

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN CON LÍPIDOS DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES DEL
CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN Y SU EVALUACIÓN COMO INGREDIENTE
DE DIETAS EN LARVICULTIVO DE *Litopenaeus vannamei***

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

LUNA RODRÍGUEZ ALEJANDRA

México, D.F.

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente	MA. DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA
Vocal	AMANDA GÁLVEZ MARISCAL
Secretario	FELIPE DE JESÚS RODRÍGUEZ PALACIOS
Primer suplente	ARTURO NAVARRO OCAÑA
Segundo suplente	JORGE ALEJANDRO FLORES MALDONADO

Lugar donde se realizó el proyecto:

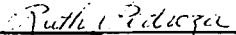
1. Laboratorio E-301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQA y QA) de la Facultad de Química de la UNAM.
2. Departamento de Ingenierías, Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Iberoamericana.
3. Laboratorio de Larvicultura de la Universidad del Mar (Puerto Ángel, Oaxaca).

Asesor



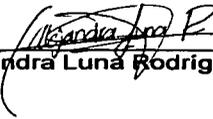
Dra-Ing. María del Carmen Durán Domínguez

Supervisor Técnico



Dra. Ruth Pedroza Islas

Sustentante



Alejandra Luna Rodríguez

Este trabajo se desarrolló con el apoyo de las siguientes instituciones:

El CONACYT a través del proyecto clave 38193-B.

La Universidad Nacional Autónoma de México, por la Facultad de Química a través de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental y del Departamento de Ingeniería Química Metalúrgica.

La Universidad Iberoamericana, por el Departamento de Ingenierías.

La Universidad del Mar, por el Instituto de Industrias área de Acuicultura.

Industrias PECIS S.A. de C.V. en Sisal, Yucatán.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al I.Q Iván Puente Lee y a la M.C Guillermina González Mancera por su apoyo para la microscopía electrónica de barrido.

A la M.C. Margarita Portilla Bauza por su apoyo en las determinaciones de calorimetría diferencial de barrido y su apoyo en la revisiones posteriores.

Al M.C. Carlos Medina Reyna y al Ing. Pablo Jacinto Nolasco por la conducción de los bioensayos.

A todo el personal que labora en el Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, en especial a la señora Irene, Lorena y Landy que siempre me auxiliaron cuando lo necesite.

DEDICATORIA

Gracias a mis padres por su apoyo, comprensión y por compartir conmigo todo este tiempo, pues sin ellos, no hubiera llegado hasta donde estoy.

A todos los que siempre han confiado en mí, me han dado ánimo y ayuda para seguir adelante; en especial a mis tíos Jaime, Juana, Guadalupe, Oscar, Arturo, Blanca, mis abuelas y mis primos.

A Ruth P. por su valiosa ayuda, por brindarme su amistad y por sus consejos cuando los necesitaba.

A todos mis amigos y compañeros que en algún momento de mi vida formaron parte de mis alegrías, tristezas e incluso enfados y que me enseñaron a valorar la amistad: Nancy, Dulce, Gerandine, Estrella, Alejandra, Francisco, Saúl, Alfredo, Violeta, Marisol, Susana, Janet, Gibran, Gustavo, Miguel, Guillermo, Barbara, Lorena, Luis, Enrique, Jorge M., Luis P., Noriko, Joanna, Daniela, Noemí, Fernanda, Celina, Karina, Gabriela, Paulina, Jorge C., José Luis, Ernesto, Gregorio, Toño, Pável y Liztli. Gracias por su cariño.

A mi asesora la Dra. Carmen Durán por su comprensión, paciencia y por darme la oportunidad de realizar este trabajo que tantas experiencias agradables me dejó.

A la UNAM, en especial a la Facultad de Química que fue mi casa durante los últimos años y a los maestros que dejaron en mí una grata experiencia y a todos aquellos que olvidé mencionar pero que estuvieron a mi lado en circunstancias importantes.

"Cada camino es uno entre un millón. Por ende, no hay que olvidar que un camino no es más que eso. Si piensas que no debes seguirlo, no te quedes en él bajo ninguna circunstancia. Un camino no es más que un camino. Que lo abandones cuando tu corazón así te lo indique no significa ningún desaire a ti mismo ni a los demás. Pero tu decisión de seguir esa senda o apartarte de ella no deber ser producto del temor ni de la ambición. Te advierto: examina cada camino atentamente. Pruébalo tantas veces como te parezca necesario. Luego hazte esta pregunta: ¿Tiene corazón este camino? Todos los caminos son iguales, no llevan a ningún lado. Atraviesan la maleza, se internan o van por debajo de ella. Si ese camino tiene corazón, entonces es bueno. De lo contrario, no te servirá de nada."

Carlos Castaneda en "Las enseñanzas de Don Juan"

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
2. Antecedentes	4
2.1 Producción de camarón en México	4
2.2 Subproductos del procesamiento del camarón	5
2.3 El camarón y su desarrollo	7
2.4 Alimentación para larvicultura	11
2.5 Pigmentos carotenoides	13
2.5.1 Fuentes de obtención	15
2.5.2 Astaxantina	16
2.5.3 Usos de la astaxantina	17
2.6 Extracción de pigmentos	18
2.7 Reacciones de oxidación de los carotenoides	20
2.7.1 Estabilización	21
2.7.2 Microencapsulación	21
2.7.3 Materiales encapsulantes	23
3. Materiales y métodos	25
3.1 Diagrama general	25
3.2 Desarrollo de la metodología	27
3.2.1 Obtención de la muestra	27
3.2.2 Lavado	27
3.2.3 Secado	27
3.2.4 Molienda y Conservación	27
3.2.5 Tamizado	28
3.2.6 Desmineralización	28
3.2.7 Extracción de pigmentos carotenoides a partir de la harina de cefalotórax de camarón	28
3.2.8 Elaboración de microdietas (microencapsulación del extracto oleoso)	30
3.2.9 Evaluación de la morfología y estructura interna de las dietas microencapsuladas	32
3.2.10 Determinación de la estabilidad oxidativa de las dietas microencapsuladas	33
3.2.11 Análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas	35
3.2.12 Extracción de pigmentos carotenoides a partir de las dietas microencapsuladas empleando el sistema éter de petróleo, acetona y agua	35
3.2.13 Identificación y cuantificación de pigmentos en las microdietas	36
3.2.14 Bioensayo con larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	37

4.	Resultados y discusión	40
	4.1 Extracción de pigmentos carotenoides	40
	4.2 Evaluación de la morfología y la estructura interna de las dietas microencapsuladas	44
	4.3 Determinación de la estabilidad oxidativa de las dietas microencapsuladas	53
	4.4 Análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas	56
	4.5 Extracción de pigmentos carotenoides a partir de las dietas microencapsuladas empleando el sistema éter de petróleo, acetona y agua	57
	4.6 Evaluación biológica con larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	58
5.	Conclusiones y recomendaciones	65
	Bibliografía	67

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 2-1	Composición del camarón, 100 g de porción comestible y del cefalotórax (% base seca)	6
Tabla 3-1	Equipos empleados	26
Tabla 3-2	Reactivos empleados	26
Tabla 3-3	Ingredientes de la dieta (1) para larvas de camarón	30
Tabla 3-4	Ingredientes de la dieta (2) para larvas de camarón	32
Tabla 4-1	Pigmentos carotenoides extraídos a partir de harina de cefalotórax de camarón con un tamaño de partícula menor a 0.150mm (μg de astaxantina/ g de aceite pigmentado)	40
Tabla 4-2	Pigmentos carotenoides extraídos a partir de harina de cefalotórax de camarón con un tamaño de partícula entre 0.150 y 0.177mm (μg de astaxantina/ g de aceite pigmentado)	40
Tabla 4-3	Análisis de varianza (Andeva) de la extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya	41
Tabla 4-4	Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de DSC para las microcápsulas de las dietas 1 y 2	56
Tabla 4-5	Composición proximal y contenido energético de las dietas 1, 2 y de las dietas testigo (sin pigmento)	57
Tabla 4-6	Identificación de pigmentos carotenoides por medio de cromatografía en capa fina	57
Tabla 4-7	Cuantificación de astaxantina en las dietas 1 y 2 por medio de espectrofotometría (μg de astaxantina /g de dieta)	58
Tabla 4-8	Resultados de la evaluación biológica alimentando con la dieta 1	59
Tabla 4-9	Resultados de la evaluación biológica alimentando con la dieta 2	61

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2-1	El camarón	8
Figura 2-2	Estructura química del β -caroteno	14
Figura 2-3	Estructura química de la astaxantina	14
Figura 3-1	Metodología experimental	25
Figura 4-1 (a)-(d)	Microestructura externa de la dieta 1	45
Figura 4-2 (a)-(c)	Microestructura interna de la dieta 1	47
Figura 4-3 (a)-(c)	Microestructura externa de la dieta 2	50
Figura 4-4 (a)-(c)	Microestructura interna de la dieta 2	51
Figura 4-5	Curva de flujo de calor para microcápsulas elaboradas con goma de mezquite:suero de leche (dieta 1)	54
Figura 4-6	Curva de flujo de calor para microcápsulas elaboradas con goma arábica:goma de mezquite:maltodextrina (dieta 2)	55

GLOSARIO DE TÉRMINOS

A	Absorbancia a 480 nm
A	Valor del estadio larval por el número de larvas de camarón en ese estadio
BSE	Microscopía de electrones retrodispersos (<i>back scattering electron</i>)
CAMARONICULTURA	Cultivo de camarón en granjas
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (<i>differential scanning calorimetry</i>)
D	Volumen total de aceite recuperado (mL)
d	Ancho de la celda (1 cm)
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DDM	Dosis diaria de microalgas
DE	Equivalente de dextrosa
DUIM	Dosis única inicial de microalgas
E_a	Energía de activación
$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	Coefficiente de extinción para el aceite de soya (2155)
ESTOMODEO	Intestino anterior del sistema digestivo del camarón
FOTOTACTICIDAD	Sensibilidad a la luz (atracción)
G	Masa de harina de cefalotórax de camarón (g)
ID	Índice de desarrollo larval de camarón
K	Constante de velocidad de reacción
K_o	Factor preexponencial de Arrhenius
LARVATRÓN	Sistema de cultivo para larvas de camarón
LARVICULTURA	Cultivo de larvas de camarón
LC	Longitud media del caparazón de larvas de camarón
MACRURO	Crustáceo de abdomen largo y extendido a modo de cola
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MR	Tasa metamórfica (por sus siglas en inglés, metamorphic rate)
MEENTERON	Intestino medio del sistema digestivo del camarón
MYSIS	Tercer estadio larvario del camarón
NAUPLIO	Primer estadio larvario del camarón
n	Orden de la reacción
PARS CARDIACA	Parte estomacal anterior donde se acumulan los alimentos digeridos
PARS PILORICA	Parte estomacal posterior que posee piezas calcáreas, sedas, espinas y filtros por las cuales van a pasar los alimentos en el curso de sus sucesivas transformaciones
PLI _o	Índice de desempeño larvario (por sus siglas en inglés, Performance Larval Index)
POSTLARVA	Cuarto estadio larvario del camarón (desarrollo y engorda)
PROCTODEO	Intestino posterior del sistema digestivo del camarón
PROTOZOA	Segundo estadio larvario del camarón (fase críticas del ciclo)

	de crecimiento)
PSI	Peso seco individual de larvas de camarón
R	Constante general de los gases ($8.31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
S	Sobrevivencia de larvas de camarón
S	Densidad del aceite de soya (g mL^{-1})
T	Temperatura (K)
$T_{1/2}$	Tiempo de vida media
UE	Unidades experimentales
LETRA GRIEGA (α)	Factor de conversión de la reacción



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En México, el camarón es uno de los principales productos pesqueros comercializados en la actualidad, ya que representa un 20% del valor total de los productos pesqueros en el comercio internacional. En México, en el año 2000, la producción de camarón fue de 95,100 toneladas y aunque la mayor parte se refiere a captura en alta mar y esteros, casi un 35% provino de la camaronicultura, colocando a México entre los 15 primeros productores de camarón de granja a nivel mundial (SEMARNAP, 2000).

Como producto, sólo el 50% del camarón es comestible y el 50% restante, constituido por el cefalotórax, genera desperdicios que representan un problema ecológico grave pues éstos contaminan tanto la tierra en granjas camaronícolas como diversas zonas de alta mar donde causan problemas al incrementar la materia orgánica en suspensión, limitando la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Se estima que este desperdicio alcanzaría un volumen mayor a 47,500 ton/año de no ser porque hoy en día, este subproducto es aprovechable por su riqueza en lo que respecta a componentes como proteínas, quitina, antioxidantes y pigmentos. En específico, para estos últimos cabe mencionar que la astaxantina es uno de los pigmentos carotenoides que se pueden obtener a partir del cefalotórax de camarón (Desrosier, 1986; Subasinghe, 1999; No y Meyers, 1992).

El presente trabajo forma parte de un proyecto global para el manejo de los subproductos de la industria alimentaria con el fin de aumentar su utilización y reducir la generación de desechos contaminantes. En esta investigación se presenta una nueva forma de emplear los pigmentos carotenoides (astaxantina), obtenidos del cefalotórax de camarón mediante la extracción con aceite de soya, como parte de la formulación de dietas microencapsuladas



para larvas de camarón blanco ya que este medio de extracción permite que el pigmento pueda ser utilizado en organismos vivos sin riesgo de envenenamiento causado por la toxicidad que generarían otro tipo de disolventes.

Recapitulando las investigaciones de Chen y Meyers (1982a) y los recientes trabajos de Jiménez y col. (2002), donde se determinó que se puede obtener un extracto oleoso con una mayor concentración de pigmento que la alcanzada con otros métodos de extracción, manejando variables como el tamaño de partícula y la proporción harina:aceite de soya, en el presente trabajo se evaluaron dos condiciones de extracción del pigmento y dos tamaños de partícula para las harinas de cefalotórax con objeto de obtener la mayor cantidad de pigmento en una mínima porción de aceite de soya. Lo anterior considerando que el producto sería usado como ingrediente de dietas para larvas de camarón.

Las dietas donde se incluyó el extracto oleoso de pigmento como ingrediente son dietas experimentales artificiales que han sido estudiadas respecto a su biodisponibilidad y aporte nutrimental para ser empleadas en la larvicultura. Para proteger al pigmento del deterioro oxidativo, se utilizó una técnica de microencapsulación por secado por aspersion, incluyendo a los ingredientes de la dieta a fin de tener partículas alimentarias de tamaño adecuado y con todos los nutrientes.

Se determinó la estabilidad oxidativa de las dietas microencapsuladas y la cantidad de pigmento presente en las mismas para, posteriormente, evaluar por un bioensayo preliminar *in vivo* el efecto de los pigmentos carotenoides y la influencia de la co-alimentación con alimento vivo (microalgas de *Chaetoceros muelleri*) en el índice de desarrollo larvario.



Consecuentemente, los objetivos de esta investigación se presentan a continuación.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Obtener carotenoides a partir del cefalotórax de camarón empleando un proceso de extracción con aceite de soya, estabilizar los pigmentos extraídos y determinar el efecto de dichos pigmentos en la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Confirmar que al variar las condiciones de tamaño de partícula y relación harina de cefalotórax de camarón:aceite de soya, durante un proceso de extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya, es posible obtener la máxima cantidad de pigmento disuelto en aceite.

- ✓ Estabilizar el pigmento inmerso en aceite aplicando el secado por aspersion como técnica de microencapsulación.

- ✓ Evaluar de manera preliminar el pigmento extraído con aceite de soya como ingrediente de dietas en el larvicultivo de *Litopenaeus vannamei*.



CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. PRODUCCIÓN DE CAMARÓN EN MÉXICO

El camarón es un recurso marino valioso para un país como México que posee un amplio litoral en la zona que comprende el Océano Pacífico, el Golfo de México, el Golfo de California y el Mar Caribe, pues representa altos ingresos económicos al mercado nacional, no tanto por su volumen de producción con respecto a todas las demás especies sino porque la mayor parte se destina a exportación, lo que representa una entrada importante de divisas para el país (un 20 por ciento del valor total de los productos pesqueros en el comercio internacional). En el año 2000, las exportaciones mexicanas sumaron 35 mil toneladas, registrando una disminución del 10% con relación a las exportaciones de 1999. Esto se debió principalmente a factores como la producción y los movimientos de precios, tanto en el mercado de EEUA, como en el nacional.

El crecimiento promedio anual de la producción de camarón en el periodo 1990-2000 fue de 5.2%, al pasar de 60.3 miles de toneladas en 1990 a 95.1 miles de toneladas en el año 2000. Aunque la mayor parte de la captura total se realiza en alta mar y esteros, la acuicultura se incrementó cinco puntos porcentuales en el año 2000 con respecto a 1999, lo que refleja un gran dinamismo en el desarrollo de la actividad acuícola (SEMARNAP, 2000).

