



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE ASTAXANTINA OBTENIDA A
PARTIR DE RESIDUOS ENSILADOS DE CAMARÓN.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

RODRIGO JIMÉNEZ PICHARDO.



MÉXICO D.F., 2009



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: M. FRANCISCO BAEZ FERNANDEZ.

VOCAL: J. ALEJANDRO FLORES MALDONADO.

SECRETARIO: M. ISABEL GUERRERO LEGARRETA.

1^{ER} SUPLENTE: J. CARLOS RAMIREZ OREJEL.

2^{DO} SUPLENTE: GUSTAVO LOZANO VAZQUEZ.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO S-130 DEL
ÁREA DE BIOQUÍMICA DE MACROMOLÉCULAS, PERTENECIENTE AL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

ASESORA DEL TEMA:

M. ISABEL GUERRERO LEGARRETA.

SUSTENTANTE:

RODRIGO JIMÉNEZ PICHARDO.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de crecer como ser humano y formarme profesionalmente.

A la Facultad de Química por abrirme sus puertas y darme todos los conocimientos y habilidades que me respaldan como persona y profesional de la química.

Al Búho por cobijarme bajo sus alas a lo largo de la carrera, en esas horas llenas de alegrías y tristezas.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar este estudio en sus laboratorios.

A la Doctora Isabel Guerrero Legarreta por recibirme en su equipo, brindarme su inmenso conocimiento y apoyarme incondicionalmente durante esta aventura.

A todos los profesores que me brindaron sus conocimientos y apoyo durante la carrera.

Dedicatorias.

A la mujer más importante en mi vida y a la que le debo lo que soy, es por ti MAMA BELLA donde quiera que estés.

A mis padres por darme su amor, apoyo y confianza incondicionales, sin ustedes no sería lo que soy.

A Magali por estar siempre a mi lado además de ser mi cómplice y amiga.

A la familia Pichardo Padilla por darme todo el amor y apoyo que son capaces. Especialmente a mis tíos, tías y primos.

A la familia Jiménez Valdez por ser mi inspiración.

A toda la banda del búho y demás colegas que hicieron extremadamente feliz mi paso por la facultad, gracias por acompañarme durante todo el camino.

A mis amigas y amigos del laboratorio S-130 de la UAM por su compañía y amistad.

Al grupo Jóvenes La Misión Tlalpan por abrirme los ojos a una nueva vida.

A los PP's por permitirme compartir con ustedes una de las mejores etapas de mi vida.

A todos los que confiaron en mí y a los que no, también. Esto va por todos ustedes.

Resumen.

El objetivo del presente trabajo fue extraer la astaxantina presente en los desechos del camarón (cefalotórax), con el fin de darle un uso a estos desechos, además se buscó proteger este pigmento natural introduciéndolo en diferentes sistemas modelo para aumentar su estabilidad frente a los factores que promueven su oxidación.

Se utilizaron desechos de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* procedentes en el Océano Pacífico, Mazatlán Sinaloa, México. Estos desechos se sometieron a un proceso de ensilado, tanto químico como biológico, para estudiar si había diferencias significativas entre ellos. Al mismo tiempo se compararon dos métodos de extracción, uno consistió en una extracción directa (EC) y el segundo en una centrifugación antes de la extracción (CE). La extracción se realizó con una mezcla de disolventes orgánicos (éter de petróleo:acetona:agua 15:75:10) con agitación constante durante tres horas.

Los sistemas modelo que se analizaron fueron dos; una emulsión cárnica modelo y, una disolución del concentrado en aceite vegetal comestible (aceite de girasol).

Se observó que en el ensilado químico se llegó en menos tiempo al pH final (4.5) y se mantuvo el nivel de acidez por más tiempo; mientras que en el ensilado biológico se requirió de mayor tiempo para alcanzar el pH final; además el pH aumento durante el almacenamiento. Para el ensilado químico se utilizó una mezcla de

ácidos orgánicos (fórmico-acético 4%-4% v/v) y para el ensilado biológico se utilizó un cultivo de *Pediococcus pentosaceus*, probado anteriormente como alterante y acidificante.

En cuanto a los procesos de extracción estudiados, el de mayor rendimiento fue el que implicaba una centrifugación previa a la extracción del pigmento; el rendimiento se midió por la concentración de xantofilas totales y, específicamente, astaxantina presente en el licor de extracción y el remanente en los residuos sólidos.

Debido al mayor rendimiento del proceso de extracción y del ensilado químico, la astaxantina para los procesos de estabilidad se obtuvo de esta forma. El licor obtenido se concentró y se adicionó a los sistemas modelo.

El aceite vegetal proporcionó una mayor protección a la astaxantina en comparación con la emulsión cárnica, ya que al esterificarse con los ácidos grasos se forman complejos más estables. Este también es el caso de las xantofilas totales; posiblemente debido a la presencia de pigmentos menos estables, se observó una mayor pérdida en la concentración de astaxantina.

Índice general.

