of Food Science and Nutrition. <http://hdl.handle.net/1834/18017>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*, 26(11), 896-903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Portillo, E., Ruiz de la Rosa, M., Louzara, G., Ruiz, J. M., Marín-Guirao, L., Quesada, J., González, J. C., Roque, F., González, N., & Mendoza, H. (2014). Assessment of the abiotic and biotic effects of sodium metabisulphite pulses discharged from desalination plant chemical treatments on seagrass (*Cymodocea nodosa*) habitats in the Canary Islands. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1), 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.048>
- Ragan, D. L. (2011). ¿Por qué los sulfitos se deben mencionar en las etiquetas? North Caroline Department Agriculture and Consumer Services. <http://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/documents>
- Rendón, L., & Balcázar, J. L. (2016). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, 19, Article 19. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/256>
- Rodríguez, H. (2017, marzo 13). Las aguas residuales y sus efectos contaminantes [Text]. iAgua; iAgua. <https://www.iagua.es/blogs/hector-rodriguez-pimentel/aguas-residuales-y-efectos-contaminantes>
- Sharma, A., & Patel, V. (2009). In Vitro Screening of the Antibacterial Activity and Identification of Bioactive Compounds From Plants against Selected *Vibrio* spp. Pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 33(2), 137-144. <https://doi.org/10.3906/biy-0805-26>

Supelco. (2023). Hoja de Datos de Seguridad: Metabisulfito de Sodio.

[https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de\\_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-106528&DocumentType=MSD&DocumentId=106528\\_SDS\\_ES\\_ES.PDF&DocumentUID=365159&Language=ES&Country=ES&Origin=null&Display=inline](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-106528&DocumentType=MSD&DocumentId=106528_SDS_ES_ES.PDF&DocumentUID=365159&Language=ES&Country=ES&Origin=null&Display=inline)

Untari, I. (2010). El ajo como medicina más eficaz para la salud. *Gaster*, 7(1), Article 1.

<https://doi.org/10.30787/gaster.v7i1.59>

Valenzuela, J. (2013). Efecto de la modulación inmunológica en la supervivencia del cultivo de camarón *Litopenaeus Vannamei* [Universidad de Guayaquil].

<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/796>

Vaseeharan, B., Prasad, G. S., Ramasamy, P., & Brennan, G. (2011). Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrioharveyi* isolated from black gill-diseased *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture International*, 19(3), 531-539.

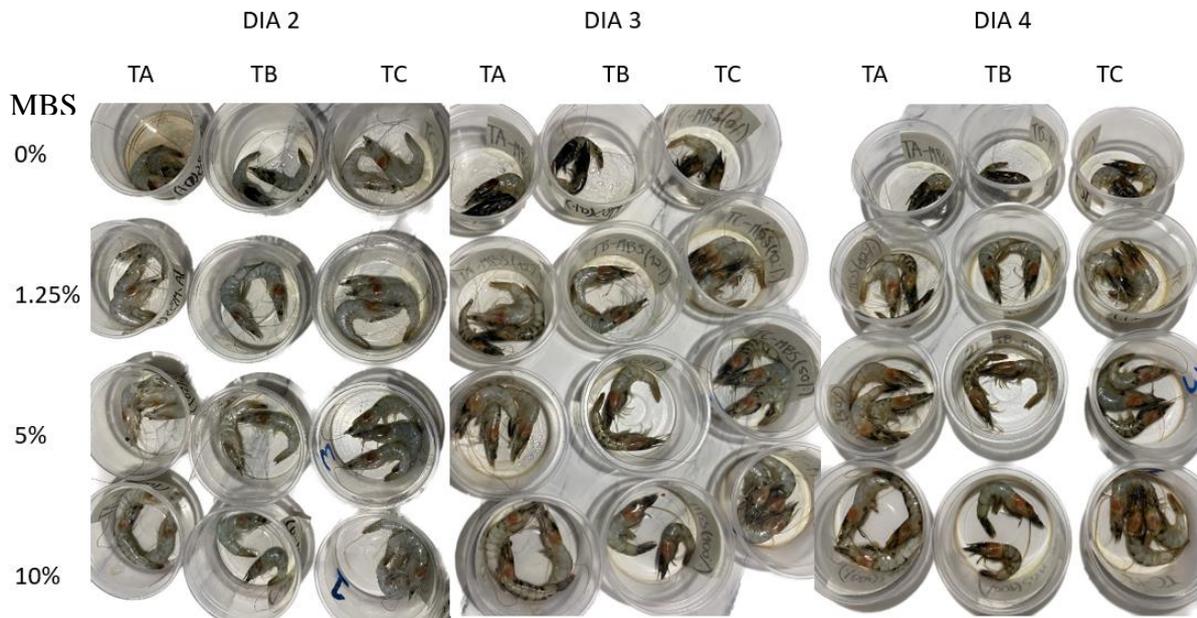
<https://doi.org/10.1007/s10499-010-9369-9>

Wang, Y.-C., Chang, P.-S., & Chen, H.-Y. (2006). Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(3), 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.003>