En cuanto a la producción nacional de camarón en el año 2000, el estado que registró una mayor participación fue Sonora (46%), seguido de Sinaloa (37%) y Tamaulipas (12.6%). Estos estados integran en conjunto el 76% de la producción total, destacando Sinaloa como el estado líder en cultivo de camarón. De la producción total de camarón en el país durante



el año 2000, casi un 35% provino de la camaronicultura, colocando a México entre los 15 primeros productores de camarón de granja a nivel mundial. El camarón cultivado en granja (también llamado "de camaronicultura") crece en un ambiente controlado por el hombre lo cual garantiza un producto muy uniforme y de alta calidad. En 1980, el 98% de la oferta mundial de camarón fue de origen silvestre y el 2% fue cultivado en granjas. Con el vertiginoso desarrollo de la acuicultura, en 1998, el 25% de la producción mundial provino de granjas. Para el año 2000, el 50% de los camarones que los Estados Unidos de América importaron fueron cultivados en granjas. Indudablemente, sin el camarón de granja, la oferta y la demanda de este crustáceo sería insuficiente (SEMARNAP, 2000).

Las principales especies de camarón que se cultivan en México son *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul) y *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco), ya que son especies que se encuentran en aguas protegidas y de ahí la necesidad de cultivarlos (Sales, 1991).

2.2. SUBPRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DEL CAMARÓN

La parte comestible del camarón representa el 50% del animal y el 50% restante está constituido por el cefalotórax, conocido como "cabeza", que no es comestible. Se estima que aproximadamente 700 mil toneladas de desperdicios de camarón se aprovechan en la industria anualmente. Una parte se destina a la elaboración de harina de camarón, la que puede ser utilizada en alimento para animales cuando se desean altas concentraciones de proteína (Desrosier, 1986; Subasinghe, 1999), el resto se desecha generando desperdicios que contaminan la tierra (en el caso de las granjas camaronícolas o de los centros distribuidores que reciben camarones completos y los "descabezan" *in situ*), lo que provoca



el deterioro ambiental y la proliferación de fauna nociva. En alta mar, la preocupación es mayor debido a que causan problemas al incrementar la materia orgánica en suspensión en una zona relativamente reducida, lo cual aumenta la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) limitando la cantidad de oxígeno disuelto en el medio (No y Meyers, 1992).

Actualmente, dicho subproducto es aprovechable por su alto contenido de proteína, lípidos, quitina, antioxidantes, intensificadores de sabor y pigmentos, que resultan ser útiles en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Mathur y Narang, 1990; Knorr, 1991; Mandeville y col., 1991, Seymour y col., 1996).

Según la composición química de la porción comestible del camarón y del cefalotórax (Tabla 2-1), se observa que, después de la humedad, el componente más abundante de la porción comestible resulta ser la fracción nitrogenada (47.7% base seca), que convierte al camarón en un alimento valioso (Cañipa y Durán-de-Bazúa; 1997).

Tabla 2-1. Composición del camarón, 100 g de porción comestible (Charley, 1987) y del cefalotórax, % base seca (Agricultural Handbook, 1975)

COMPOSICIÓN	PARTE COMESTIBLE	CEFALOTÓRAX
Agua (g)	78.2	B.S.
Proteína (g)*	18.1	47.70
Grasa (g)	0.8	4.63
Carbohidratos (g)	1.5	2.47
Fibra cruda	N.D.	19.35
Cenizas	N.D.	26.86
Niacina (mg)	3.20	N.D.
Calcio (mg)	63.00	N.D.
Fósforo (mg)	166.00	N.D.
Hierro (mg)	1.60	N.D.
Tiamina (mg)	0.02	N.D.
Calorías, cal	91.00	N.D.

B.S. =base seca, N.D.= no determinado

*Medida como nitrógeno Kjeldahl usando un factor convencional



En el cefalotórax, comparado con la porción comestible, han aumentado otras fracciones, como la de fibra cruda y la de cenizas que corresponden a la quitina y a las sales minerales, respectivamente (Mathur y Narang, 1990).

Entre los componentes de importancia del cefalotórax de camarón está la quitina (amino-polisacárido) que se encuentra asociada a las proteínas de manera covalente, ésta le confiere estabilidad a la estructura que se refleja en su rigidez y resistencia. En los crustáceos, la quitina también está asociada a carotenoides (generalmente con β -carotenos, astaxantinas y derivados), al combinar los grupos amino de ésta mediante enlaces de tipo base de Schiff, impartiendo color a los tejidos.

En la fracción de lípidos se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables del aroma y sabor típicos del camarón, unos pigmentos liposolubles de tipo carotenoide que son responsables del color que presenta el camarón luego de su cocción. Todos estos componentes elevan el potencial de aprovechamiento de la parte no comestible del camarón (Cañipa, 1994; Synowiecki, 2000).

2.3. EL CAMARÓN Y SU DESARROLLO

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro, de tamaño y color variables. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en tres partes: Cefalotórax, abdomen y telson, comercialmente conocidos simplemente como cabeza y cola (Figura 2-1). El cefalotórax, una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón que contiene a la cabeza, los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensiles y dos caminadoras.



La cresta en la parte superior es rígida, dentada y termina en un rostro alargado por delante de la cabeza. El abdomen, en el cual se encuentran los intestinos, se divide en seis segmentos. El último de ellos termina en una punta fina llamada telson y por debajo está la cola que le sirve para nadar (Servicio de Actualización Pesquera, 1990; Dore y Frimodt, 1987).

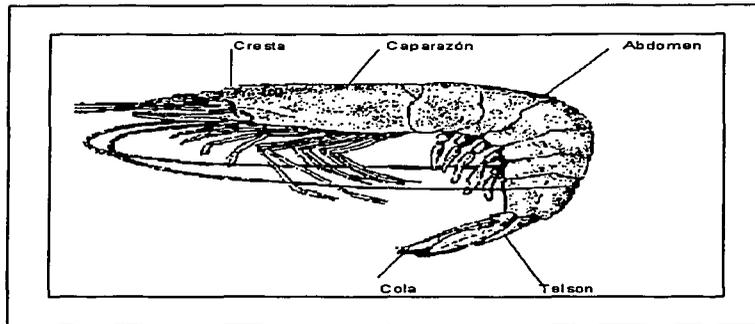


Figura 2-1. El camarón

En cuanto a la anatomía y fisiología digestiva, las partes más importantes de este sistema se definen de acuerdo a la alimentación. El tubo digestivo del decápodo se divide en tres partes, el intestino anterior o estomodeo, el intestino medio o mesenteron y el intestino posterior o proctodeo. Los alimentos se desplazan por el tubo digestivo siguiendo trayectorias complejas, y sus movimientos dependen en gran parte del tamaño de la partícula. En el estómago se pueden distinguir dos partes: la "pars cardiaca" o parte estomacal anterior donde se acumulan los alimentos digeridos y la "pars pilorica" o parte estomacal posterior que posee piezas calcáreas, sedas, espinas, filtros, así como repliegues y sillares por las cuales van a pasar los alimentos en el curso de sus sucesivas transformaciones (moliendas).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La degradación química de los alimentos se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de la glándula del intestino medio. Este órgano complejo cumple varias funciones como son la de secretar enzimas digestivas, así como la de retener temporal y cíclicamente las reservas, además de ser el principal órgano de absorción de los productos de digestión (Ceccaldi, 1987; Millamena, 1996; Pedrazzoli y col., 1998).

Para su cultivo en granjas se debe considerar que el camarón pasa por una serie de metamorfosis desde que eclosiona del huevo hasta llegar a adulto. Los diferentes estadios se dividen en:

A) **Nauplio**, primer estadio larvario donde se presentan cinco mudas que se designan como N₁, N₂, N₃, N₄, N₅. En esta etapa hay un saco vitelino, el cual provee los nutrientes que satisfacen sus necesidades para sobrevivir.

B) **Protozoa**, a partir de esta etapa, el camarón necesita de alimento para satisfacer sus necesidades nutrimentales, por lo que es necesario agregar al cultivo alimento natural o artificial con características físicas y químicas adecuadas. El alimento natural en esta etapa es el fitoplancton, principalmente algas del tipo de las diatomeas y, posteriormente, se sustituye por el zooplancton (*Artemia salina*, recién eclosionada). Suceden después tres mudas, conocidas como P₂1, P₂2 y P₂3. Ésta es una de las fases más críticas del ciclo de crecimiento.

C) **Mysis**, pasa por tres mudas llamadas M₁, M₂ y M₃.



D) **Postlarva**, el camarón comienza a desarrollarse y engordar; los alimentos que se proporcionan en las granjas de cultivo de camarón son dietas comerciales formuladas bajo diferentes formas de presentación como son "peletizados" (de "pellet" en inglés, gránulo) o microgranulados y microencapsulados, que se pueden proporcionar al camarón en sus diferentes estadios de desarrollo con variantes en los niveles de contenido proteínico de acuerdo con la biomasa existente en los estanques de engorda (Villegas y Kanazawa, 1980; Jones y col., 1984; Kirk, 1984; Chapa, 1987; Piedad y Sumalangcay, 1991).

Como ya se mencionó anteriormente, entre los subproductos valiosos del camarón destaca el cefalotórax ya que la secuencia de aminoácidos que conforma las proteínas del cefalotórax de camarón incluye a todos los aminoácidos esenciales que constituyen aproximadamente el 50% del peso seco del cefalotórax (IIBB, 1995). Estas proteínas son empleadas como una fuente alimentaria y para la formulación de medios de cultivo para microorganismos (García-Gómez, 1997).

Las sales minerales, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio constituyen el segundo componente más abundante en el cefalotórax (27% aproximadamente), se encuentran asociadas a la quitina y proteínas otorgándole una dureza característica al exoesqueleto del crustáceo. Sin embargo, se ha observado que, en niveles por arriba de 1.04 y 1.24% de calcio y fósforo en dietas para larvas de camarón, se inhibe el crecimiento y se obtienen menores pigmentaciones de dicho crustáceo al emplear el cefalotórax directamente en la formulación (Trino y Sarroza, 1995; Kline y Stekoll, 2000). Por ello es recomendable realizar una desmineralización previa (Spinelli, 1974).



2.4. ALIMENTACIÓN PARA LARVICULTURA

El cultivo en las fases larvarias del camarón se ha basado en alimento vivo como microalgas y *Artemia salina*. Sin embargo, esta clase de alimento requiere de mano de obra excesiva, equipo costoso y por consecuencia se presentan fluctuaciones en la calidad, además de que existen dificultades al pretender escalar el proceso de producción de alimento vivo a nivel industrial. Ello ha conducido a la búsqueda de una nueva alternativa tecnológica que mantenga un ambiente saludable, reduzca el riesgo de enfermedades que afectan la sobrevivencia de las larvas y permita reducir costos. La opción es la producción de alimentos artificiales microparticulados o microencapsulados (Piedad y Sumalangcay, 1991; Pedroza-Islas, 2000).

El desarrollo de la investigación tecnológica para la elaboración de alimentos artificiales balanceados de alta calidad en larvicultura, ha cobrado relevancia en los últimos años ya que desde 1976 diversos investigadores han realizado pruebas para llegar a obtener un alimento con las características necesarias para atender las necesidades larvarias, esto es: Partículas pequeñas (5-300 μm de diámetro) capaces de modificarse de acuerdo al estadio de crecimiento, estables en agua, presentar buena flotabilidad, tener bajas velocidades de sedimentación y bajas tasas de disolución, contener ingredientes balanceados y digeribles, pero sobre todo, mantener su integridad evitando el lavado de los nutrientes (Medina-Reyna y col., 2002).

En nuestro país ya existe la elaboración comercial de alimentos microencapsulados; no obstante, su precio es elevado y se trata de una tecnología patentada que aún no ha alcanzado el grado de refinamiento suficiente para sustituir al alimento vivo.



Debe mencionarse que hay varios informes que señalan que cuando se alimentan larvas con dietas deficientes en *Artemia* hay una reducción en la sobrevivencia y/o en la tasa de crecimiento (Sangha y col., 2000).

Como parte de los estudios enfocados a buscar nuevas opciones de alimentación para larvicultura, Pedroza-Islas (2000) encapsuló por medio de secado por aspersión, una dieta para larvas de camarón de acuerdo a la formulación descrita por Gaxiola (1991) utilizando como agentes encapsulantes a la goma arábica, goma de mezquite y maltodextrina, solos y mezclados de acuerdo a un diseño experimental de tres componentes, con lo que concluyó que fue posible alcanzar los siguientes logros tecnológicos: Mantener estables las partículas en un medio acuoso, mostrar un efecto positivo en los tamaños de partícula, encontrar buenas características morfológicas y microestructurales de las microcápsulas debido a la composición de los ingredientes de la pared, encontrar el mejor tratamiento para tener un tiempo de disolución y de flotabilidad adecuados, así como mejorar eficientemente la estabilidad térmica-oxidativa de los ácidos grasos contenidos en la dieta. Sin embargo, se sacrificó el valor nutrimental de las microcápsulas ya que éste se redujo a una tercera parte pues las dietas artificiales deben contener un mínimo de 55% de proteínas (Jones, 1998).

Con base a lo anterior resultó necesario buscar nuevos agentes encapsulantes que además de ser buenos formadores de pared ayuden a cubrir las necesidades nutrimentales de las larvas de camarón. Espinosa-Herrera (2002) encapsuló mediante secado por aspersión una dieta para larvas de crustáceos proponiendo la formación de paredes compuestas entre proteínas y polisacáridos; por lo que utilizó dos agentes encapsulantes con características de



formación de película y de producción de suspensiones de baja viscosidad (el suero de leche y la goma de mezquite) utilizando el suero de leche en una concentración de 34% y 80% de proteína. Como resultado observó que las microcápsulas de forma más esférica, con superficies más lisas y tersas, libre de poros y fracturas, se obtuvieron cuando se utilizó la mezcla de suero de leche con 80% de proteína. Con base en esto, Hernández-Rojas (2002) realizó pruebas de alimentación para larvicultura utilizando una relación 75:25 de suero de leche y goma de mezquite respectivamente, obteniendo resultados positivos cuando empleó una co-alimentación con microalgas pues concluye que la sustitución total de microalgas para larvas de camarón blanco utilizando dietas artificiales no es recomendable.

2.5. PIGMENTOS CAROTENOIDES

Los carotenoides pertenecen a una familia de pigmentos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son responsables de muchos de los colores amarillo y rojo de los productos vegetales y animales.

Las funciones que presentan los carotenoides son: Absorción de la luz, captura del oxígeno singulete, bloqueo de reacciones mediadas por radicales libres y como precursores de la vitamina A. Estos pigmentos poseen un gran interés comercial por sus amplias posibilidades de aplicación en la industria (Fennema, 1993).

Los carotenoides son tetraterpenos liposolubles formados por la condensación de unidades de isopreno, cuya gama de color va del amarillo al rojo, dependiendo del aumento en la conjugación de los enlaces (rojo) y de la epoxidación (amarillo). Se dividen estructuralmente en dos grupos: Los carotenos y las xantofilas.



2.5.1 Fuentes de obtención

De acuerdo con Velázquez (1995), los pigmentos que se encuentran conformando a las carotenoproteínas (asociación de proteína y pigmento) forman parte del grupo de las xantófilas que es una forma oxidada de los carotenos. Entre los pigmentos más representativos se encuentra la luteína cuya fuente es la flor de muertos o cempasúchil, empleada en el alimento de especies avícolas; la capsantina que es el pigmento causante del color rojo del pimiento rojo; la zeaxantina que junto con la luteína, representan la mayor proporción de las xantofilas encontradas en el maíz amarillo; la criptoxantina que se encuentra en la naranja, maíz y papaya; la cantaxantina y astaxantina que son los pigmentos responsables de plumaje, piel y tejidos de aves, crustáceos, algas y algunos microorganismos (Baduí, 1996).

La astaxantina es uno de los pigmentos que se pueden obtener por medio de tres vías: La primera consiste en una síntesis química de la trans-astaxantina que se comercializa como "Roxanthin" o "Carophyllred" con un contenido de astaxantina del 8%, no excediendo el 2% del isómero cis que no tiene actividad biológica. El costo de este colorante es elevado y se vende por medio de la compañía Hoffman-La Roche.

La segunda es la fuente microbiana a partir de levaduras del género *Phaffia*, las cuales se caracterizan por presentar colonias rojo-anaranjadas debido a la síntesis de pigmentos carotenoides. El contenido de éstos varía dependiendo de la cepa que se maneje; del 40 al 90% corresponde a astaxantina. La tercera es a partir de caparazones de crustáceos como es el cefalotórax de camarón (García-Gómez, 1997).