Introducción	1
Antecedentes	4
1. El camarón	4
1.1. Composición química del cefalotórax	5
1.2. Producción nacional	6
1.3. Subproductos del camarón	9
1.3.1. Proteínas del cefalotórax	11
1.3.2. Quitina	11
1.3.3. Carotenoides	14
1.3.4. Astaxantina	16
1.3.4.1. Extracción de astaxantina	19
1.3.4.2. Métodos de conservación	21
1.3.4.3. Aplicación de la astaxantina en la acuicultura	23
1.3.4.4. El papel de la astaxantina en la salud	25
2. Ensilado	28
2.1. Ensilado químico	30
2.2. ensilado biológico	31
Objetivos	33
Metodología	34
1. Reactivos	34
2. Material biológico	35
3. Ensilado químico	35
4. Ensilado biológico	36
5. Extracción de pigmento	36
6. Análisis fisicoquímicos	38
6.1. pH	38
6.2 Humedad	38
6.3 Cenizas	38
6.4 Proteínas totales	39
6.5 Grasa cruda	41

6.6 Xantofilas totales	42
7. Análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	43
8. Concentración del pigmento	43
9. Estabilidad de la astaxantina en sistemas modelo	44
9.1 Estabilidad en una emulsión cárnica modelo	44
9.2 Estabilidad en aceite vegetal	45
10. Análisis estadístico	46
Resultados	48
1. Ensilado biológico	48
2. Ensilado químico	53
3. Concentración de xantofilas totales y astaxantina en los ensilados	59
4. Pruebas de estabilidad	63
4.1 Estabilidad en aceite vegetal	64
4.2 Estabilidad en emulsión cárnica modelo	69
Conclusiones	73
Bibliografía	75
Anexo	81
1. Tablas de análisis estadístico	81

Índice de tablas.

Tabla 1: Composición proximal del cefalotórax	6
Tabla 2: Valores medios de las variables fisicoquímicas en el ensilado biológico	48
Tabla 3: Valores medios de las variables fisicoquímicas en el ensilado químico	53
Tabla 4: Valores medios de concentraciones de xantofilas totales en el aceite vegetal	64
Tabla 5: Valores medios de concentraciones de astaxantina en el aceite vegetal	67
Tabla 6: Valores medios de concentraciones de xantofilas totales en la emulsión cárnica modelo	69
Tabla 7: Valores medios de concentraciones de astaxantina en la emulsión cárnica modelo	71

Índice de figuras.

Figura 1: Anatomía del camarón	5
Figura 2: Estructura química de la quitina	12
Figura 3: Estructura química del quitosano	13
Figura 4: Estructura química de la astaxantina	16
Figura 5: Estructura química de algunos análogos de la astaxantina	19
Figura 6: Estructura química de los principales isómeros cis de la astaxantina	27
Figura 7: Variación del pH en las fracciones del ensilado biológico	48
Figura 8: Variación del porcentaje de proteínas en las fracciones del ensilado biológico	49
Figura 9: Variación del porcentaje de lípidos en las fracciones del ensilado biológico	50
Figura 10: Variación del porcentaje de humedad en las fracciones del ensilado biológico	51
Figura 11: Variación del porcentaje de cenizas en las fracciones del ensilado biológico	52
Figura 12: Variación del pH en las fracciones del ensilado químico	54
Figura 13: Variación del porcentaje de proteínas en las fracciones del ensilado químico	55
Figura 14: Variación del porcentaje de lípidos en las fracciones del ensilado químico	56
Figura 15: Variación del porcentaje de humedad en las fracciones del ensilado químico	57
Figura 16: Variación del porcentaje de cenizas en las fracciones del ensilado químico	58

Figura 17: Concentración de xantofilas totales en el ensilado biológico	60
Figura 18: Concentración de xantofilas totales en el ensilado químico	60
Figura 19: Concentración de astaxantina y satacheno en el licor del ensilado biológico	62
Figura 20: Concentración de astaxantina y satacheno en el licor del ensilado químico	63
Figura 21: Concentración de xantofilas totales en presencia de oxígeno	65
Figura 22: Concentración de xantofilas totales en ausencia de oxígeno	65
Figura 23: Concentración de astaxantina en presencia de oxígeno	68
Figura 24: Concentración de astaxantina en ausencia de oxígeno	68
Figura 25: Concentración de xantofilas totales y astaxantina en la emulsión cárnica modelo	70

Introducción.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona), es un pigmento natural perteneciente a la familia de las xantofilas, muy utilizado en algunas industrias y de alto valor. Este pigmento es el responsable de la coloración rojo-naranja característica de algunos crustáceos; se encuentra unido a la red de quitina y proteínas del caparazón de dichos animales, que generalmente son un subproducto sin uso en la industria camaronícola.

En las zonas de captura del camarón, se utilizan solo las partes comestibles (alrededor del 50% en peso del camarón), descartando las cabezas y el caparazón, estos residuos representan una fuente importante de contaminación ambiental, siendo una fuente importante de productos con alto valor agregado. Si se les da un tratamiento adecuado, estos desechos se pueden utilizar, haciendo que los costos de producción para esta industria disminuyan y sea más rentable.

Existen métodos de conservación utilizados para este fin; por ejemplo, la acidificación de residuos de camarón utilizando ácidos orgánicos directamente o la fermentación con bacterias ácido lácticas.

Se busca que el pH final del ensilado sea 4.5, para inhibir el deterioro por bacterias y hongos.

Una vez que se estabiliza el residuo se puede realizar una extracción de los pigmentos, proteínas, quitina o sales minerales. Estos subproductos pueden ser utilizados como materia prima para la elaboración de dietas para alimentación animal, también son apreciados en la industria farmacéutica y cosmetológica.

Las proteínas presentes en el cefalotórax del camarón tienen un perfil de aminoácidos completo, ya que contienen aminoácidos esenciales. La quitina es un polímero de aminoazúcares, que junto con las sales minerales le dan la dureza característica al exoesqueleto de los crustáceos.