## Anexos

### Anexo 1.

*Prueba preliminar: prueba de melanosis*



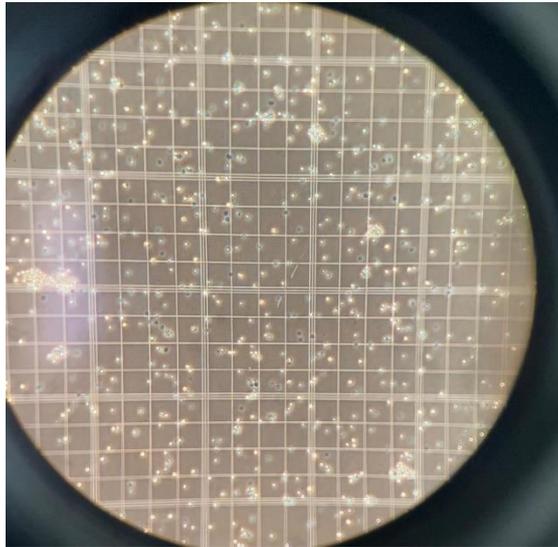
### Anexo 2.

*Diseño Experimental*



**Anexo 3.**

*Hemograma*



**Anexo 4.**

*Prueba Kjeldahl*



**Anexo 5.**

*Prueba microbiológica*



**Anexo 6.**

*Prueba Organoléptica*



## **Anexo 7.**

*Cálculo de costo variable unitario(CVu) para la materia prima de extracto de cáscara de ajo*

### a. Preparación Extracto cáscara de ajo

0,5 g (cáscara ajo) → 20 mL (agua destilada)

Es igual que decir:

1,25 g (cáscara ajo) → 50 mL (agua destilada)

Por lo tanto, 1,25 g en 1000 mL

### b. Dosis de solución con extracto en el alimento

A partir del alimento en kg suministrado se hace una relación con la solución de extracto:

0,4 mL solución → 1g de alimento

0,4 mL solución tiene 0,0005 g (cáscara de ajo)

Entonces:

0,0005 g (cáscara de ajo) → 1 g de alimento

### c. Dosis de cáscara de ajo para 2500 lb de camarón

2500 libras ≡ 1136 kg camarón

Alimentando al 5% de biomasa =  $1136 \times 0.05 = 56.8$  kg de alimento

56.8 kg de alimento x 5 días= 284 kg de alimento

Por 1 g de alimento → 0,0005 g (cáscara de ajo)

284,000 g de alimento → 142 g (cáscara de ajo)

### d. Costo

De acuerdo con el precio de 1000 g de ajo se estima que:

$$1000 \text{ g (ajo)} \approx \$5$$

$$142(\text{ajo}) = \$0,71$$

### **Anexo 8.**

*Cálculo de costo variable unitario (CVu) para la materia prima de extracto de ajo*

a. Preparación Extracto de ajo

$$10 \text{ g (ajo)} \rightarrow 20 \text{ mL (agua destilada)}$$

Es igual que decir que:

$$0,6 \text{ g en } 1000 \text{ mL}$$

b. Dosis de solución con extracto en el alimento

A partir del alimento en kg suministrado se hace una relación con la solución de extracto:

$$0,5 \text{ mL solución} \rightarrow 1 \text{ g de alimento}$$

$$0,5 \text{ mL solución tiene } 0,0003 \text{ g (ajo)}$$

Entonces:

$$0,0003 \text{ g (ajo)} \rightarrow 1 \text{ g de alimento}$$

c. Dosis de ajo para 2500 lb de camarón

$$2500 \text{ libras} \equiv 1136 \text{ kg camarón}$$

$$\text{Alimentando al } 5\% \text{ de biomasa} = 1136 \times 0.05 = 56.8 \text{ kg de alimento}$$

$$56.8 \text{ kg de alimento} \times 10 \text{ días} = 568 \text{ kg de alimento}$$

Por 1 g de alimento  $\rightarrow$  0,0003 g (ajo)

568,000 g de alimento  $\rightarrow$  170,4 g (ajo)

d. Costo

De acuerdo con el precio de 1000 g de ajo se estima que:

1000 g (ajo)  $\approx$  \$5

170,4 g (ajo) = \$0,43

**Anexo 9.**

*Cálculo del punto de equilibrio para el extracto de cáscara C5*

Para obtener el Costo Fijo (CF) de la producción del extracto se consideró únicamente los materiales que no representan un activo, como el ajo, el agua destilada y filtros, Los cuales se valoran en \$5,35 por cada litro producido de solución stock. Dado que se ofrece el producto para una biomasa de 2500 Lb, se consideran los 44 L necesarios para la misma.

$$CF = \$5,35/L \times 44L = \$235.4$$

$$CV_u = \$0,71$$

$$PVP = \$4$$

$$\text{Punto de equilibrio (PEQ)} = CF / (PVP - CV_u)$$

$$PEQ = 235.4 / (4 - 0.71)$$

$$PEQ = 235.4 / 3.29 = 71.55$$