En estudios cromatográficos se ha identificado a la astaxantina como el pigmento que se encuentra en mayor proporción en el cefalotórax (45% en la cabeza, 28% en el caparazón y 24% en la cola) seguido de la cantaxantina y en menor proporción el astaceno, considerado como el producto oxidativo de la astaxantina (Foss y col., 1984; Cañipa, 1994).

2.5.2 Astaxantina

La astaxantina en los crustáceos está presente en diferentes formas que pueden ser: Libre o sin esterificar (oxicarotenoidea) pues se presenta como una larga cadena de carbonos poli-insaturada con grupos funcionales, tanto al inicio como al final de la cadena; otra forma en que se puede encontrar es esterificada con una o dos cadenas largas de ácidos grasos (ácido palmítico, oleico, linoleico, esteárico) como carotenolipoproteína y por último puede presentarse esterificada asociada únicamente a proteínas (carotenoproteínas). Las formas esterificadas son las que representan a gran parte de la astaxantina depositada en tejidos como: El caparazón, la hipodermis, la cabeza, el hepatopáncreas y la cola.

En dichos tejidos la astaxantina se muestra en forma de un complejo carotenoproteínico al asociarse con proteínas estabilizado el pigmento lo que imparte un color azul o verde al animal vivo pero durante la cocción a la que se somete una vez capturado, la proteína se desnaturaliza y libera la astaxantina que se presenta de color rojo-naranja.

En los camarones cultivados en granjas, se recomienda que la cantidad de astaxantina que se proporcione en las dietas sea la adecuada para llegar a una concentración de hasta 500 mg/kg de tejido, reportándose en algunos estadios larvales concentraciones hasta de 800 mg/kg de tejido. Por ello, estos aditivos deben adicionarse al alimento en concentraciones



traza para impartir una coloración deseada en la carne de camarón pues dicha característica es un factor importante que influye en la compra por parte del consumidor. En el ambiente natural esta pigmentación está dada por carotenoides que se encuentran en su alimento natural como invertebrados y algas (Arango, 1998).

2.5.3 Usos de la astaxantina

La astaxantina se emplea comúnmente para teñir especies avícolas y acuícolas como son los flamencos, los salmones y las truchas salmonada y arcoiris, ya que estos organismos no son capaces de sintetizar "de novo" dichos pigmentos y es necesario adicionarlos en su dieta para que adquieran la coloración rosa-anaranjada propia de dichas especies (Johnson, 1991). Sin embargo, la alimentación con las dietas destinadas a pigmentar no aseguran el éxito en su empleo ya que el grado de fijación, la asimilación del pigmento en piel y tejidos depende de factores como son la edad, el sexo, la época del año, la madurez sexual, la estructura química del caroteno que se ingiera, la proporción cis que contenga, la esterificación y la asociación con lípidos, proteínas u otros compuestos que promuevan la absorción. Todo ello determina la preferencia de los productores de diversas especies acuícolas por el pigmento natural sobre el sintético ya que la absorción en éstos organismos es mayor cuando el pigmento proviene de una fuente natural (Choubert y Luquet, 1983; Fang y Cheng, 1993; Fang y Chiou, 1996).

En el caso particular de los camarones aunque son capaces de oxidar y convertir el β -caroteno, la zeaxantina y otros pigmentos intermedios en astaxantina, el proceso metabólico para lograrlo no es muy eficiente por lo cual, la astaxantina debe ser suministrada en sus dietas. La función de este pigmento es aumentar la tolerancia al estrés, mejorar la respuesta



inmune, estabilizar la pared celular y, en general, puede ser una reserva intracelular de oxígeno cumpliendo con la función de quelar los radicales libres con una potencia 2500 veces mayor que la vitamina E, lo que coloca a la astaxantina como el antioxidante celular más importante para los crustáceos (Arango, 1998). En estadios postlarvales, el uso de astaxantina parece aumentar el desarrollo del ovario y reproducción (Pangantihon y Chern, 1998). Después de la captura del camarón, la astaxantina, se emplea como indicador de calidad durante su procesamiento y almacenaje gracias al color rojo-naranja que imparte después de la cocción (Kelley y Harmon, 1972; Fang y Cheng, 1993).

2.6. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

Diversos trabajos han demostrado que la cantidad de astaxantina extraída depende del sistema de extracción empleado y que su calidad se relaciona con las condiciones de procesamiento y almacenaje. Entre los métodos de extracción más utilizados se encuentran: Extracción mediante enzimas proteolíticas para hidrolizar la unión de proteínas y pigmentos, la utilización de proteasas bacterianas para separar el complejo carotenoproteína de la quitina, la extracción química del pigmento con un sistema de acetona, éter de petróleo, mezclas de éter de petróleo:acetona:agua, acetona-ciclohexano y, finalmente, una extracción con aceite de soya (Kelley y Harmon, 1972; Meyers y Bligh 1981; Chen y Meyers, 1982a).

Para extraer el pigmento, el principal obstáculo lo constituye la unión con las proteínas, pues como ya se mencionó, en estado natural hay una mutua interacción entre proteínas y carotenos que aumenta la estabilidad de los últimos. Si esta unión se debilita o se rompe, por ejemplo en el secado, entonces la estabilidad de los carotenos decrece. Chen y Meyers



(1982a) probaron la extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya, donde la cantidad de astaxantina extraída resultó ser mayor a la obtenida por otros métodos (600 μg de astaxantina/g de aceite pigmentado). Durante el experimento, se realizó un tratamiento enzimático previo y se probó exitosamente el efecto de un agente antioxidante comercial, el "Etoxiquin", como protector contra el deterioro del pigmento, ya que durante la extracción se somete al material a altas temperaturas.

El Etoxiquin (6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinoleína) es un líquido amarillo que se utiliza como antioxidante químico para frutas y verduras; su capacidad antioxidante para los pigmentos carotenoides respecto a otros antioxidantes comerciales, como el "Endox" y combinación de BHA – BHT, es más satisfactoria a lo largo del tiempo según los estudios reportados por Chen y Meyers (1982a) y Jiménez y col. (2002). El contenido de metales pesados que presenta este antioxidante a nivel comercial es menor de 3 ppm y la dosis letal en un 50% o DL_{50} oral para ratas es de 1.92 g/kg, por lo que esto asegura la escasa posibilidad de que cause problemas de toxicidad cuando se utiliza en alimentos.

El empleo de aceite de soya (61% de ácidos grasos poli-insaturados) en este proceso de extracción también ayudó a retardar la oxidación de los pigmentos carotenoides pues éste es rico en tocoferoles que actúan como agentes antioxidantes en comparación con otros aceites, como el de maíz, girasol y olivo, cuya cantidad de tocoferoles es menor. Además, el aceite de soya contiene ácidos grasos esenciales como linoléico (49%) y linolénico (11%) que hacen de este sistema de extracción favorable para utilizar el pigmento obtenido en dietas para peces o crustáceos como el camarón (Tramontano y col., 1992).



Por otra parte, Jiménez y col. (2002) probaron recientemente las condiciones de extracción con aceite de soya sugeridas por Chen y Meyers (1982a) empleando únicamente harina de cefalotórax de camarón desmineralizada de un tamaño de partícula de 0.155 mm y una proporción harina:aceite de soya de 1:10 encontrando una cantidad de pigmento de aproximadamente 280 μg de astaxantina/g de aceite pigmentado sin realizar un tratamiento enzimático previo.

2.7. REACCIONES DE OXIDACIÓN DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides y xantofilas sufren de oxidación cuya intensidad depende de que el pigmento se encuentre *in vivo* o *in vitro* y de las condiciones ambientales como son la alta temperatura, las radiaciones electromagnéticas, la exposición a la luz, la presencia de oxígeno, los metales y los peróxidos debido a la estructura insaturada de los enlaces carbono-carbono que presentan. Los carotenoides cuando se encuentran unidos a lípidos sufren una oxidación acoplada a velocidades que dependen del sistema: Son más estables en sistemas con alto grado de insaturación, pues el sistema lipídico por sí mismo acepta los radicales libres más fácilmente que el caroteno. Al contrario, los carotenos son menos estables en sistemas lipídicos con bajo grado de insaturación. La oxidación de los carotenoides trae como consecuencia la pérdida de color y de actividad vitamínica, especialmente en el caso del β -caroteno (Baduí, 1996).

Uno de los métodos para evaluar la resistencia a la oxidación es la calorimetría diferencial de barrido que es una técnica que se ha empleado para determinar la descomposición térmica-oxidativa de diferentes materiales, utilizando diversos parámetros cinéticos que indican la estabilidad del material al calor y al oxígeno (Litwinienko y col., 1995).



2.7.1 Estabilización

Para evitar el deterioro en los carotenoides por los factores antes señalados, puede buscarse su estabilización por medio de métodos químicos como el uso de agentes antioxidantes o bien por medios físicos, encerrándolos en una estructura protectora que impida su interacción con los factores ambientales.

La microencapsulación sería entonces una opción potencial, ya que se trata de una forma especial de empacar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para protegerlos de condiciones adversas y, posteriormente, liberar el material (Chih y col., 1995).

2.7.2 Microencapsulación

Históricamente, la microencapsulación de alimentos surge a partir de una tecnología que se desarrolla por primera vez en el Reino Unido de la Gran Bretaña. Las dietas que involucran el empleo de la microencapsulación son altamente promisorias pues atienden las necesidades de desarrollo que implican tecnologías que eliminen o disminuyan las dificultades que representa la alimentación de la fase larvaria, considerando que las funciones de la microencapsulación son: Protección de deterioros por efecto del oxígeno y otros gases, control de la transferencia de humedad, manejo de materiales líquidos, control sobre la liberación del material microencapsulado y protección contra la contaminación en general (Luzzi, 1970).

Cuando se utiliza esta técnica en la elaboración de dietas destinadas a camarones, la pared que forma la microcápsula debe ser lo suficientemente delgada para asegurar que se



aproveche el pigmento durante el trayecto por el tubo digestivo de las larvas, en el caso del estado de protozoa el tiempo que dura este trayecto es de 7 a 12 minutos.

Tanto para larvas como para los adultos, las cápsulas deben ser rotas mecánicamente para permitir que el contenido sea ingerido o bien ser susceptibles de hidrólisis enzimática (Pedroza-Islas y col., 1998). Los métodos de microencapsulación más comunes a nivel industrial son: Polimerización interfacial, coacervación, gelación (iónica o térmica), secado por aspersión y liofilización (Benita, 1996).

No importa cuál sea el proceso de fabricación, se deben cumplir los criterios de **aceptabilidad**, es decir, las partículas deben tener el tamaño adecuado; deben estar **disponibles en el agua** con una densidad similar a la de los alimentos vivos y deben ser ingeridas a una tasa similar; deben presentar una cierta **estabilidad** de partícula con una mínima pérdida por lavado y deben romperse hasta que se ingieran; deben permitir su **digestibilidad** para que las partículas sean asimilables y deben mantener características adecuadas de **almacenamiento**, que conserven sus cualidades por lo menos durante 12 meses en zonas de 80-90% de contenido de humedad relativa y con temperaturas de 40 hasta 45°C (zonas costeras).

El secado por aspersión, es uno de los procesos más utilizados en México para microencapsular debido a su sencillez y eficiencia pues se basa en la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una emulsión en una corriente de aire caliente dentro de una cámara de secado. Como el agua se evapora inmediatamente, el polvo queda envuelto en una capa de material encapsulante (Dziezak, 1988). El proceso anterior consta



de cuatro pasos: 1) Atomización del fluido; 2) Contacto del producto rociado con el aire; 3) Deshidratación del producto y 4) Separación del producto seco (Masters, 1985).

La microencapsulación es una técnica que se ha aplicado para preservar y/o proteger numerosos ingredientes. Técnicamente, el material que es cubierto se refiere como la fase interna y el material que recubre es llamado pared. La adecuada selección del material que forma la pared de la microcápsula y la concentración utilizada son puntos críticos dentro del proceso (Chen y col., 1988).

2.7.3 Materiales encapsulantes

Se han probado con anterioridad diferentes materiales formadores de pared como son la goma arábica, la goma de mezquite, los almidones, las dextrinas, los aceites vegetales hidrogenados, las gelatinas o bien las proteínas concentradas y aisladas de suero de leche (Graves, 1972; Rullán y col., 1997; Moreau y Rosenberg, 1998).

La goma arábica (masa molecular entre 47,000 y 3,000,000 g/mol) y de mezquite (masa molecular entre 87,000 y 880,000 g/mol hasta de 2,121,000 g/mol), constituidas principalmente por azúcares, son buenas formadoras de película y presentan alta eficiencia para encapsular (Beristáin, 1996; Islam y col., 1997; Vernon-Carter y col., 1998).

Estos heteropolímeros presentan propiedades tensoactivas que inducen la encapsulación y la adhesión del material de la pared alrededor del producto a encapsular, además de que logran estabilizar eficientemente emulsiones de aceites en soluciones acuosas pues contienen una pequeña fracción proteínica unida covalentemente a los polisacáridos (2-4%).



A pesar de que ambas gomas presentan características similares para la formación de microcápsulas, se prefiere a la goma de mezquite por presentar mejores propiedades emulsificantes y encapsulantes, además de ser más accesible económicamente (Beristáin, 1996; Vernon-Carter y col., 1996; Pedroza-Islas, 2000).

Otro encapsulante de gran uso es la maltodextrina que se ha probado con éxito como formador de cápsulas en el β -caroteno, actuando favorablemente como protector contra la acción del oxígeno y el vapor de agua (Desobry y col., 1997).

En cuanto a otros materiales para encapsular, se encuentran las proteínas de suero de leche, que son aquéllas que permanecen solubles a valores de pH de 4.6 y a 20°C y se obtienen principalmente como subproducto de la elaboración del queso. Las principales proteínas en todos los tipos de suero de leche son la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoalbúmina (Bottomey y col., 1990).

Ya fue mencionado que el propósito de encapsular el aceite que contiene los pigmentos carotenoides extraídos es protegerlos del deterioro por oxidación y, por tanto, es deseable que la pared de las microcápsulas sea capaz de evitar o retardar las reacciones de degradación por efecto del oxígeno.

En el siguiente capítulo, se presenta la metodología seguida para alcanzar los objetivos establecidos.



CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DIAGRAMA GENERAL

El diagrama de la Figura 3-1 ilustra la metodología general propuesta para el desarrollo de esta investigación:

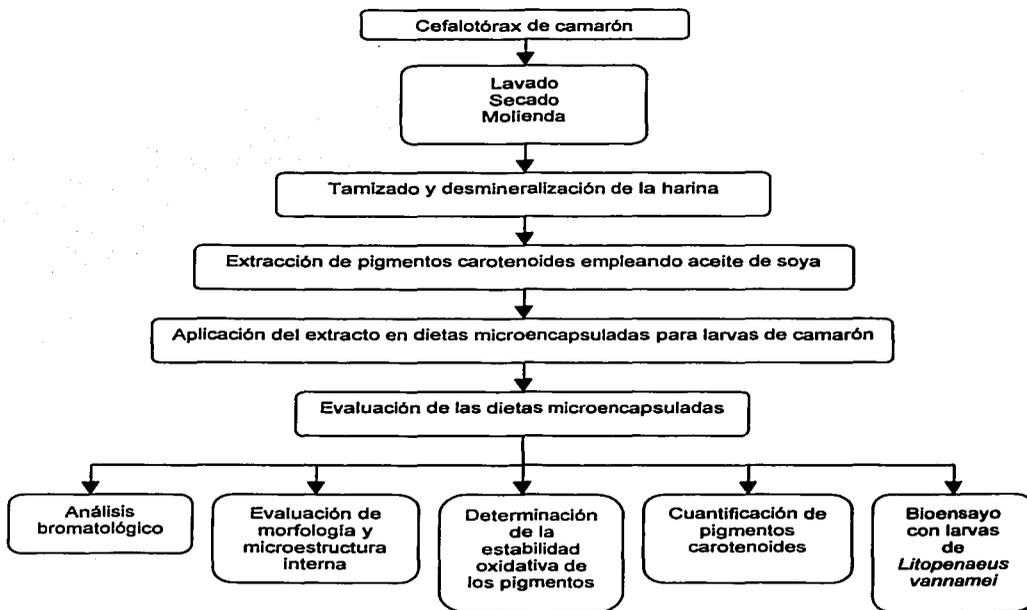


Figura 3-1. Metodología experimental



En las Tablas 3-1 y 3-2 se presentan las especificaciones del equipo y reactivos empleados a lo largo de la fase experimental de esta investigación.