Los métodos para extraer pigmentos naturales son varios: utilizando una mezcla de disolventes orgánicos para extraer la fase oleosa y junto a esta los carotenoides liposolubles, entre ellos la astaxantina en mayor proporción; otras metodologías de extracción emplean aceite vegetal o fluidos supercríticos.

Debido a su naturaleza carotenoide, la molécula de astaxantina es inestable a la luz, a la presencia de oxígeno y las temperaturas superiores a 40°C, siendo la presencia de oxígeno la que más afecta a la molécula, ya que la oxida a astaceno.

Dado que la astaxantina es un pigmento natural tiene una aceptación mayor que los productos sintéticos como el Carophyll pink^{MR} (Hoffman-La Roche), que es la más vendida astaxantina sintética disponible en el mercado. Por esto es importante buscar una forma de estabilizar esta molécula, para esto se puede utilizar la microencapsulación o un sistema lipídico o acuoso.

Antecedentes

1. El camarón

El camarón es un crustáceo perteneciente a la familia de los decápodos, de tamaño y color variable según la especie de que se trate. Su cuerpo se divide en tres partes: cefalotórax, abdomen y telson o cola (Figura 1).

El cefalotórax es una combinación de cabeza y tronco, que está cubierto por un caparazón que contiene la cabeza y los órganos vitales del animal. En la cabeza tiene una cresta dentada, un par de ojos y dos mandíbulas con varios apéndices que le ayudan en su alimentación. Debajo de la cabeza tiene tres pares de patas prensiles y dos caminadoras.

El abdomen se divide en seis segmentos que contienen los intestinos, debajo de estos segmentos se encuentran las piernas natatorias, aunque también pueden ser utilizadas para dirigir alimento a la boca. Las hembras llevan los huevos debajo del abdomen, el cual termina en una punta fina llamada telson, que le sirve para impulsarse en el agua.

Los órganos sensoriales del camarón son las anténulas que se encuentran frente a la boca, estas son muy móviles y sensibles; estas tienen células receptoras, las cuales tienen un papel similar al del oído humano, además de

contener también células del gusto. El sentido del tacto es muy fino, ya que en las extremidades tiene pelillos finos capaces de detectar movimientos ligeros.

Al igual que el cefalotórax, el abdomen está cubierto por un caparazón, el cual está formado de quitina, proteínas y sales minerales (carbonato de calcio y fosfatos, principalmente), que le dan la rigidez característica (Armenta 2002; Luna 2003).

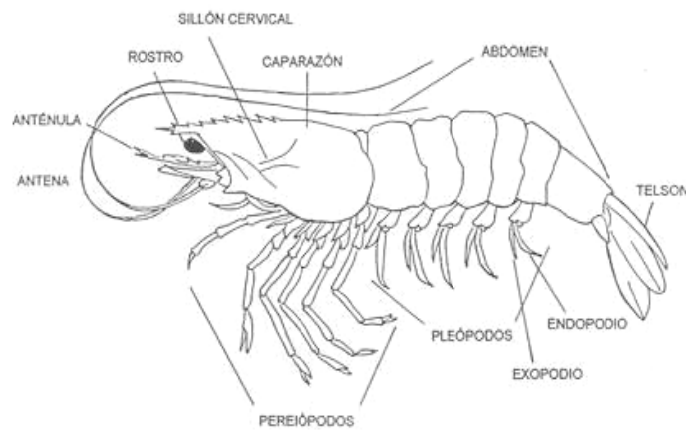


Figura 1. Anatomía del camarón

1.1. Composición química del cefalotórax del camarón.

Al camarón se le considera un alimento nutritivo, contiene de 75 a 80% de humedad, de 18 a 20% de proteínas y cerca de 1% de grasa y de carbohidratos (Tabla 1). Las proteínas son de alta calidad, ya que contienen concentraciones adecuadas de los aminoácidos esenciales, además de que la fracción lipídica contiene ácidos grasos esenciales (Armenta, 2002). La composición de las

proteínas no es muy diferente a las proteínas del músculo del camarón, es decir, también cuentan con una alta cantidad de aminoácidos esenciales. Con respecto a la fibra cruda, se puede considerar como principal componente a la quitina, un polímero de aminoazúcares (poli-β-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina), ya que no puede ser digerida. La quitina y las proteínas, esterificadas a esta, forman una red muy estable. Las sales minerales unidas a esta red le dan una dureza muy importante al caparazón que protege el cuerpo y los órganos vitales durante la vida adulta de los crustáceos. Los compuestos responsables del aroma, sabor y color característicos del camarón se encuentran disueltos en la fracción lipídica (Guadarrama, 1997).

Tabla 1. Composición proximal del cefalotórax.

Componente	% en base seca.
Proteínas crudas	47.70
Cenizas	26.86
Fibra cruda	19.35
Grasa	4.63
Carbohidratos asimilables	2.47

(Guadarrama, 1997)

1.2. Producción nacional.

La captura del camarón es una de las actividades económicas más importantes en México. Se tienen datos de las pesquerías de camarón desde 1947, sin embargo es hasta la década de 1970 cuando se tiene información más fidedigna, antes de esas fechas los datos están incompletos. La pesca de camarón

se rige por la Ley de Pesca (Diario Oficial de la Federación, 25-junio-1992) y por las normas NOM-002-PESC-1993 y NOM-009-PESC-1993.

Las capturas de camarón en el Pacífico mexicano se componen principalmente de 5 especies: camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), blanco (*L. vannamei*), café (*Farfantepenaeus californiensis*), rojo o cristal (*F. brevirostris*) y blanco del sur (*L. occidentalis*). En el Golfo de México las capturas en mar abierto se componen principalmente de *L. aztecus* o camarón café. En sistemas de camaronicultura se produce *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *F. californiensis*. (CONAPESCA, 2003).

Las principales zonas de captura en la Republica Mexicana son en el Océano Pacífico, principalmente en los Estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Oaxaca y Chiapas. En el Golfo de México, los mayores productores son Tamaulipas, Campeche, Veracruz y Yucatán. Los principales estados productores de camarón en granjas son Sonora, Sinaloa y Tamaulipas.

La producción para el año 2005 fue de 158,266 toneladas en peso vivo y 142,480 toneladas en peso desembarcado. La diferencia de estos pesos es debida a que el peso vivo se expresa al obtenerse de su medio natural, en cambio el peso desembarcado es la forma en la que se comercializa, es decir, descabezado, eviscerado, fileteado, en pulpa, rebanado u otras. El camarón producido en

granjas se comercializa con cabeza, solo en ciertos casos se descabeza antes de su comercialización.

El litoral del Océano Pacífico es el que produce más camarón, tanto en pesquería como en acuacultura, 130,882 toneladas en peso vivo (117,446 peso desembarcado) en pesquería y 90,041 toneladas en peso vivo en acuacultura (89,177 toneladas peso desembarcado). El camarón ocupa el tercer lugar en volumen de producción pesquera nacional, con un 10.85% (producción total 1,458,197 toneladas). El valor de la producción para este año fue de 6,777 millones de pesos, lo que ubica al camarón como la especie con más participación económica a nivel nacional, con el 46.59%, (el valor total fue 14,545 millones de pesos).

En los años comprendidos entre 1993 y 2005, los niveles de producción pesquera se mantuvieron constantes, mientras que los niveles de producción en acuacultura aumentaron considerablemente. Para el año 2005 las granjas de camarón aportaron 90,041 toneladas en peso vivo (56.89% del total), con un valor de 4,005 millones de pesos.

En el ámbito internacional, en 2004 México se ubicó en el lugar número ocho en producción de camarón silvestre y en el séptimo lugar en producción de camarón de cultivo. Para el año 2004, México exportó alrededor de 31,000

toneladas de camarón, principalmente a Estados Unidos, España y Tailandia. El valor de estas exportaciones fue de 346 millones de dólares (CONAPESCA 2005).

1.3. Subproductos del camarón.

La parte comestible del camarón depende de la especie, generalmente es entre 56% y 48% del peso total, por lo que se producen una gran cantidad de desperdicios anualmente (Sachindra *et. al.* 2007; Fagbenro *et. al.* 1996). Estos, cuando son producidos en altamar, son tirados en la misma zona; en las granjas son apilados en zonas determinadas contaminando el suelo de las zonas aledañas a las áreas de cultivo. Los desperdicios que se tiran al mar aumentan la materia orgánica en suspensión, lo cual aumenta la demanda bioquímica de oxígeno, limitando la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. La disminución en el oxígeno disuelto ocurre debido a que los microorganismos lo utilizan para degradar los desechos (Luna 2003; Guadarrama 1997).

Los desperdicios de camarón son un producto altamente perecedero, ya que se deterioran rápidamente por la acción bacteriana, ocasionando cambios bioquímicos en los componentes (Sachindra *et. al.* 2007). El pH de los residuos es entre 7.5 y 8.0, lo que promueve el crecimiento de la microbiota alterante, provocando una alta contaminación ambiental.

Los desperdicios están compuestos principalmente por el cefalotórax, el caparazón, los camarones mal pelados y los que tienen mal aspecto. El nivel de desperdicios puede disminuir si se cuenta con una tecnología apropiada; si se hace un pelado mecánico aumenta la cantidad de desperdicios, pero en el pelado manual aumentan los camarones rotos. Se calcula que la producción global de desperdicios de crustáceos es de aproximadamente 1.44 millones de metros cúbicos (Hagen *et al.*, 2008).

Utilizar los desechos del camarón es importante por dos razones: la primera es que es un producto perecedero, por lo que genera contaminación ambiental; la segunda, es debido a que son fuente importante de proteínas, quitina y carotenos (Babu *et al.*, 2007; Torrasen *e. al.*, 1982). Cada uno de estos componentes puede ser utilizado por alguna industria especializada, con el aprovechamiento de los subproductos se puede mejorar los costos de producción, además de minimizar el impacto ambiental (Akdes *et al.*, 2007; Sachindra *et al.*, 2005). Utilizar los desechos de camarón es amigable con el ambiente, es seguro y no es necesaria una tecnología sofisticada (Bhaskar *et al.*, 2007).

Solo una porción de los desechos son secados y molidos para la elaboración de harina de camarón, que se destina a la producción de alimentos típicos como caldos y sopas.

1.3.1. Proteínas del cefalotórax

Representan aproximadamente el 47 a 55% del peso seco y son particularmente ricas en lisina y en otros aminoácidos esenciales (Meyers *et al.*, 1987).

Fanino *et al.* (2000), probaron la eficiencia de la proteína (PER) y la retención neta de la proteína (NPR) de una dieta hecha a partir de desechos de camarón, comparándola con una dieta hecha con harina de pescado. Estos autores concluyeron que los perfiles de aminoácidos son similares, pero la presencia de quitina y sales dificulta la absorción de las proteínas, por lo que la calidad de las proteínas no es adecuada.