Tabla 3-1. Equipos empleados

EQUIPO	ESPECIFICACIONES
Agitador orbital (Vórtex)	Marca: Scientific Industries. Modelo: G-560 Fabricación: EEUA
Calorímetro diferencial de barrido	Marca: Mettler Toledo DSC. Modelo: 821* Fabricación: Suiza
Centrífuga	Marca: Rotixa. Modelo: 50 RS Fabricación: Alemania
Equipo de agitación/calentamiento	Marca: Neslab Instruments Inc. Newington N.H. Modelo: Exacal Fabricación: EEUA
Equipo de rociado a vacío	Marca: Ion Sputtering Denton Vacuum. Modelo: Desk II Fabricación: Japón
Espectrofotómetro UV/visible	Marca: Spectronic Milton Roy. Modelo: 21 D Fabricación: EEUA
Homogenizador	Marca: Silverson. Modelo: L4R Fabricación: EEUA
Microscopio electrónico de barrido	Marca: JEOL. Modelo: 5900 LD Fabricación: Japón
Molino para cereales	Marca: CeCoCo. Tipo: S Fabricación: EEUA
Roto-evaporador ("rotavapor")	Marca: Büchi. Modelo: 461 Fabricación: EEUA
Secador eléctrico	Marca: Partlow. Modelo: 860 p. Fabricación: EEUA
Secador por aspersion	Marca: Niro Atomiser Mobile. Modelo: Minor Fabricación: EEUA
Tamizador eléctrico	Marca: Steve-Shaker, de W.S. Tyler. Modelo: RX-24. Fabricación: EEUA

Tabla-3-2. Reactivos empleados

REACTIVOS	ESPECIFICACIONES
Aceite de soya puro	Tolteca Hidalgo Cargill
Acetona	Reactivo de J.T. Baker
Éter de petróleo	Reactivo de J.T. Baker
Étoxiquín	Sigma-Aldrich
Goma arábiga	Acacia Senegal, GA cuyo nombre comercial es "Spray-gum" (Colloids Naturels Marsella, Francia)
Goma de mezquite	Obtenida en el Edo. de San Luis Potosí
Maltodextrina 10 DE*	"Amidex 10" (Arancia, S.A de C.V. México)
Papel filtro	Whatman No. 1, Merck
Placas para cromatografía en capa fina de gel de sílice de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor	Kiesel DC "Merck"
Proteína concentrada de suero de leche (WPC, 80% proteína)	AMPC, Iowa, EEUA
Sulfato de sodio anhidro	Reactivo de J.T. Baker

*DE =equivalente de dextrosa, por sus siglas en inglés



3.2 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

3.2.1 Obtención de la muestra

El cefalotórax de camarón se obtuvo en el mercado de mariscos “La Nueva Viga”, localizado dentro de la Central de Abastos en la Ciudad de México. Las cabezas fueron proporcionadas gratuitamente por los comerciantes y no se realizó una selección de especies, pero predominaron las cabezas de camarón café (*Penaeus aztecus*) y blanco (*P. setiferus*), ambas del Golfo de México. Se transportaron en bolsas negras y cubiertas con hielo, a fin de retardar la descomposición por microorganismos y enzimas, el manejo de la muestra en las siguientes etapas fue como un lote único.

3.2.2 Lavado

Las cabezas de camarón se colocaron en cubetas de plástico y se lavaron bajo el chorro de agua corriente hasta que ésta se observó limpia y se dejaron escurrir por aproximadamente 15 minutos.

3.2.3 Secado

Las cabezas ya lavadas se distribuyeron en capas delgadas sobre charolas de aluminio y se secaron a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas en un secador eléctrico.

3.2.4 Molienda y conservación

Una vez secas, las cabezas se molieron en un molino para cereales hasta obtener harina, la cual se conservó a temperatura de refrigeración (4°C), en frascos de vidrio color ámbar y sellados con papel parafilm, para prevenir la degradación de los pigmentos.



3.2.5 Tamizado

El tamizado se realizó empleando un tamizador eléctrico. Se obtuvieron 2 grupos de harinas con los siguientes intervalos de tamaños de partícula (mm): Menores a 0.150 (Malla No. 100) y de 0.150 a 0.177 (Malla No. 80).

3.2.6 Desmineralización

La desmineralización se realizó siguiendo la metodología propuesta por Simpson y Haard (1985), con algunas variantes en el método determinadas por García-Gómez (1997), empleando una solución de EDTA disódico 0.5 M en una relación harina de cefalotórax de camarón:EDTA de 1:6, con agitación constante durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la harina se sometió a varios lavados con agua destilada hasta que el agua quedara lo más clara posible. Se filtró con un paño de tela, se secó a 65°C durante 12 horas y se almacenó para ensayos posteriores en las mismas condiciones de conservación descritas anteriormente.

3.2.7 Extracción de pigmentos carotenoides a partir de la harina de cefalotórax de camarón

La extracción de pigmentos se realizó con base al trabajo publicado por Chen y Meyers (1982a) sobre extracción de astaxantina empleando aceite de soya.

Se manejaron dos variables con dos niveles: El tamaño de partícula, empleando harina obtenida de las mallas No. 100 (menores a 0.150 mm) y No. 80 (entre 0.150 y 0.177 mm) y las proporciones de harina de cefalotórax de camarón:aceite de soya, de las que se estudiaron las de 1:5 y 1:10. Para la relación 1:10, se pesaron y vertieron en un matraz Erlenmeyer 2 g de harina, se adicionaron 20 mL de aceite de soya y 500 ppm de "Etoxiquin"



como agente antioxidante. Los matraces Erlenmeyer se colocaron en un baño de agua caliente con agitación continua en la oscuridad, hasta que se alcanzó una temperatura en la mezcla de 80°C y se mantuvo durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó la centrifugación de la muestra a 4,500 rpm a 0°C por 20 minutos para separar la fase oleosa que contiene el pigmento y se cuantificó el volumen de aceite obtenido. Para determinar la cantidad de astaxantina presente en el aceite, se realizó una lectura en el espectrofotómetro a 480 nm. La harina residual obtenida después de la centrifugación se pasó nuevamente a los matraces para realizar una segunda y una tercera extracciones siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se cuantificó el total de pigmento obtenido en las tres extracciones. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Conforme a lo sugerido por Chen y Meyers (1982a), la fórmula empleada para cuantificar el pigmento fue:

$$\mu\text{g de astaxantina/g de harina de cefalotórax de camarón} = A D (10^6)/100 G d E^1_{1\%_{\text{cm}}} \quad (3-1)$$

$$\mu\text{g de astaxantina/g de aceite pigmentado} = A D (10^6)/100 d S E^1_{1\%_{\text{cm}}} \quad (3-2)$$

donde:

A = Absorbancia a 480 nm

D = Volumen total de aceite recuperado (mL)

G = Masa de harina de cefalotórax de camarón (g)

d = Ancho de la celda (1cm)

S = 0.86 g_{mL}⁻¹, densidad del aceite de soya

E¹_{1%_{cm}} = coeficiente de extinción para el aceite de soya (2155)



Para el estudio de la extracción de pigmentos se utilizó un experimento factorial 2^k con tres repeticiones. Las variables fueron: El tamaño de partícula y la proporción harina de cefalotórax:aceite de soya. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$) (Chen y Meyers, 1982a; Montgomery, 1991).

3.2.8 Elaboración de microdietas (microencapsulación del extracto oleoso)

Los agentes encapsulantes seleccionados fueron: Goma de mezquite purificada según lo descrito por Vernon-Carter y col. (1996), maltodextrina 10 DE (equivalente de dextrosa) y goma arábica. Se prepararon dos microdietas experimentales para probar el efecto del pigmento carotenoide; en la Tabla 3-3 se presenta la formulación de la dieta 1 según lo sugerido por Hernández-Rojas (2002) y Espinosa-Herrera (2002) cumpliendo con la biodisponibilidad y aporte nutrimental requeridos para la alimentación de larvas de camarón blanco.

Tabla 3-3. Ingredientes de la dieta (1) para larvas de camarón

INGREDIENTES	PORCENTAJE (en masa)
Aceite de soya pigmentado*	17.5
Aceite de hígado de bacalao	5.84
Almidón de trigo	25
Colesterol	0.26
Proteína concentrada de suero de leche (WPC 80% proteína)	37.5
Goma de mezquite	12.5
Mezcla de vitaminas	0.05
Mezcla de minerales	0.1
Vitamina C	0.21
Lecitina	1.04

(*) Otorga 39 ppm de astaxantina a la dieta



Para elaborar la emulsión aceite:agua se preparó una dispersión acuosa de 12 g de goma de mezquite en 266 g de H₂O destilada y se adicionó almidón de trigo (pregelatinizado) después de ser enfriado a temperatura ambiente.

La pregelatinización se realizó mezclando la cantidad establecida en la Tabla 3-3 de almidón con agua destilada fría suficiente para suspender dicho material, calentando lentamente hasta formar un gel translúcido. La mezcla de almidón pregelatinizado y los demás ingredientes se mantuvieron en agitación en un homogenizador a una velocidad de 30,000 rpm. La fase acuosa se colocó en un vaso de 2000 mL donde se agregaron gota a gota 22.65 g de fase oleosa junto con la lecitina agitando a una velocidad de 15,000 rpm hasta obtener una mezcla homogénea para asegurar buenas características de flujo y de mezclado. Después se incorporó el suero de leche, la mezcla de vitaminas y minerales y, por último, la vitamina C. La mezcla se dispersó empleando de nuevo el homogeneizador durante 5 minutos a temperatura ambiente, a una velocidad máxima de 5,000 rpm. La relación final de material encapsulante con respecto a la dieta 1 fue de 1:1.

La dieta 2 se diseñó de acuerdo a lo propuesto por Gaxiola (1991) respecto al valor nutrimental y biodisponibilidad para larvas de *Litopenaeus schmitti*. Los ingredientes de ésta (Tabla 3-4) se dispersaron en una mezcla de 66% de goma arábiga, 17% de maltodextrina 10 DE y 17% de goma de mezquite, adicionando una cantidad de agua tal para obtener 25% de sólidos disueltos totales.



Tabla 3-4. Ingredientes de la dieta (2) para larvas de camarón

INGREDIENTES	PORCENTAJE (en masa)
Pescado fresco	28.1
Aceite de soya pigmentado*	13.5
Camarón fresco	17.7
Levadura de cerveza	15.6
Harina de soya	14.6
Almidón de trigo	1.6
Aceite de hígado de bacalao	2.1
Aceite vegetal	2.1
Colesterol	0.5
Mezcla de vitaminas	1.05
Mezcla de minerales	1.6
Vitamina C	0.5
Lecitina	1.05

(*) Otorga 18 ppm de astaxantina a la dieta

La relación de material encapsulante con respecto a esta dieta fue de 3:1. Las suspensiones obtenidas con ambas formulaciones se deshidrataron por aspersion utilizando un secador equipado con un atomizador rotatorio centrifugo. La tasa de alimentación del secador fue de 20 mLmin⁻¹ a 2.5 bar de presión de aire y una temperatura de entrada de 150 ± 5°C (Pedroza-Islas y col., 1999).

3.2.9 Evaluación de la morfología y la estructura interna de las dietas microencapsuladas

La evaluación de la morfología y la estructura interna de las microcápsulas se determinó por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB), usando dos técnicas de microscopia electrónica: Electrones secundarios y electrones retrodispersos (Sheu y Rosenberg, 1998). Se colocó una pequeña cantidad de las microcápsulas en un soporte para muestra provisto de una cinta de grafito con doble adhesivo. Posteriormente, la muestra se recubrió con una delgada capa de oro grado analítico en un aparato de rociado a vacío bajo las siguientes condiciones: Recubrimiento por rociado usando aire a presión a 50 millitorr y con una



corriente de 25 miliamperes durante 120 s y se observó en el microscopio a 15 kV y 20kV con aumentos de 300X, 1000X, 1500X, 5000X, 7200X con electrones retrodispersos.

Para observar la estructura interna de las microcápsulas las muestras se colocaron en el portamuestras del MEB, se fracturó con la ayuda de una navaja delgada golpeando perpendicularmente, luego se recubrió con una capa de oro como se explicó anteriormente y se observó al microscopio (Young y col., 1993).

3.2.10 Determinación de la estabilidad oxidativa de las dietas microencapsuladas

Para determinar la estabilidad termo-oxidativa de los ingredientes contenidos en las microcápsulas se utilizó una técnica termoanalítica, la calorimetría diferencial de barrido en régimen dinámico (DSC). Se pesaron de 1 a 1.5 mg de muestra y se colocaron en una cápsula de aluminio hermético con tapa invertida a la cual se le realizó una perforación superior central, estandarizada para permitir la entrada de aire. El intervalo de calentamiento fue de 150 a 500°C con una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹ y un flujo de aire de 20 mL min⁻¹ (Litwinienko y col.,1995; Pedroza-Islas, 2000).

Se determinó, a partir de las curvas de calentamiento obtenidas, la temperatura máxima de la exoterma de oxidación de cada muestra, a la velocidad de calentamiento sugerida y se calcularon los parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius de acuerdo con el "modelo de orden n" integrado en el software del equipo (Mettler Toledo STAR® System "Thermal Analysis System), en función de la temperatura y la velocidad de la reacción:



$$d\alpha/dt = K_0 \exp(-E_a/RT) (1-\alpha)^n \quad (3-3)$$

donde:

$d\alpha/dt$ = velocidad de la reacción (min^{-1})

K_0 = factor preexponencial

E_a = energía de activación (kJmol^{-1})

R = constante general de los gases ($8.31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T = temperatura (Kelvin)

α = factor de conversión de la reacción

n = orden de la reacción

Siguiendo el procedimiento propuesto por la ASTM E698-79 (2001) se calculó la constante de la velocidad de reacción (K) según la siguiente ecuación:

$$K = K_0 \exp(-E_a/RT) \quad (3-4)$$

donde:

K_0 = factor preexponencial

E_a = energía de activación (Jmol^{-1})

R = constante general de los gases ($8.31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T = temperatura (Kelvin)

Finalmente, se calculó el tiempo de vida media para cada una de las dietas empleando la siguiente ecuación:



$$T_{1/2} = \ln 2/K$$

(3-5)

donde:

$T_{1/2}$ = tiempo de vida media

K = constante de velocidad de reacción (min^{-1})

3.2.11 Análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas

Se realizó un análisis bromatológico de las dietas 1 y 2 (determinación de humedad, cenizas, proteína, grasa, fibra cruda e hidratos de carbono por diferencia), según lo establecido por la AOAC (1996).

3.2.12 Extracción de pigmentos carotenoides a partir de las dietas microencapsuladas empleando un sistema éter de petróleo, acetona y agua

Se realizó una extracción de pigmentos siguiendo la técnica propuesta por Cañipa (1994) realizando modificaciones de acuerdo con las condiciones de la muestra: Se colocó 1 gramo de dieta en un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio y se añadieron 22.5 mL de acetona, 4.5 mL de agua y 3.0 mL de éter de petróleo, se adicionaron perlas de ebullición, se tapó el tubo y se mantuvo la mezcla en agitación sobre un "Vórtex" durante 30 minutos. Al terminar la extracción, se filtró con papel filtro al vacío. La muestra se lavó sobre el papel con una pequeña porción de éter de petróleo, hasta que éste se observó completamente claro.

El filtrado se lavó con 30 mL de éter de petróleo en un embudo de separación agitando con fuerza para lograr separar los pigmentos en la fase etérea y colectar el agua y la acetona en la fase acuosa. Esto se realizó tres veces hasta que ambas fases quedaron lo más claras



posible; mientras, se fue colectando la fase etérea en otro embudo de separación al que se añadió 5 mL de agua destilada a fin de remover el resto de acetona, posteriormente se adicionó a dicha fase sulfato de sodio anhidro para remover los restos de agua. Se dejó así durante toda la noche y al día siguiente la fase etérea se filtró en un embudo de porcelana con papel filtro cubierto de sulfato de sodio anhidro al vacío. El filtrado se evaporó sequedad con un roto-evaporador a 40°C y 20 rpm, el residuo se diluyó con 5 mL de éter de petróleo.

3.2.13 Identificación y cuantificación de pigmentos en las microdietas

La identificación se realizó por medio de cromatografía en capa fina para separar los pigmentos carotenoides sobre placas de gel de sílice, donde se aplicaron aproximadamente 20 µL de extracto diluido en éter de petróleo. La elución de las muestras se realizó en una fase móvil que contenía éter de petróleo:acetona (85:15), en una cámara sobresaturada. La identificación se llevó a cabo empleando un estándar de astaxantina de Sigma para comparar el Rf de este pigmento con el Rf de los pigmentos obtenidos por medio de la extracción con éter de petróleo:acetona:agua. La cuantificación final se realizó en el espectrofotómetro a 470 nm, que es la longitud de onda para dicho pigmento en el disolvente empleado. El contenido de pigmento total se reportó como astaxantina según la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de astaxantina/g de dieta} = A D (10^5)/100 d G E^1, \%_{cm} \quad (3-6)$$

donde:

A = absorbancia a 470 nm

D = mL de disolvente empleado

G = gramos de dieta



d = ancho de celda (1 cm)

$E^1_{1,\%_{cm}}$ = coeficiente de extinción para astaxantina en éter de petróleo (2400)

3.2.14 Bioensayo con larvas de *Litopenaeus vannamei*

a) UNIDADES EXPERIMENTALES

Esta fase del experimento se realizó en la Universidad del Mar, UMAR, en el Laboratorio de Acuicultura, ubicado en Puerto Ángel, Oaxaca., México. El sistema representó una simplificación del "Larvatrón" descrito por Jackson y col. (1992). Se utilizaron 30 recipientes de vidrio de fondo esférico equipados con tubos de vidrio, los que proveyeron una suave aireación (2-3 burbujas de aire por segundo), con el objeto de mantener una circulación constante del agua y saturación de oxígeno disuelto. Las unidades experimentales (UE) se colocaron en un baño de agua termostáticamente controlado a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. El agua de cultivo es agua de mar que fue obtenida a una distancia de 8 km de la playa (Puerto Ángel, Oaxaca, México), doblemente filtrada con un filtro de cartucho de $5 \mu\text{m}$. Durante los experimentos no se realizaron recambios de agua (Jones y col., 1997; Medina-Reyna, 1998). Se manejó un fotoperíodo de 12:12 horas (luz-oscuridad). La intensidad luminosa durante el experimento se mantuvo a $4.7 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^2$ como condición de luz.

b) DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA CRÍA LARVARIA DE CAMARÓN

Se tomaron nauplios en estadio larval N_3 (camarón blanco, disponible gracias a la producción en el laboratorio de larvas de Industrias PECIS S.A. de C.V. de Sisal, Yucatán), fototácticamente activos del tanque de aclimatación (29°C) y se sembraron en las UE a una densidad de 150 nauplios por litro. Las UE se llenaron a 1.5 litros. La asignación de los



tratamientos y sus repeticiones se realizaron por quintuplicado aleatoriamente dentro del baño de agua.

Según el experimento, para la dieta 1, se inoculó un tratamiento con una dosis única inicial de microalgas vivas (DUIM) a una concentración de 50 cél. μL^{-1} y otro donde se proporcionó una dosis diaria de microalgas (DDM) a una concentración de 10 cél. μL^{-1} . El mismo procedimiento se siguió con la dieta 2. Los tratamientos denominados Testigo (dieta sin pigmento) para la dieta 1 y 2, se realizaron alimentando a las larvas con la formulación original de cada dieta sin incluir el pigmento carotenoide como ingrediente y empleando una dosis única inicial de microalgas (DUIM).

Los controles se mantuvieron con una alimentación diaria de microalgas completando 100 cél. μL^{-1} (Jones y col., 1997). Las DUIM, DDM y control se constituyeron con base a microalgas de *Chaetoceros muelleri* (microalga obtenida del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE), cuyo seguimiento se realizó empleando la técnica de conteo directo. La identificación de los estadios larvales se determinó mediante la inspección ocular de los matraces (Kitani, 1986). Se adicionaron 10 mL de solución de EDTA a 30 ppm a todas las UE como agente quelante; dichas determinaciones se realizaron diariamente (Castille y Lawrence, 1981; Treece y Fox, 1993).

Se pesaron 8 mg $\text{L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de microdietas experimentales hidratándose en agua de mar por 3 minutos y se proporcionaron a los organismos a las 8:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas. Cuando las larvas pasaron de N_3 al subestadio de Mysis, (M_1) o Postlarva, (PL_1) a los 6 días de cultivo, se suspendió el experimento determinando el número de sobrevivientes (S) de



cada réplica. Se tomaron aleatoriamente 10 ejemplares de cada UE y se les midió la longitud del caparazón (LC), excluyendo el rostro; previa fijación en formol al 4%. Se calculó el peso seco individual (PSI) por triplicado en muestras de 10-20 organismos de cada réplica secados a 60°C, por 36 horas; además, se determinó el índice de desarrollo larval mediante la fórmula $ID = A / \text{número total de larvas identificadas}$, donde A es el valor del estadio por el número de larvas en ese estadio. El valor del estadio aumenta conforme la larva muda de Zoea₁ (Z₁) a M₁ ó de Z₁ a PL₁ (Villegas y Kanazawa, 1979; Villegas y col., 1980). Adicionalmente, se estimó la tasa metamórfica (MR) como el porcentaje de M₁ o PL₁ presentes al fin del experimento en cada tratamiento. Para fines de comparación y con base en la hipótesis de Knowlton (1974), se calculó el índice de desempeño larvario (PLI_o) de cada tratamiento:

$$PLI_o = (PSI + LC) * (S + ID) \quad (3-7)$$

donde PLI_o es el índice de desempeño larvario; PSI es el peso seco individual (µg); LC es la longitud media del caparazón (mm); S es la sobrevivencia (%) y el ID es el índice de desarrollo larvario (Medina-Reyna y col., 2002). El tratamiento estadístico para el análisis de los resultados obtenidos del bioensayo con cada dieta experimental se realizó empleando un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 5% para determinar las diferencias significativas entre tratamientos y se utilizó la prueba de Duncan para la ponderación de las diferencias (Zar, 1984).

Con base en esta metodología experimental, en el siguiente capítulo se presentan los resultados obtenidos.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES

En las Tablas 4-1 y 4-2 se muestra la cantidad de pigmentos carotenoides extraídos del cefalotórax de camarón (harina desmineralizada) con aceite de soya como disolvente.

Tabla 4-1. Pigmentos carotenoides extraídos a partir de harina de cefalotórax de camarón con un tamaño de partícula menor a 0.150mm (μg de astaxantina/ g de aceite pigmentado)

PROPORCIÓN HARINA:ACEITE DE SOYA	*RÉPLICA I	*RÉPLICA II	*RÉPLICA III	PIGMENTO TOTAL OBTENIDO
(1:5)	210.4	206.4	205.2	207.3
(1:10)	285.9	285.3	286.7	286.0

(*) Pigmento total obtenido de 3 etapas de extracción

Tabla 4-2. Pigmentos carotenoides extraídos a partir de harina de cefalotórax de camarón con un tamaño de partícula entre 0.150 y 0.177mm (μg de astaxantina/ g de aceite pigmentado)

PROPORCIÓN HARINA:ACEITE DE SOYA	*RÉPLICA I	*RÉPLICA II	*RÉPLICA III	PIGMENTO TOTAL OBTENIDO
(1:5)	168.9	161.1	168.4	166.1
(1:10)	198.4	192.3	201.3	197.3

(*) Pigmento total obtenido de 3 etapas de extracción

En la Tabla 4-1 se observó que la cantidad de pigmentos carotenoides extraídos aumentó al disminuir el tamaño de partícula a un valor menor de 0.150 mm y utilizar una relación de harina de cefalotórax:aceite de soya de 1:10, ya que estas condiciones permitieron la extracción de un promedio de 286 μg de astaxantina/g de aceite pigmentado mientras que cuando se utilizó la relación 1:5, se obtuvo una menor cantidad de carotenos. Este comportamiento fue similar cuando se empleó un tamaño de partícula entre 0.150 y 0.177mm (Tabla 4-2) que, finalmente, no logró superar la cantidad obtenida con tamaños de



partícula menores. Como ya se ha mencionado en trabajos anteriores (Chen y Meyers, 1983; Cañipa, 1994; Cañipa y Durán-de-Bazúa, 1997; García-Gómez, 1997), hay un efecto positivo que sugiere la disminución del tamaño de partícula para realizar una extracción de pigmentos más efectiva y con un alto rendimiento empleando disolventes orgánicos, de acuerdo con lo que se enuncia en la Ley de Fick (a mayor área superficial, mayor transferencia de masa) lo cual según los resultados, se cumple también para la extracción con aceite de soya como se pudo comprobar con este experimento pues en trabajos anteriores (Jiménez y col., 2002) solo se manejó un tamaño de partícula menor a 0.150mm.

Para corroborar el efecto de las variables involucradas en este experimento, en la Tabla 4-3 se muestra el análisis de varianza de los resultados de la extracción de pigmentos carotenoides.

Tabla 4-3. Análisis de varianza (Adeva) de la extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya

FACTOR	G.L.	S.C.	M.C.	F. CAL.	F. CRIT.	EFFECTO SIGNIFICATIVO
TP	1	12 642.5	12 642.5	1053.5	$F_{1,8,0.05} = 5.32$	SÍ
HA	1	9 047.5	9 047.5	754	$F_{1,8,0.05} = 5.32$	SÍ
TP-HA	1	1 687.4	1 687.4	140.6	$F_{1,8,0.05} = 5.32$	SÍ
ϵ	8	96.5	12	N.p.	N.p.	N.p.

TP = Tamaño de partícula; HA = Proporción harina / aceite de soya; TP – HA = Interacción de los factores TP y HA; ϵ = Error experimental; g.l. = grados de libertad; S.C. = Suma de cuadrados; M.C. = mínimos cuadrados; F. Cal. = F calculada; F. Crit. = F crítica, N.p. = no procede



De acuerdo a los resultados, no solamente el tamaño de partícula fue determinante, sino que la proporción harina de cefalotórax:aceite de soya resultó significativa para obtener una alta concentración de pigmentos lo cual se puede explicar ya que al aumentar la cantidad de aceite, se favoreció la interacción de la capa oleosa con la harina seca que en presencia de calor, permitió que los pigmentos se liberaran de las proteínas pues se generó un rompimiento de enlaces caroteno-proteína. Con ello, se logró que los carotenoides se solubilizaran con más facilidad en el aceite pues estos xantófilos son tetraterpenos liposolubles. De acuerdo con lo anterior, las mejores condiciones de extracción con lípidos para obtener una cantidad de pigmentos carotenoides cercana a 300 ppm fueron las de un tamaño de partícula menor a 0.150 mm y de una proporción harina de cefalotórax:aceite de soya de 1:10.

Cabe destacar el hecho de que la harina empleada en esta investigación había pasado por un proceso de desmineralización, lo que también tuvo efecto en la cantidad de pigmento extraído durante los tratamientos experimentales ya que la humedad de la harina desmineralizada de acuerdo con lo reportado en los estudios de Jiménez y col. (2002) es mayor que en la harina entera (10.47% y 7.44% respectivamente). La presencia de agua parece ser un factor que puede impedir o disminuir la penetración del aceite en la harina, ya que los valores de extracción de pigmentos obtenidos en esta investigación y en los estudios de Jiménez y col. (2002), fueron menores que los alcanzados por Chen y Meyers (1982a), que fueron de 600 µg de astaxantina/g de aceite pigmentado y según el análisis de estos autores, la humedad es un factor importante que debe ser considerado para realizar la extracción de pigmentos aunque no determinan un valor definido o un intervalo de valores que indiquen cual es el porcentaje de humedad recomendado.



La humedad de la harina no se pudo controlar durante esta experimentación ya que el cefalotórax de camarón había pasado por un proceso de secado previo a la molienda y si se sometía a la harina nuevamente a un secado que asegurara una menor cantidad de humedad, después de desmineralizar, se corría el riesgo de degradar el pigmento.

Sin embargo, cabe mencionar que el rendimiento obtenido por Chen y Meyers (1982a), implicó el uso de una hidrólisis enzimática previa, pero hay que considerar el costo de esta primera operación de separación en el precio del pigmento recuperado con respecto al rendimiento; por lo que un estudio económico preliminar antes de su producción a nivel industrial debería tomar en cuenta esta operación.

Es importante reconocer el efecto protector del "Etoxiquin" como agente antioxidante de pigmentos y grasas en el periodo de extracción ya que sin él, los carotenoides (especialmente la astaxantina) serían rápidamente degradados durante el proceso térmico (Jiménez y col., 2002), lo que podría traer como consecuencia la incierta disponibilidad de los mismos al pretender aplicarlos en un sistema biológico. El disolvente con el que se llevó a cabo la extracción (aceite de soya) también ayudó a mantener la estabilidad del medio caroteno-lipídico por su alto contenido de tocoferoles lo que fomentó el retardo de la oxidación (Tramontano y col., 1992).

Considerando lo discutido anteriormente respecto a la extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya y tomando en cuenta las formulaciones de las dietas para larvicultura según el diseño de experimentos preliminares planteado en el capítulo anterior, como ingrediente lipídico en las dietas, se empleó el extracto oleoso pigmentado obtenido de un



tamaño de partícula entre 0.150 y 0.177mm y menores a 0.150mm con una proporción harina de cefalotórax:aceite de soya de (1:5) ya que fue importante mantener un balance lipídico adecuado en las dietas experimentales para evitar que el contenido de lípidos fuera mayor al que se recomienda para la cría larvaria de camarón blanco.

4.2 EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LAS DIETAS MICROENCAPSULADAS

En la Figura 4-1 (a) se puede ver que la apariencia de las microcápsulas en la dieta 1 es muy heterogénea ya que se apreciaron características variables principalmente en la distribución del tamaño de partícula y la topografía. La morfología resultó prácticamente esférica aunque es de notarse que algunas partículas adquirieron forma esférica con superficie lisa, mientras que en la mayoría pudo apreciarse una superficie irregular con presencia de indentaciones, lo que se atribuyó a las propiedades del material encapsulante y a los fenómenos inherentes a la deshidratación por el proceso empleado (Ré, 1998).

Ocasionalmente, se encontraron defectos representados fundamentalmente por agujeros, lo que indicó que la proporción del material encapsulante no fue suficiente para recubrir las partículas como en la Figura 4-1 (b) (Pedroza-Islas y col., 1999). En las microfotografías de las Figuras 4-1 (c) y (d) se observaron algunas de las cápsulas esféricas y con superficie lisa. Esto concuerda con lo reportado por Espinosa-Herrera (2002) para dietas microencapsuladas con pared de proteína-polisacárido, donde encontró que a medida que se incorpora una mayor cantidad de proteína concentrada de suero de leche en una mezcla con goma de mezquite, la superficie de las microcápsulas se vuelve más tersa y se observan menos agujeros.



Figura 4-1 (a). Microestructura externa de la dieta 1



Figura 4-1 (b). Microestructura externa de la dieta 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN

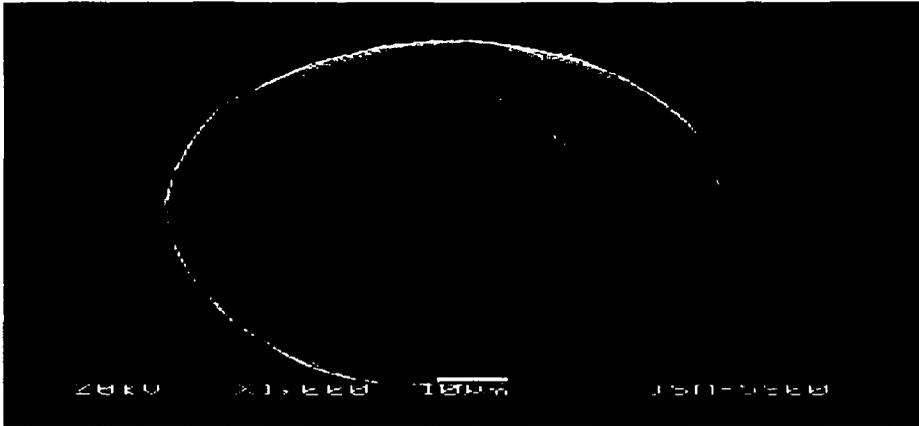


Figura 4-1 (c). Microestructura externa de la dieta 1

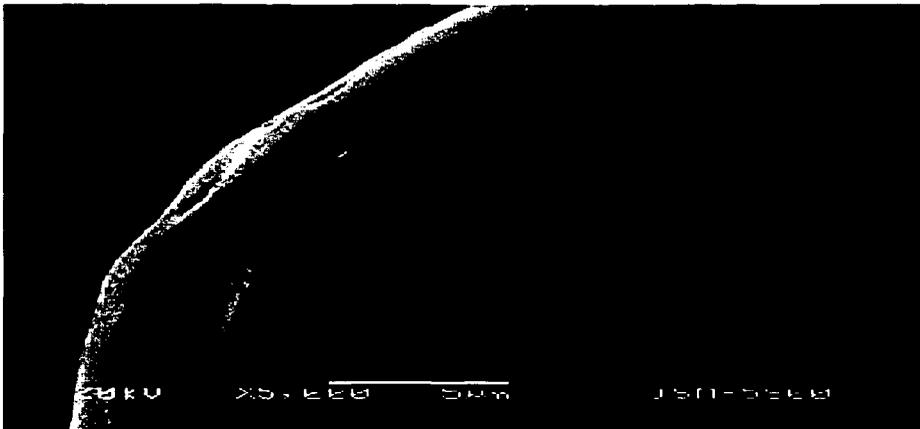


Figura 4-1 (d). Microestructura externa de la dieta 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La microestructura interna de las microcápsulas que se muestran en las Figuras 4-2 (a), (b) y (c) exhibe que la distribución de la grasa en las paredes de la microcápsula fue heterogénea, sugiriendo una inestabilidad de la emulsión durante el proceso de secado. Cabe recordar que en esta formulación el contenido de lípidos fue considerable (23.6%) y, aunque se incluyó lecitina, la proporción de la misma tampoco fue suficiente para lograr una buena estabilidad de la emulsión.