Olivea *et al.* (2007), mencionan que al utilizar harina de residuos ensilados de camarón se mejora la absorción de los aminoácidos de las proteínas. Con este producto se podría sustituir el uso de harina de pescado, el criterio de selección sería entonces la disponibilidad de las harinas y el aspecto económico.

1.3.2. Quitina.

La quitina (Figura 2) es un biopolímero de aminoazúcares que es responsable de la dureza del exoesqueleto. Este componente representa entre 10 y 66% del peso seco de los desperdicios de los crustáceos. La presencia de este componente aumenta el nivel de nitrógeno no proteínico.

Como se ha mencionado el caparazón de los crustáceos es una fuente importante de este biopolímero que junto con la celulosa es un de los más abundantes en la naturaleza. Este componente del cefalotórax es un homopolímero de N-acetil-D-glucosa-2-amina, unidos por enlaces β -1,4 (Hagen *et. al.* 2008).

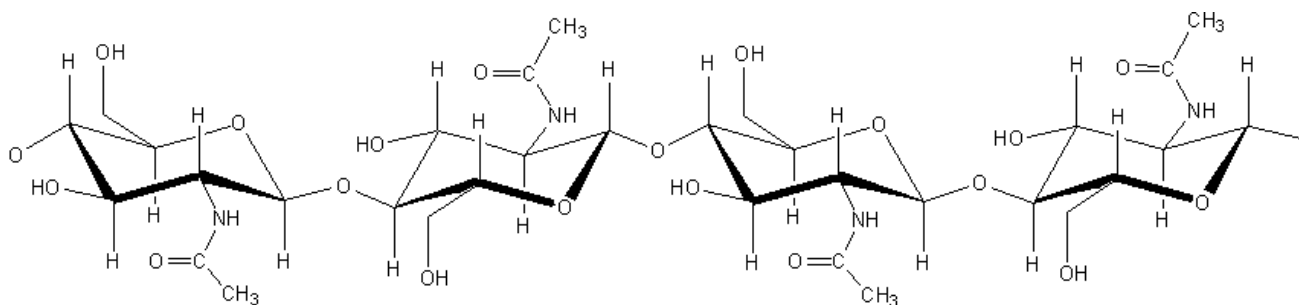


Figura 2: Estructura química de la Quitina.

Varum *et al.* (2008), estudiaron la calidad y la composición de la quitina extraída de camarones, dicho estudio se realizó a lo largo de un año. La conclusión fue que la calidad y composición no tiene diferencias significativas en las diferentes épocas del año, el limitante es que en algunos países hay una temporada de veda en la pesca de camarón.

Para que la extracción de la quitina sea eficiente se deben eliminar las proteínas y las sales minerales, generalmente por hidrólisis enzimática y por disolución en ácidos orgánicos, respectivamente. La extracción de la quitina se

puede realizar después de la extracción de la fase oleosa. Si no se cuenta con la infraestructura necesaria este proceso puede resultar caro (Cira *et al.*, 2002).

El quitosano (Figura 3) es el derivado de la quitina más utilizado en la industria; es el compuesto obtenido al desacetilar la quitina (García, 1997). Este polímero está formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosamina, unidos por enlaces β -1,4 (Higuera *et al.*, 2004). Durante la producción de quitosano se desperdicia 3 kilogramos de proteínas por cada kilogramo de quitosano producido (Gildberg *et al.*, 2001).

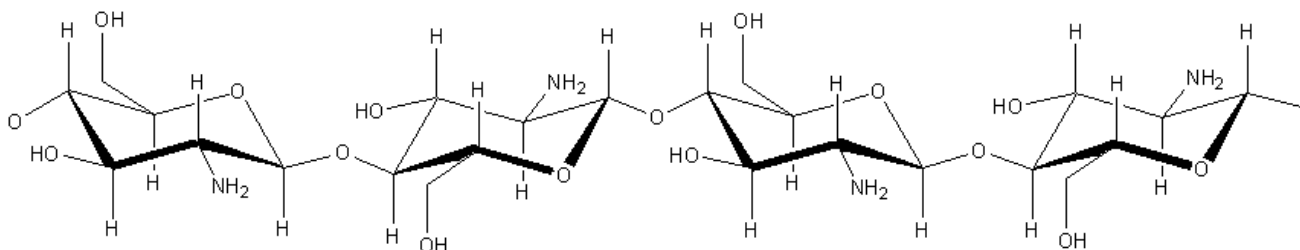


Figura 3: Estructura química del Quitosano

La quitina y sus derivados se pueden utilizar en el tratamiento de aguas residuales, como fibra dietaria en la industria de alimentos, en productos médicos o en cosméticos.

1.3.3. Carotenoides.

Estos compuestos son los responsables de la coloración roja o amarilla en algunos frutos, vegetales, plantas, algas y bacterias (Negeswara *et al.*, 2005). Además de impartir color, los carotenoides sirven para la absorción de energía luminosa, y por tanto tienen poder antioxidante al interrumpir las reacciones mediadas por radicales libres sin modificar su estructura; además, algunos de ellos son precursores de vitamina A, entre otras funciones (Babu *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2006).

Estructuralmente, los carotenoides son tetraterpenos liposolubles, formados por condensación de unidades de isopreno. Dependiendo del número de dobles ligaduras conjugadas es la intensidad del color rojo que imparten; la intensidad del color amarillo depende de las epoxidaciones en los anillos. Los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: los carotenos, que son hidrocarburos poliinsaturados, como el β -caroteno; y las xantofilas, que son formados por la oxidación de hidrocarburos, como ejemplo esta la astaxantina. Cabe resaltar que solo los dobles enlaces en posición trans son biológicamente activos (Fennema, 1996). Al ser liposolubles se extraen junto al extracto de grasa cruda (Guillou *et al.*, 1995).

En los tejidos vegetales los carotenos se encuentran libres, en forma de cristales o sólidos amorfos, aunque también se pueden encontrar disueltos en la

fracción lipídica (Rivera, 1995). En los tejidos animales se pueden encontrar libres en forma oxicarotenoidea, unida a una proteína por medio de un enlace del tipo de base de Schiff (carotenoproteína) o esterificada con uno o dos ácidos grasos (carotenolipoproteína) (Luna, 2003). En cualquier caso, la molécula a la que se encuentra unido el carotenoide tiene un efecto protector sobre este.

En los crustáceos, cuando el complejo carotenoproteína está unido a la red de quitina imparte un color azul-verde. Cuando la proteína es separada este complejo es cuando se refleja el color rojo-naranja de los carotenoides (Luna, 2003; Armenta *et al.*, 2002).

Los carotenoides sufren una oxidación cuya intensidad depende de las condiciones de almacenamiento y ambientales, dichas condiciones son: temperatura, radiación electromagnética, exposición a la luz, presencia de oxígeno, metales pesados y peróxidos. Esta oxidación acarrea una pérdida de color y de actividad provitamínica.

El estado de oxidación de los carotenoides puede dar una idea de las condiciones de procesamiento y almacenamiento en las que se han manejado los desechos, es decir, este parámetro podría ser un indicador de la calidad de los residuos (Guadarrama, 1997).

1.3.4. Astaxantina.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) (Figura 4) pertenece a la familia de las xantofilas y es el carotenoide mayoritario en los residuos de camarón (Akdes *et al.*, 2007). Es responsable de la coloración rojo-naranja de la carne de los salmónidos, crustáceos, trucha arcoíris, entre otros, además tiene aplicación en alimentos funcionales, en dietas para acuicultura o en cosméticos.

Al ser una molécula altamente insaturada, es fácilmente degradada por la temperatura, luz o condiciones oxidativas durante la manipulación o almacenamiento del producto (Higuera *et al.*, 2004; Kittikaiwa *et al.*, 2007).

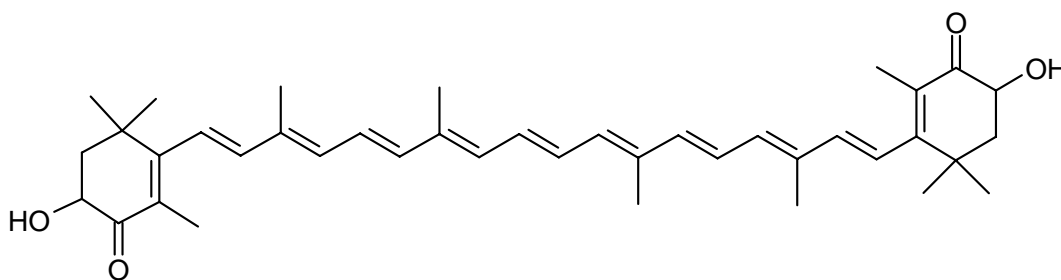


Figura 4: Estructura química de la Astaxantina.

Dentro de los tejidos animales, la astaxantina puede estar libre (alrededor de 10% del total), los grupos hidroxilos pueden estar esterificados con ácidos grasos formando monoésteres o diésteres, o conjugada con proteínas del exoesqueleto o del músculo (Akdes *et al.* 2007; Guerin *et al.* 2003; Guillou *et al.* 1995). Restrom *et al.* (1981), mencionan que los ácidos grasos que esterifican a la astaxantina son de cadena larga, de entre 12 y 22 carbonos.

Los únicos organismos que pueden biosintetizar *de novo* la astaxantina, al igual que todos los carotenoides, son las microalgas, las levaduras y algunas bacterias, siguiendo la ruta de formación de isoprenoides, y de varios de los lípidos solubles. La presencia de este carotenoide en otras fuentes de alimentos se debe a que los animales superiores lo consumen en la dieta; en la naturaleza, se debe a su presencia en el zooplancton, y en la acuicultura se debe a la inclusión de este en la dieta (Torrissen *et al.*, 1982; Armenta, 2002; Luna, 2003).

Las principales fuentes de extracción de este pigmento son los desechos de los crustáceos, por fermentación controlada con células mutantes de las algas verdes *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella zofingiensis*, la alga roja *Phaffia rhodozyma* y las bacterias *Xanthophyllomyces dendrohous*, *Bacillus circulans* y *Agrobacterium aurantiacum* o algunos otros microorganismo (Kittikaiwa *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2002).

La micro alga *Haematococcus pluvialis* es la más utilizada como fuente de este carotenoide. La producción es inducida por las condiciones de estrés durante el crecimiento. En la primera etapa se hace crecer al alga en un fotobioreactor, bajo condiciones óptimas; en la segunda etapa estas condiciones son cambiadas promoviendo las condiciones de estrés, a esta etapa se le llama carotenogénesis (Guerin *et al.*, 2003).