La presencia de gotas de grasa grandes junto con gotas menores, indica algún grado de coalescencia entre las mismas. Espinosa-Herrera (2002) encontró el mismo tipo de comportamiento para productos microencapsulados con suero de leche donde la proporción encapsulante:encapsulado fue de 1:1. También demostró el mismo efecto cuando utilizó un concentrado de proteínas de suero de leche con un 34% de proteínas.



Figura 4-2 (a). Microestructura interna de la dieta 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4-2 (b). Microestructura interna de la dieta 1



Figura 4-2 (c). Microestructura interna de la dieta 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En las Figuras 4-3 (a) y (b) se muestran las microcápsulas correspondientes a la dieta 2. Aquí se pudo observar que éstas tienden a ser más esféricas, con tamaños de partícula más regulares y con superficie lisa, aunque también se presentaron partículas de superficie dentada y arrugada como en la Figura 4-3 (c). En este caso, los agentes encapsulantes fueron una mezcla de polisacáridos en una proporción de 3:1 con respecto a la dieta (66% de goma arábica, 17% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE). Tanto la goma arábica como la de mezquite presentan propiedades emulsificantes y estabilizantes de sistemas de aceite en agua (Islam y col., 1997; Vernon-Carter y col., 1998) y ello, aunado a una alta proporción en la mezcla con la dieta, produjo un sistema más estable lo que se reflejó en la microestructura de las microcápsulas obtenidas. Se ha reportado en diversos estudios que la goma arábica tiene una excelente capacidad emulsificante y encapsulante, lo que se relaciona con su alto peso molecular y la presencia de una fracción proteínica (2-4%) que interactúa en la interfase para favorecer la formación de multicapas, con lo que se incrementa su capacidad de estabilizar las emulsiones. Este efecto se ve aumentado con la presencia de la goma de mezquite que presenta características similares tomando en cuenta que se ha sugerido que esta goma tiene un mayor porcentaje de proteína respecto a la goma arábica (Vernon-Carter y col., 1998). La maltodextrina, cuyo peso molecular es mucho menor que el de las gomas (1800 g/mol) colabora en la estructura, sin embargo, no posee capacidad emulsificante (Kenyon y Anderson, 1988), así que la estabilidad del sistema aceite en agua puede atribuirse principalmente a las gomas. En las Figuras 4-4 (a) a la (c) se presenta la microestructura interna de estas microcápsulas que presentaron una superficie lisa, compacta, con los glóbulos de grasa de tamaño diminuto y distribuidos uniformemente. Este tipo de pared presentó mayor eficiencia de encapsulación de grasas (Pedroza-Islas, 2000).

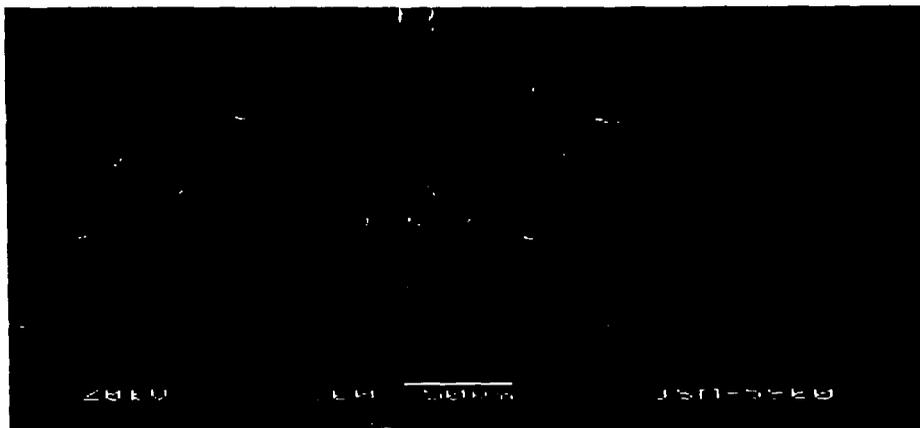


Figura 4-3 (a). Microestructura externa de la dieta 2

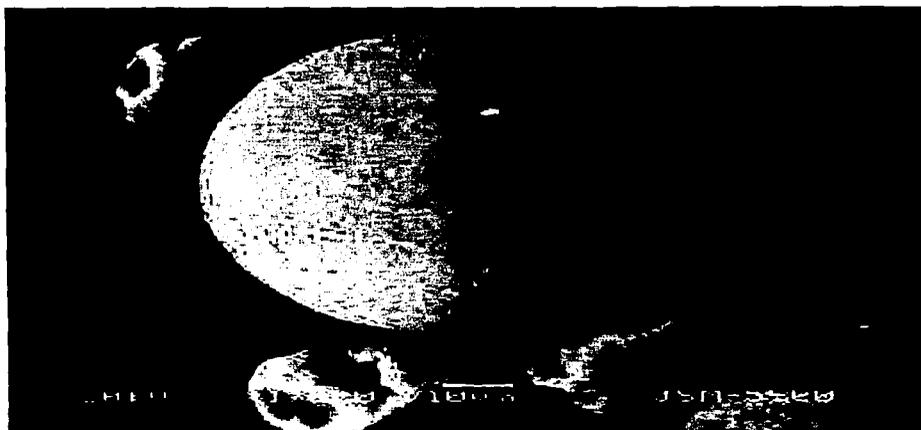


Figura 4-3 (b). Microestructura externa de la dieta 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4-3 (c). Microestructura externa de la dieta 2

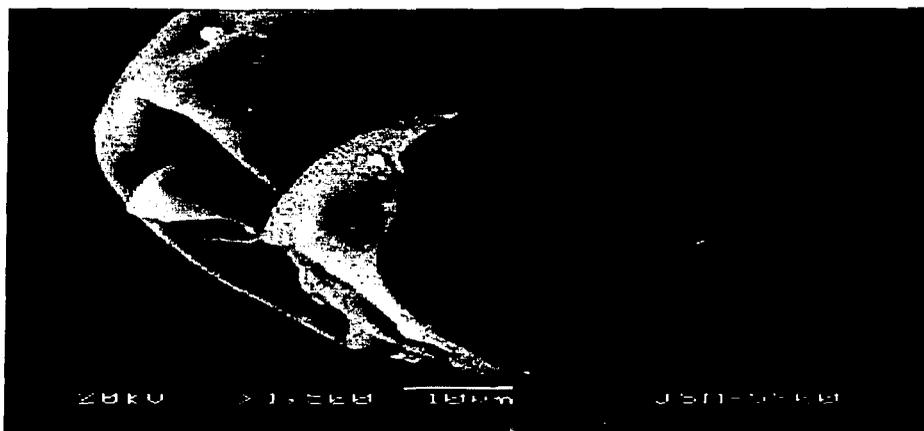


Figura 4-4 (a). Microestructura interna de la dieta 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4-4 (b). Microestructura interna de la dieta 2



Figura 4-4 (c). Microestructura interna de la dieta 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



4.3 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LAS DIETAS MICROENCAPSULADAS

En las Figuras 4-5 y 4-6 se presentan las curvas de flujo de calor en miliwatios (mW) en función de la temperatura (°C) obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para calcular los parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius de descomposición termo-oxidativa de las dietas microencapsuladas experimentales en presencia de calor y con un flujo constante de aire.

Puede observarse que ambas curvas comienzan su registro a partir de 150°C. En estudios anteriores, se determinó que tanto la goma arábica como la goma de mezquite funden a temperaturas entre 130 y 150°C (Pedroza-Islas, 2000), entonces el registro de los termogramas presentados en las Figuras 4-5 y 4-6 comienza a partir de que el material que está cubriendo a los ingredientes de la dieta se ha fundido y presumiblemente ha dejado libre a los lípidos contenidos en las dietas así como a otros ingredientes.

A partir de los 200°C comienzan las reacciones de oxidación que en las gráficas se observan como una respuesta de transición típica exotérmica de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (Torres, 1997). Se puede observar que la dieta 1, elaborada con una mezcla de goma de mezquite y suero de leche, tuvo una temperatura de "onset" (inicial) de 255°C y una de pico de 336°C, mientras que para la dieta 2, elaborada con goma arábica-goma de mezquite y maltodextrina, la temperatura de "onset" fue de 260°C y la de pico, de 326°C.

Es de notar que en ambas dietas, las temperaturas máximas de las exotermas fueron superiores a 300°C sobre todo porque se ha informado que para otro tipo de encapsulantes

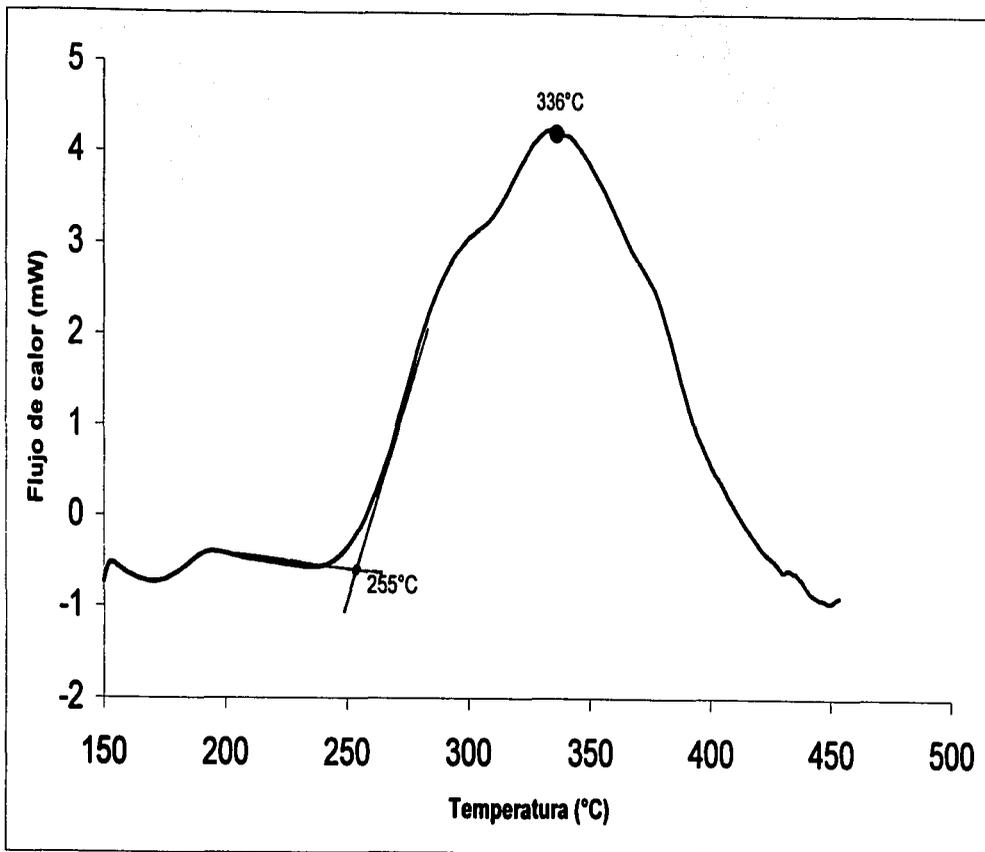


Figura 4-5. Curva de flujo de calor para microcápsulas elaboradas con goma de mezquite:suero de leche (dieta 1)



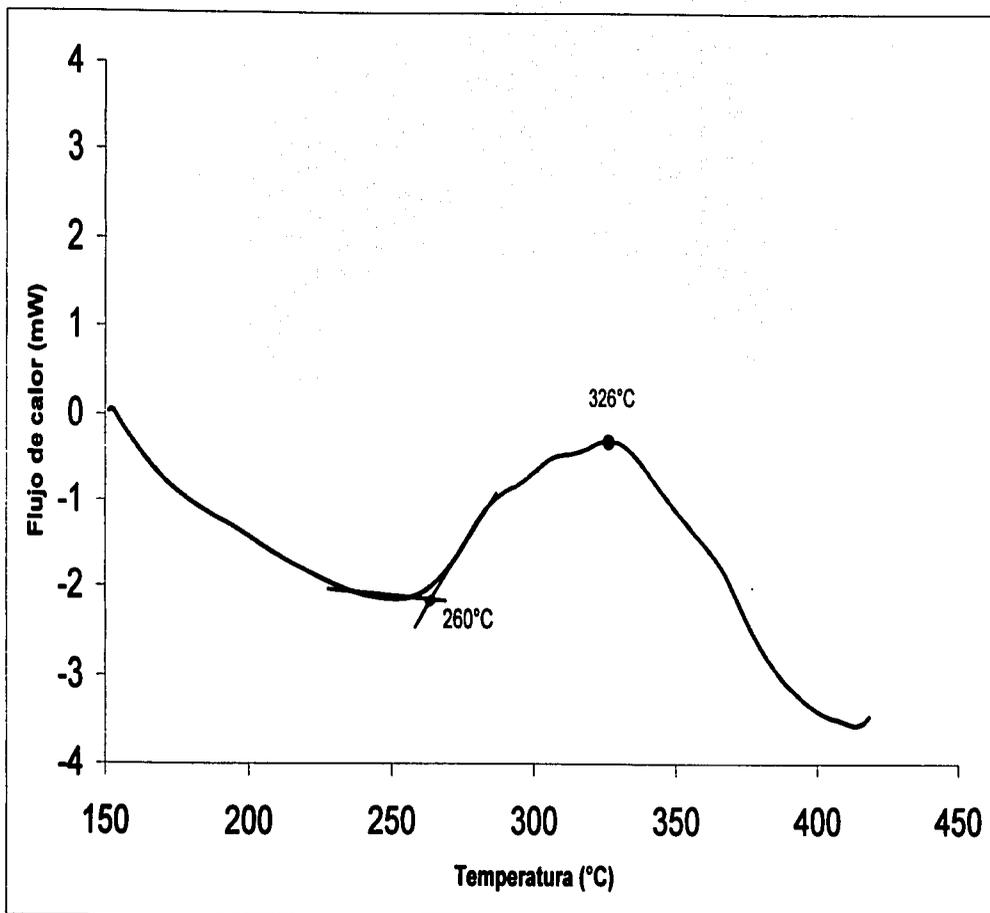


Figura 4-6. Curva de flujo de calor para microcápsulas elaboradas con goma arábica:goma de mezquite:maltodextrina (dieta 2)





hidrofílicos (albúmina de huevo, caseinatos, gelatina, etc), las temperaturas máximas, se encuentran cercanas a los 200°C, determinadas también por DSC (Espinosa-Herrera, 2002). Dado lo anterior, podría considerarse que se logró una mejor estabilidad utilizando como encapsulantes las combinaciones propuestas entre la goma arábiga:goma de mezquite:maltodextrina y la goma de mezquite:suero de leche.

A partir de los datos obtenidos en los termogramas, se calcularon las constantes cinéticas de las reacciones de oxidación que se presentan en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4. Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de DSC para las microcápsulas de las dietas 1 y 2

TRATAMIENTO	E_A (kJmol ⁻¹)	K_0 (min)	K (min ⁻¹)
Dieta 1 (goma de mezquite:suero de leche)	61.34	5.84×10^2	1.04×10^{-8}
Dieta 2 (goma arábiga: goma de mezquite:maltodextrina)	84.81	11.02×10^4	1.52×10^{-10}

E_a = energía de activación, K_0 = factor preexponencial de Arrhenius, K = velocidad de reacción

De acuerdo a los valores de energía de activación se puede observar que la dieta 2 tuvo una mayor resistencia a la degradación termo-oxidativa, además de que el tiempo de vida media calculado a temperatura ambiente fue de más de 8.5 años, mientras que el de la dieta 1 es de 1.2 años.