Otra forma es por síntesis química, actualmente las únicas marcas de astaxantina sintética en el mercado son Roxathin^{MR} o Carophyll pink^{MR} de la marca suiza Hoffman-La Roche, y Lucantin[®] Pink producido por el grupo BASF. En múltiples estudios se ha mencionado que la astaxantina obtenida de fuentes naturales es la que mejor fijación tiene en los tejidos, por lo que se prefiere el uso de estas (Chen *et al.*, 2007; Kittikaiwa *et al.*, 2007). Aunque la intensidad de la coloración depende de muchos factores, tales como el estado biológico del animal, el grado de absorción en el aparato digestivo, la concentración del pigmento, y la concentración del isómero cis, entre otras (García, 1997; Luna, 2003).

Cuando la astaxantina es aislada de una fuente natural o cuando es sintetizada se obtienen también los análogos, astaceno, apoastaxantinal y deshidro astaxantina (Figura 5). Dichos análogos son producidos naturalmente o se forman durante la degradación del producto, esto reduce significativamente la coloración y apariencia, por lo tanto la calidad del producto ofrecido va a ser menor (Nageswara *et al.*, 2005; Restrom *et al.*, 1981)

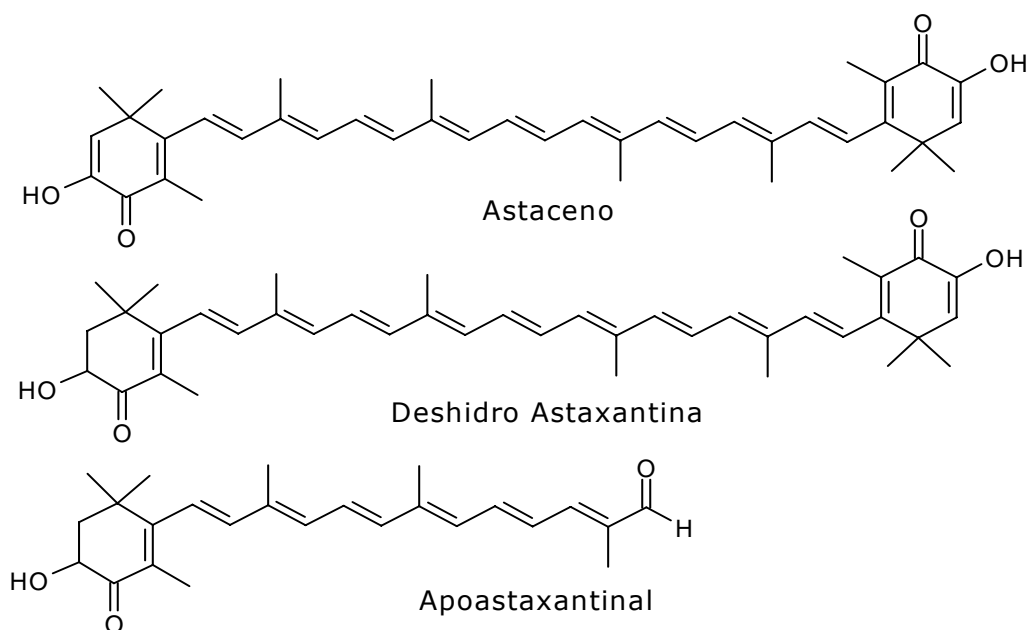


Figura 5: Estructura química de algunos análogos de la astaxantina.

Las altas temperaturas y las condiciones de luz promueven la isomerización a las formas *cis*, las cuales tienen una menor actividad biológica.

1.3.4.1. Extracción de astaxantina.

Para extraer la astaxantina de los desechos de los crustáceos se han desarrollado diferentes métodos, los más utilizados son los que emplean disolventes orgánicos o aceite vegetal (Sachindra *et al.*, 2007; Luna, 2003). La utilización de disolventes orgánicos como el éter de petróleo, y la acetona, entre otros, facilita la extracción de los carotenos libres disueltos en la grasa de los desperdicios; también se ha utilizado fluidos supercríticos, como CO₂, estos se prefieren sobre los disolventes orgánicos por su poca toxicidad y porque no se dañan los compuestos termolábiles. La desventaja de los fluidos supercríticos es

que no son específicos y que la astaxantina es poco soluble en ellos (de la Fuente *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2007).

El principal problema que se presenta durante la extracción de los carotenoides es que se encuentran unidos a proteínas o a quitina, dificultando su extracción, por lo que se han diseñado otros métodos, como la aplicación de una hidrólisis enzimática previa para liberar a los carotenoides (Akdes *et al.*, 2007; Armenta *et al.*, 2002).

Sachindra *et al.* (2006), probaron varios disolventes y mezcla de estos en la extracción de pigmento de residuos de camarón, concluyendo que la mezcla que tuvo mejor rendimiento fue la de alcohol isopropílico; hexano en una proporción de 60:40, en comparación con los otros ensayos. Para todos los casos se realizaron 3 extracciones en una proporción de 5:1 (disolvente:desechos).

Sachindra y Mahendrakar (2005) probaron extracciones con varios aceites vegetales; los resultados mostraron que el aceite de girasol fue el que obtuvo mayor rendimiento en la extracción, en comparación con los aceites de soya, mostaza, coco, entre otros. Los factores que afectan la extracción con aceite son el nivel de grasa en los residuos, el tiempo y la temperatura a la que se calienta los residuos antes de la separación del aceite pigmentado. Cuando aumenta la temperatura también lo hace la transferencia de masa entre los residuos y el

aceite, es decir aumenta el coeficiente de difusión; por otro lado cuando el tamaño de partícula disminuye, el área de contacto aumenta con lo que mejora la transferencia de masa. Este es un proceso es un proceso endotérmico por lo que se requiere energía para que ocurra espontáneamente (Akdes *et al.*, 2007).