4.4. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS DIETAS MICROENCAPSULADAS

En la Tabla 4-5 se muestra la composición proximal y aporte calórico de las dietas empleadas en este estudio. El contenido lipídico de las dietas fue un factor importante durante las pruebas de estabilidad, influyendo de manera directa sobre la estabilidad térmica-oxidativa; el resto de las fracciones no variaron mucho en cuanto a porcentaje, los



hidratos de carbono aumentaron en la dieta 2 como resultado de la cantidad de gomas usadas como encapsulantes siendo mayor esta fracción que la de lípidos y proteínas. La inclusión de proteína concentrada de suero de leche en la dieta 1 incrementó el contenido proteínico de las microcápsulas.

Tabla 4-5. Composición proximal y contenido energético de las dietas 1, 2 y de las dietas testigo (sin pigmento)

DIETA	LÍPIDOS(%) (EXTRACTO ETÉREO)	PROTEÍNA(%) (N X 66.25)	HIDRATOS DE CARBONO(%) (POR DIFERENCIA)	FIBRA CRUDA(%)	CENIZAS(%)	APORTE CALÓRICO (kcal/100g)
1	16.79	24.57	52.12	0.68	2.81	457.87
1 testigo	14.07	24.61	57.82	0.50	3.00	456.35
2	3.10	18.53	70.81	0.99	3.57	385.26
2 testigo	3.25	18.85	73.57	1.00	3.33	398.93

4.5 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES A PARTIR DE LA DIETAS MICROENCAPSULADAS EMPLEANDO EL SISTEMA ÉTER DE PETRÓLEO, ACETONA Y AGUA

Las dietas 1 y 2 se sometieron a una determinación de pigmentos carotenoides por medio de un sistema de extracción con éter de petróleo:acetona:agua, además se identificaron los pigmentos carotenoides sobre una cromatoplaque de gel de sílice y éstos se cuantificaron con base a la astaxantina como el principal carotenoide activo en la dieta. Los resultados se muestran en las Tablas 4-6 y 4-7.

Tabla 4-6. Identificación de pigmentos carotenoides por medio de cromatografía en capa fina

MUESTRA	Rf DE LA MUESTRA	COMPUESTO IDENTIFICADO
Astaxantina de Sigma	0.2	
Dieta 1	0.18	Astaxantina
Dieta 2	0.18	Astaxantina



En la Tabla 4-6 se muestra que el pigmento obtenido de ambas dietas disuelto en éter de petróleo eluyó a un Rf muy similar al del estándar de astaxantina de Sigma; además, no se encontraron otras señales sobre la cromatoplaque lo cual indicó que la extracción de pigmentos y la etapa de microencapsulación fueron satisfactorias pues no se determinaron otro tipo de carotenoides que se derivaran de la forma oxidada de la astaxantina.

Tabla 4-7. Cuantificación de astaxantina en las dietas 1 y 2 por medio de espectrofotometría (μg de astaxantina / g de dieta)

MUESTRA	RÉPLICA I	RÉPLICA II	RÉPLICA III	TOTAL*
Dieta 1	36.4	36.9	36.6	36.6 \pm 0.2
Dieta 2	14.5	14.7	14.4	14.5 \pm 0.1

(*) Valores promedio \pm desviación estándar

Una vez que se determinó la presencia de astaxantina en el extracto etéreo se realizó una cuantificación de pigmento donde, según los datos de la Tabla 4-7, se obtuvo un promedio de 36.6 ppm de astaxantina en la dieta 1 y 14.5 ppm para la dieta 2. La diferencia entre el contenido de pigmento identificado respecto a lo que se adicionó a cada dieta, se puede explicar por el error experimental que se presenta durante el proceso de extracción pues el análisis de cromatografía en capa fina descartó la posibilidad de que parte del pigmento hubiera pasado a una forma oxidada del mismo. La presencia de carotenoides (astaxantina) en la dieta asegura su efecto en la actividad biológica de las larvas de camarón blanco.

4.6 EVALUACIÓN BIOLÓGICA CON LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* Bioensayo con la dieta 1

En la Tabla 4-8 se presentan los resultados del bioensayo preliminar que se realizó con larvas de *Litopenaeus vannamei* empleando la dieta 1.



Tabla 4-8. Resultados de la evaluación biológica alimentando con la dieta 1

TRATAMIENTO	PSI (μ g)	S (%)	LC (mm)	ID	MR (%)	PLI _c
Control	38.00 ^{±22.3} a	72.80 ^{±8} b	0.711 ^{±0.03} a	4.34 ^{±0.2} a	97.87 ^{±10.9} a	1.00 a
Dieta 1 testigo (sin pigmento)	19.16 ^{±22.0} d	79.00 ^{±0.03} c	0.690 ^{±0.01} a	3.56 ^{±0.1} b	56.93 ^{±8.13} d	0.89 b
Dieta 1 + DUIM	27.78 ^{±1.9} b	71.11 ^{±4} a	0.640 ^{±0.03} b	3.31 ^{±0.3} bc	38.30 ^{±7.5} c	0.96 a
Dieta 1 + DDM	23.67 ^{±22.4} c	41.60 ^{±8} b	0.610 ^{±0.02} b	3.63 ^{±0.1} b	63.24 ^{±10.2} b	0.92 b

PSI = peso seco individual, S = sobrevivencia, LC = longitud del caparazón, ID = índice de desarrollo, MR = tasa metamórfica, PLI_c = Índice de desempeño larvario DUIM = dosis única inicial de microalgas, DDM = dosis diaria de microalgas. Los valores en la parte superior con el símbolo \pm indican la desviación estándar de los datos obtenidos. Las letras a,b,c,d se utilizan para mostrar las diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0.05$

En los indicadores de desarrollo larvario respecto a la dieta 1 se muestra que el tratamiento "dieta 1 + DUIM" obtuvo un valor en el índice de desempeño larvario (PLI_c) de 0.96 y no presentó diferencia estadística significativa respecto al valor obtenido por el control mientras que "dieta 1 + DDM" mostró un valor de 0.92 y si presentó diferencia con relación al control, no así, con el valor del tratamiento "dieta 1 testigo" que fue ligeramente bajo comparado con el resto de los tratamientos.

Se debe hacer énfasis que el tratamiento "dieta 1 + DUIM" aumentó el porcentaje de sobrevivencia de las larvas (S), obteniéndose un valor de 71.11% que no presentó diferencia estadística con relación al valor obtenido por el control; únicamente en este caso, el tratamiento "dieta 1 testigo" mostró un valor mayor que el control y fue estadísticamente diferente a éste y al resto de los tratamientos.

En el peso seco individual (PSI) se observó que todos los tratamientos mostraron valores significativamente diferentes entre sí y superados numéricamente por el control con quien presentaron diferencia estadística.



El crecimiento de las larvas de camarón, evaluado como la longitud del caparazón (LC), indicó que a pesar de que fue mayor el crecimiento obtenido por el control, en este caso, no hubo diferencia estadística significativa entre éste y el tratamiento "dieta 1 testigo". Los tratamientos "dieta 1 + DUIM" y "dieta 1 + DDM" no mostraron diferencia significativa entre ellos pero si la hubo en relación al resto de los tratamientos. En el índice de desarrollo (ID) el valor del control fue mayor y presentó diferencia estadística respecto al resto de los tratamientos. Por último, los valores mostrados en la tasa metamórfica (MR) indicaron que el control tuvo el resultado más alto y entre todos los tratamientos hubo diferencia estadística.

Referente a la dieta 1 (75% suero de leche y 25% goma de mezquite como material formador de pared), el tratamiento "dieta 1 testigo" sugería buenos resultados en cuanto a biodisponibilidad y aporte nutrimental acorde con lo estudiado por Espinosa-Herrera (2002) y Hernández-Rojas (2002), pues la inclusión de suero de leche con 80% de proteína aumenta la porción proteínica de la dieta al mismo tiempo que otorga mejores características durante el proceso de microencapsulación.

El aporte energético de 19.23kJ/g (457.87kcal/100g) que presentó la dieta 1 experimental fue similar al de la "dieta 1 testigo" que tuvo un valor de 19.16kJ/g y ambos tratamientos obtuvieron un valor cercano a 20kJ/g, que es el valor que se recomienda en los estudios realizados por Cruz-Terán(2000) para poder contar con la energía necesaria para la cría larvaria de camarón. No obstante lo anterior, los resultados obtenidos reflejan que cuando se adicionó a la fórmula el extracto oleoso pigmentado, se mejoró notablemente el índice de desempeño larvario. Ello demuestra el efecto benéfico de los pigmentos carotenoides en la alimentación para larvicultura lo cual es aún más evidente si se considera que el contenido



proteínico de la dieta 1 fue de 24.57% y 24.61% para la "dieta 1 testigo", valores ligeramente bajos en comparación con lo que recomienda Jones (1998) para una dieta artificial que es un 55% de proteína. Esto sugiere que en posteriores experimentos, se puede incluir una mayor cantidad de suero de leche incrementando el valor nutrimental de la dieta.

Sin embargo, el índice de desempeño larvario (PLI_c), indicador que engloba a todos los parámetros de desarrollo y crecimiento, mostró que el tratamiento "dieta 1+ DUIM" fue estadísticamente igual al tratamiento control, lo que indica que esta dieta conteniendo al extracto oleoso pigmentado, es potencialmente exitosa para la alimentación de las larvas del camarón blanco, requiriendo exclusivamente una dosis única inicial de microalgas.

Bioensayo con la dieta 2

En la Tabla 4-9 se observan los resultados referentes a la dieta 2 (66% de goma arábica, 17% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE como agentes encapsulantes), donde destaca el tratamiento "dieta 2 + DUIM" en el porcentaje de sobrevivencia (S) pues el resultado fue mayor que en el control y estadísticamente diferente de todos los tratamientos.

Tabla 4-9. Resultados de la evaluación biológica alimentado con la dieta 2

TRATAMIENTO	PSI (µg)	S (%)	LC (mm)	ID	MR (%)	PLI _c
Control	38.00 ^{±2.3} a	72.80 ^{±8} a	0.711 ^{±0.03} a	4.34 ^{±0.2} a	97.87 ^{±10.6} a	1.00 a
Dieta 2 testigo (sin pigmento)	12.50 ^{±1.4} d	45.20 ^{±5} d	0.220 ^{±0.02} c	4.45 ^{±0.1} a	ND	0.83 c
Dieta 2 + DUIM	29.00 ^{±2.6} b	81.20 ^{±7} b	0.623 ^{±0.03} b	3.71 ^{±0.2} b	71.31 ^{±8.7} b	0.97 a
Dieta 2 + DDM	23.33 ^{±2.7} c	55.33 ^{±1} c	0.587 ^{±0.01} b	3.15 ^{±0.1} c	19.57 ^{±8.6} c	0.92 b

PSI = peso seco individual, S = sobrevivencia, LC = longitud del caparazón, ID = índice de desarrollo, MR = tasa metamórfica, PLI_c = índice de desempeño larvario DUIM = dosis única inicial de microalgas, DDM = dosis diaria de microalgas, ND = no determinado. Los valores en la parte superior con el símbolo ± indican la desviación estándar de los datos obtenidos. Las letras a,b,c,d se utilizan para mostrar las diferencias significativas entre los tratamientos a p<0.05



El mayor valor en el peso seco individual (PSI) lo obtuvo el tratamiento control siendo éste y el resto de los tratamientos significativamente diferentes. La longitud del caparazón (LC) varió en todos los tratamientos siendo mayor en el control y entre "dieta 2 + DIUM" y "dieta 2 + DDM" no hubo diferencia estadística.

El índice de desarrollo (ID) de las larvas de camarón fluctuó entre 3.15 y 4.34. El valor mayor se obtuvo con el control el cual fue estadísticamente igual que el valor de "dieta 2 testigo". La tasa metamórfica (MR) de las larvas presentó su valor más alto con el tratamiento control (97.87%), siendo significativamente diferente a los demás tratamientos. El índice de desempeño larvario (PLI_c), que finalmente es el factor que indica cuál es el rendimiento real de las dietas para larvas de camarón, varió de 0.83 hasta 1.00 valor obtenido por el control, el cual sólo fue igual estadísticamente que el tratamiento "dieta 2 + DUIM" y diferente significativamente al resto de los tratamientos.

El tratamiento "dieta 2 testigo" no era promisorio en cuanto a su perfil nutrimental para un ensayo biológico con larvas de camarón según los resultados de Pedroza-Islas (2000); y tampoco lo fue de acuerdo a los resultados de índice de desempeño larvario (PLI_c) obtenidos en esta investigación.

En la dieta 2 experimental, el aporte energético de 16.18 kJ/g (385.26 kcal/100g) fue muy cercano a 16.75kJ/g obtenido por "dieta 2 testigo", sin embargo, los dos valores resultaron ligeramente menores a 20kJ/g que es lo que recomienda Cruz-Terán(2000). Por otro lado, el 70.81% de hidratos de carbono de la dieta 2 y el 73.57% de la "dieta 2 testigo", como



resultado de la cantidad de gomas empleadas para formar la pared de las cápsulas, fue muy alto; lo que dificulta la digestión y asimilación de los nutrimentos. Al mismo tiempo, en el análisis proximal de la dieta 2 se observó que la fracción proteínica (18.53%) fue mayor a la fracción lipídica (3.1%) y que, ambas, están muy por debajo del nivel óptimo recomendado por Jones (1998), respecto al porcentaje de proteína y Jacinto-Nolasco (2002) que recomienda un 11.5% de lípidos para la formulación de dietas para larvas de camarón. Lo anterior también se cumplió para la "dieta 2 testigo" cuyos valores fueron muy similares a los de la dieta 2 experimental.

A pesar del gran desequilibrio en el perfil nutrimental que presentó la dieta 2 al igual que la "dieta 2 testigo"; el buen desempeño larvario que mostraron los tratamientos "dieta 2 + DUIM" y "dieta 2 + DDM" se podría atribuir a la presencia de pigmentos carotenoides (astaxantina), ya que se ha probado que principalmente la falta de lípidos ocasiona un crecimiento deficiente de las larvas de camarón (Jones y col., 1997). Finalmente, con este resultado, podría considerarse que el efecto de los pigmentos carotenoides extraídos sobre la actividad biológica de las larvas de camarón parece ser promisorio.

Los resultados satisfactorios que se obtuvieron con ambas dietas, tuvieron en común, además de la presencia del aceite de soya pigmentado, la inclusión de una dosis única inicial de microalgas (DUIM), en el primer día de cultivo, lo cual induce la producción enzimática necesaria para la asimilación de las dietas artificiales (Sangha y col., 2000; Hernández-Rojas, 2002).



El hecho de que ambas dietas hayan superado los valores obtenidos por los tratamientos testigo (sin pigmento), en cuanto a parámetros de desarrollo larvario y se igualaran al tratamiento control (PLI₀), utilizando una dosis única inicial de microalgas, revela que se ha alcanzado un posible logro tecnológico y económico para larvicultura. Aunque es claro que estas pruebas *in vivo* son preliminares y que requieren de más experimentos de escalamiento, sus resultados indican que se camina por la vía correcta para emplear la astaxantina extraída de las harinas de cefalotórax de camarón.

Con base en estos resultados, en el siguiente capítulo se presentan las conclusiones y recomendaciones derivadas de ellos.



CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Considerando los objetivos de esta investigación, se comprobó que empleando aceite de soya como disolvente durante la extracción de pigmentos carotenoides, variando las condiciones de extracción, se logra obtener una mayor cantidad de pigmento.
2. Con respecto al uso de la microencapsulación realizada por medio de la técnica de secado por aspersión, se logró estabilizar el extracto oleoso de pigmentos carotenoides el tiempo suficiente para llevar a cabo las pruebas preliminares *in vivo*.
3. La morfología y estructura interna de las microcápsulas se vieron afectadas por el tipo de material encapsulante y la proporción encapsulante:dieta. Esto refuerza la necesidad de que en estudios posteriores se logren optimar estas variables para obtener cápsulas adecuadas.
4. El uso de una mezcla de goma de mezquite y arábica y maltodextrina en las dietas favoreció la formación de microcápsulas de una distribución de tamaño más uniforme, con una superficie más lisa y con menos defectos, además de que aumentó la estabilidad de la emulsión del aceite pigmentado en agua, durante el secado.
5. La estabilidad térmica-oxidativa de los ingredientes de la dieta donde se utilizó una combinación de 66% de goma arábica, 17% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE como encapsulantes fue más eficiente que en la dieta donde se empleó como pared 75% de goma de mezquite y 25% de suero de leche.



6. Con respecto a los estudios preliminares *in vivo* sobre el efecto de los pigmentos carotenoides (astaxantina) extraídos con aceite de soya en la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*, su adición como ingrediente de dietas para el cultivo de camarón mejoró el índice de desempeño larvario (PLI₀). Estos resultados son alentadores y permiten continuar con estas pruebas en trabajos posteriores que definan las mejores condiciones de operación en la obtención de los ingredientes de las dietas y la evaluación de ellas.

Esto indica que todas las expectativas planteadas se cumplieron. Como recomendaciones a partir de los resultados obtenidos en esta investigación se pueden plantear las siguientes:

A) Mejorar la eficiencia de extracción de pigmentos carotenoides realizando una hidrólisis enzimática previa a la extracción con el aceite, empleando para tan fin una proteasa comercial. Esta operación previa debe plantearse realizando un estudio técnico-económico de factibilidad a nivel industrial para verificar la bondad de esta operación unitaria adicional considerando el costo del pigmento recuperado.

B) Se debe considerar que el porcentaje de lípidos en las dietas para larvas de camarón es limitado debido al balance nutrimental, por lo que se sugiere la realización estudios posteriores encaminados a que durante la extracción se logren concentrar los pigmentos carotenoides en una menor cantidad de aceite.

C) Utilizar otros componentes para la microencapsulación, como los propuestos por Espinosa-Herrera (2002), con una mayor proporción de suero de leche en la mezcla goma de mezquite:suero de leche para mejorar la estabilidad de las microcápsulas e incrementar el aporte nutrimental en su aplicación para dietas.



BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Handbook. (1975). Composition of foods. U.S. Dept. of Agriculture, 8. Washington, D.C. EEUUA.
- AOAC. (1996). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Horwitz, W. Ed. Washington, D.C. EEUUA.
- Arango, J. I. (1998). Resumen de la evaluación sobre la utilización de astaxantina en nutrición de camarones. Avances de Nutrición Acuícola III, pp. 423-443.
- ASTM E698 -79 (2001). Standard Test Method for Arrhenius Kinetic Constants for Thermally Unstable Materials Annual Book of ASTM International. West Conshohocken, EEUUA.
- Baduí, S. (1996). Química de los alimentos. 3ª Ed. Alhambra Mexicana México D.F., pp. 108-265.
- Benita, S. (1996). Microencapsulation. Methods and industrial applications. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EEUUA.
- Beristáin G.C. (1996). Estudio de las propiedades termodinámicas de microencapsulados por hidrocoloides naturales obtenidos por secado por aspersión y de la relación con su estabilidad. Tesis de Doctorado. UAM. México D.F. México.
- Bottomey, R.C., M.T.A. Evans y C.J. Parkinson. (1990). Whey proteins. In food gels. Ed. Elsevier, Havre. Peter. Reino Unido, p. 435.
- Cañipa, A. J. (1994). Estudio químico sobre el aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Tesis de Maestría. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.
- Cañipa, A.J. y Durán-de-Bazúa, C. (1997). Reaprovechamiento del cefalotórax de camarón, un proyecto exitoso. Industria Alimentaria, 19(3):10-17.
- Castille, F. L. y Lawrence, A.L. (1981). The effects of EDTA on the survival and development of shrimp nauplii (*P. stylirostris* Stimpson) and the interactions of EDTA with the toxicities of cadmium, calcium and phenol. J. World Maricult. Soc., 12(2): 292-304.
- Ceccaldi. H.J. (1987). La digestión en los crustáceos. Nutrición en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura. Industrias gráficas, España., pp. 35-36.
- Cruz-Terán, E. M. (2000). Efecto de la fuente de lípidos dietarios en la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. UMAR. Puerto Angel, Oaxaca. México.
- Chapa-Saldaña, H. (1987). La biología y el cultivo de camarones (ensayo de información bibliográfica). Dirección General de Ciencia y Tecnología del Mar, Centro de Experimentación para el Desarrollo de la Formación Tecnológica. Septiembre, pp. 20-48.



- Charley, H. (1987). *Tecnología de alimentos*. Limusa, México D.F. México., p. 603.
- Chen, H.M. y Meyers, S. P. (1982a). Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *J. Food Sci.*, 47:892-896.
- Chen, H.M. y Meyers, S. P. (1982b). Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. *J. Agric. Food Chem.*, 30:469-473.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. (1983). Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *J. Food Sci.*, 48(15):16-15.
- Chen, A.C., Veiga, M.F., Rizzuto, A.B. (1988). Cocrystallization: An encapsulation process. *Food Technology*, November, pp. 87-89.
- Chih-Cheng, L., Shan-Yang, L. y Sun Hwang, L. (1995). Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *J. Food Sci.* 60(1):36-39.
- Choubert, G. y Luquet, P. (1983). Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri rich.*) pigmentation. Influence of fat content of the diet. *Aquaculture*, 32:19-26.
- Desobry, S. A., Netto, F.M. y Labuza, T.P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J. Food Sci.*, 62(6):1158-1162.
- Desrosier, N. (1986). *Elementos de tecnología de alimentos*. CECSA, México D.F., pp. 412-414.
- Dore, Y. y Frimodt, C. (1987). *An illustrated guide to shrimp of the world*. Pub. Van Nostrand Reinhold., Nueva York, EEUUA, pp. 19-42.
- Dziezak, J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.* pp.136-151.
- Espinosa-Herrera N. L. (2002). *Elaboración y caracterización de microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) como alimento para acuicultura*. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México, D.F. México.
- Fang, J.T. y Chiou, Y-T. (1996). Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J. Ind. Microbiol.*, 16:179-181.
- Fang, T. y Cheng, Y.S. (1993). Improvement of astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferm. Bioeng.*, 75(6):466-469.
- Fennema, R. (1993). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 643-654.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. y Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with cantaxanthin. *Aquaculture*, 41: 213-226.



- García-Gómez, R.S. (1997). Extracción enzimática de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón empleando una proteasa comercial. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México, D.F. México.
- Gaxiola, G. (1991). Requerimientos nutricionales en postlarvas de *P. schmitti*: Relaciones proteína/energía y proteína animal/vegetal. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. Centro de Investigaciones Marinas. Cuba.
- Graves, R.E. (1972). Uses for microencapsulation in food additives. *Cereal Sci. Today*, 17:107-109.
- Hernández-Rojas, F. (2002). Evaluación biológica de las microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) para larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura UMAR. Puerto Ángel, Oaxaca, México.
- IIBB. (1995). Comunicación personal. UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas Básicas. Departamento de Biotecnología (Unidad de aminoácidos). México D.F. México.
- Islam, A.M., Phillips, G.O., Slijivo, A., Snowden, M.J. y Williams, P.A. A (1997). Review of recent development on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food Hydrocoll.* 11: 493-505.
- Jacinto-Nolasco, P. (2002). Evaluación del orbital de barrilete negro (*Euthynnus lineatus*) en el cultivo zoeario del camarón blanco. Tesis de Ingeniería en Acuicultura. UMAR. Puerto Ángel, Oaxaca. México.
- Jackson, C. J., Pendrey R.C. y Rothlisberg, P.C. (1992). The Larvatron: A computer-controlled apparatus for rearing planktonic animals under experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86: 189-199.
- Jiménez, E. M., Luna, A. y Ramírez, M.A. (2002). Extracción de pigmentos carotenoides a partir del cefalotórax de camarón y su aplicación como ingrediente de dietas para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Proyecto ganador en la categoría de Medio Ambiente dentro del Certamen Nacional Juvenil de Ciencia y Tecnología (Instituto Mexicano de la Juventud) México, D.F., México.
- Johnson, E. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11(4): 247-326.
- Jones, D.A, Holland, D.L. y Jaborrie, S. (1984). Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30(2): 275-288.
- Jones D.A., Bridson, M., Freeman, J., Latchford, C.A., Martinez-Palacios, N., Misciatelli, F. A. L: T., Riveiro, S., Sirvas-Rowlands y Simoes, S. (1997). Progress in the use of artificial feeds in penaeid larval culture. *Proc. of the 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conf. y Third Asia-Pacific Conf. on Algal Biotechnology.* Phuket, Thailand. p. 107.
- Jones, D.A. (1998). Crustacean larval microparticulate diets. *Rev. In fish. Sci.* 6(1-2):41-45.



- Kelley, C.E. y Harmon, A.W. (1972). Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fish. Bull.*, 70(1): 111-113.
- Kenyon, M. y Anderson, R. (1988). Maltodextrin and low-dextrose equivalent corn syrup solid: Production and technology for the flavor industry. In: *Flavor encapsulation* (ed. S. Rish and G. Reineccius), Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, D.C. EEUUA. p. 7.
- Kirk-Othmer. (1984). Microencapsulation. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3ª. Ed. John Wiley and Sons. Nueva York, EEUUA. Vol. 15, pp. 444-480.
- Kitani, H. (1986). Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the Laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52 (7):1131-1139.
- Kline, E.R. y Stekoll M.S. (2000). The role of calcium and sodium in toxicity of an effluent to mysid shrimp (*Mysidopsis bahia*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(1): 234-241.
- Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.*, 45(1):114-122.
- Knowlton, R.E. (1974). Larval development processes and controlling factors in decapod crustacea with emphasis on *Candea*. *Thalassia Jugosl.*, 10:138-158.
- Lin, C.C., Lin S.Y. y Sun H.L. (1995). Microencapsulation of Squid Oil with Hydrophilic Macromolecules for Oxidative and Thermal Stabilization. *J. Food Sci.*, 60(1):36-39.
- Litwinienko, G. Kasprzycka-Guttman, T. y Jarosz-Jarszewska, M. (1995). Dynamic and isothermal DSC Investigation of the kinetics of thermooxidative decomposition of some edible oils. *J. Thermal Anal.*, 45:741-750.
- Luzzi, L.A. (1970). Microencapsulation. *J. Pharmac. Sci.*, 59(10):1367-1375.
- Mandeville, S., Yaylayan, V. y Simpson, B. (1991). Isolation and identification of carotenoid pigments, lipids and flavor active components from raw commercial shrimp waste. *Food Biotechnol.*, 5 (2):185-195.
- Masters, K. (1985). *Spray Drying Handbook*. 4ª. Ed. John Wiley and Sons. Nueva York. EEUUA.
- Mathur, N.K. y Narang, Ch. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J. Chem. Educ.*, 67(11):938-942.
- Medina-Reyna, C.E. (1998). Diseño y evaluación de un alimento nebulizado para la larvicultura del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada B.C. México, p. 67.



Medina-Reyna, C.E., P. Jacinto-Nolasco, J. Ronson, I. Santiago-Morales y Pedroza-Islas. (2002). A new index for the evaluation of the shrimp larviculture. En: Mem. del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, México.

Meyers, S.P. y Bligh, D. (1981). Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *J. Agric. Food Chem.*, 29: 505-508.

Millamena, O.M. (1996). Review of SEAFDEC/AQD fish nutrition and feed development research. Feeds for small-scale aquaculture. Proceedings of the National Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds. Tigbauan. Iloilo. Philippines, 1-2 June 1994., SEAFDEC, Iloilo (Philippines). pp. 52-63.

Montgomery, D. (1991). Diseño y Análisis de Experimentos.1ª. Ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. México, pp. 241-248.

Moreau, D.L. y Rosenberg, M. (1998). Porosity of whey protein-based microcapsules containing anhydrous milkfat measured by gas displacement pycnometry. *J. Food. Sci.*, 63:819-822.

Mortensen, A., Skibsted, L.H. y Truscott T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1):13-19.

No, H.K. y Meyers, S.P. (1992). Utilization of crawfish processing wastes as carotenoids, chitin and chitosan sources. *J. Korean Soc. Food Nutrit.*, 21(3):319-326.

Pangantihon, M.P. y Chern, Y. (1998). Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquaculture*, 11(6):403-409.

Pedrazzoli, A., Molina, C., Montoya, N., Townsend, S. y Calderon, J. (1998). Recent Advances on Nutrition Research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Rev. Fisheries Sci.*, 6(1-2):143-151.

Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J. y Durán de Bazúa, C. (1998). Situación actual de los alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos y presentación de un problema tipo utilizando polisacáridos como agentes encapsulantes. *Avances de Nutrición Acuícola*. Vol. III, pp. 571-594.

Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J., Durán de Bazúa C. (1999). Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Res. Intl.*, 32:367-374.

Pedroza-Islas, R. (2000). Estudios de difusión de nutrimentos en alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos. Tesis de doctorado. UNAM. México, D.F. México.

Piedad-Pascual, C.E. y Sumalangcay, A. (1991). Supplemental feeding of *Penaeus monodon* juveniles with diets containing various levels of defatted soybean meal. *Aquaculture*, 89: 183-191.



- Ré, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16: 1195-1236.
- Rullán, A., Durán de Bazúa, C. y Pedroza, R. (1997). Microencapsulación de biomasa microbiana de plantas de tratamiento de agua usando sistemas de aspersión con diferentes matrices. En Memorias del Tercer Seminario Internacional de expertos en Tratamientos de Efluentes Industriales y Residuos (*Proceedings of the 1997 Third International Seminar of Experts on the Treatment of Industrial Effluents and Residues*). C. Durán de Bazúa y L.I. Ramírez Burgos Eds. Pub. PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM. Lid Impresores. ISBN 968-36-5876-8. México D.F. México, pp. 246-251.
- Sales, G. C. (1991). Apuntes económicos y sociales. SEDUE. Campeche. México, pp. 101-102.
- Sangha, R. R. Puello-Cruz, M. Chávez-Sánchez y D. Jones. (2000). Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae fed a single dose of live algae and artificial diets with supplements. *Aquaculture Res.* 31 (8-9): 683-689.
- SEMARNAP. (2000). Anuario estadístico de pesca. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F, México, pp. 17-22.
- Servicio de Actualización Pesquera. (1990). Especies de camarón. Secretaría de Pesca, México, 65: 1-10.
- Seymour, T.A., Shiao-Jing-Li y Morrissey, M.T. (1996). Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 44(3): 682-685.
- Sheu, T-Y y Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *J. Food Sci.*, 63: 491-494.
- Simpson, B. K. y Haard, N. F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J. Appl. Biochem.*, 7: 212-222.
- Spinelli, J. (1974). Composition, processing, and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish. Res. Board Canada*, 31(6): 1025-1029.
- Subasinghe, S. (1999). Chitin from shellfish waste – health benefits overshadowing industrial uses. *INFOFISH-International*, 3: 58-65.
- Synowiecki, J. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *J. Food Chem*, 68(2): 147-152.
- Torres, E. (1997). Caracterización fisicoquímica de materiales por análisis térmico. Informe de investigaciones, Instituto de investigación de materiales (UNAM), México, 25-35.
- Tramontano, W., Gonci, D., Pennino, M. (1992). Age dependent α -tocopherol concentrations in leaves of soybean and pinto beans. *Phytochemistry*, 31(10): 3349-3351.



Treece, M. y Fox J. M. (1993). Design, Operation and Training Manual for an Intensive Culture Shrimp Hatchery (with emphasis on *Penaeus monodon* and *P. vannamei*). Texas A&M Sea Grant College Program. Pub. TAMU-SG- 93-505. College Station, TX, EEUUA, pp.187.

Trino, A.T. y Sarroza, J.C. (1995). Effect of a diet lacking in vitamin and mineral supplements on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles in a modified extensive culture system, *Aquaculture*, 136(3-4): 323-330.

Velázquez, M.E. (1995). Producción de astaxantina por fermentación sumergida por *Phaffia rhodozyma*. Tesis de maestría. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

Vernon-Carter, E.J., Gómez, S.A. Beristáin, C.I. Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R. y Moreno-Terrazas, R.C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions estabilized by mesquite or Arabic gums and their blends. *J. Texture Studies*, 27: 625-641.

Vernon-Carter, E.J., Pedroza-Islas, R. y Beristáin, C.I. (1998). Stability of *Capsicum annum* oleoresin in water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *J. Texture Studies*, 29 (5): 553-568.

Villegas, C.T. y Kanazawa, A. (1979). Relation between diet composition and growth rate of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fishery Res. J. Philipp.*, (4): 32-40.

Villegas, C.T. y Kanazawa, A. (1980). Rearing of the larval stage of prawn *Penaeus japonicus* Bate, using artificial diets. *Memories of the Kagoshima University Research Center for the South Pacific*, 1(1): 43-49.

Villegas, C.T., Li, T.L. y Kanazawa, A. (1980). The effects of feeds and feeding leveles on the survival of a prawn, *Penaeus monodon* larvae. *Mem. Kagoshima Univ. Res. Center for the South Pacific*, 1(1): 51-55.

Young, S.L., Sarda, X. y Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating Properties of Whey Proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous Milk Fay. 2. Combination of Whey Proteins whith Carbohydrates *J. Dairy Sci.*, 76(1): 2868-2877 y 2878-2885.

Zar, J.H. (1984). *Biostatistical analysis*. 2nd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. NJ. EEUUA. p.334.