Armenta *et al.* (2002), reportaron que al llevar a cabo una hidrólisis enzimática previa a la extracción; por este método, la concentración de astaxantina en los disolventes de extracción aumenta, con respecto a la extracción hecha a los residuos sin hidrolizar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gildberg *et al.* (2001), quienes reportaron una concentración mayor de astaxantina en los sedimentos que quedan después de separar el licor residual, el cual es rico en proteínas, minerales y carotenoides, por lo que se puede utilizar como suplemento en dietas de pescado. La fracción sólida es rica en quitina, por lo que se puede destinar a los diversos usos (Bhaskar *et al.*, 2007).

1.3.4.2. Métodos de conservación.

Cuando manipulan sustancias inestables es necesario protegerlas de las condiciones que pueden causar un deterioro y, por consiguiente, una pérdida en la calidad de los mismos. Por esto se han utilizado matrices poliméricas o materiales, sintéticos o naturales, capaces de proteger los materiales inestables,

los polímeros naturales se prefieren por encima de los sintéticos, por ser seguros y la mayoría son biodegradables.

Los pigmentos por su alta inestabilidad no se comercializan en su forma cristalina, generalmente se estabilizan en emulsiones o microencapsulados. La desventaja de estas formas de conservación es que durante el proceso puede haber pérdida de su actividad biológica, por esto son preferibles los métodos de conservación que no impliquen el uso de altas temperaturas.

La pared celular de las microalgas, gruesa e impermeable, protege a los carotenoides de las condiciones oxidativas. Esta misma pared hace poco disponible al contenido celular y dificulta la liberación de la astaxantina, por lo tanto en la producción de microalgas para la acuicultura o para el consumo humano es necesario llevar a cabo un procedimiento para aumentar la disponibilidad, aunque esto afecte la estabilidad del pigmento (Bjerkeng *et al.*, 2007; Kittikaiwa *et al.*, 2007).

Se han desarrollado diversos sistemas para aumentar la estabilidad de la astaxantina. Higuera *et al.* (2004), utilizaron una matriz de quitosano para microencapsular astaxantina sintética, utilizando glutaraldehído como compuesto de unión; Chen *et al.* (2007) produjeron complejos de inclusión utilizando β -ciclodextrina para recubrir astaxantina; y Kittikaiwa *et al.* (2007) mezclaron un

cultivo de *H. pluviales* con chaquiras, las cuales fueron recubiertas con quitosano. Las microcápsulas, los complejos de inclusión y las chaquiras recubiertas fueron sometidos a diferentes condiciones de luz y temperatura; después de un determinado tiempo, se extrajo el pigmento y se midió la concentración de este, comparándola con la concentración inicial o con la estabilidad de astaxantina libre. Todos estos investigadores encontraron que el respectivo método de conservación mejoró la estabilidad de la astaxantina, Higuera *et al.* (2004) concluyó que la concentración inicial y final no son significativamente diferentes y que hubo poca pérdida de color después de ocho semanas; Chen *et al.* (2007) observó que la concentración final no tenía diferencias significativas con la inicial, aunque la concentración de la astaxantina libre sí tuvo diferencias significativas con la inicial después de 24 semanas; Kittikaiwa *et al.* (2007) menciona que las chaquiras recubiertas con quitosano ofrecen una protección mayor en comparación con las microcápsulas hechas con quitosano y con la biomasa seca.

1.3.4.3. Aplicación de la astaxantina en la acuicultura.

En la actualidad se le da gran importancia a la producción de peces en granjas, sobre todo de aquellas especies con más valor comercial como la trucha y el salmón, esto ha provocado que estados como Hidalgo, Durango, Puebla, entre otros estados que no tienen litoral, sean productores de alguna de estas especies. El sabor de estos peces de granja es muy similar al de los capturados en el mar, los consumidores habituales no notan la diferencia. La mayor

desventaja en la producción de peces en granjas, es que se pierde la coloración rojo-rosa de la piel o músculo de las especies que se caracterizan por esto y que es un parámetro de calidad muy importante para el consumidor, ya que la adecuada coloración, además de que mejora la apariencia, esta asociada con un producto fresco.

Dado que la pigmentación es una parte importante en la producción de peces, se han utilizado dietas con diferentes fuentes de carotenoides, obteniendo diferentes resultados en la coloración. Las fuentes más utilizadas son residuos enteros o harina de krill o crustáceos, astaxantina sintética o cultivos de *H. pluvialis* o de alguna otra alga. La pigmentación de los salmónidos con carotenoides no solo esta influenciada por el tipo de carotenoide con el que se suplementa la dieta, también se va afectada por la fuente utilizada, la concentración, el tamaño y por los otros ingredientes de la dieta. En estudios recientes se ha demostrado que la α -actina es la proteína miofibrilar que se enlaza a la astaxantina, por lo que la presencia de esta proteína es importante en la pigmentación del músculo (Bjerkeng *et al.*, 2007).

Kalinowski *et al.* (2007), estudiaron el efecto que tiene la suplementación de la dieta del pargo (*Pargus pargus*), con harina de residuos de camarón. Esta harina es fuente de proteínas, pero fue utilizada principalmente como fuente de astaxantina, para pigmentar la piel de los peces. Se observó que la coloración y la

concentración de carotenoides en la piel aumento proporcionalmente al aumento de la harina de camarón en la dieta y del tiempo en que se alimento a los peces.

Se sabe que la astaxantina natural tiene mayor actividad biológica que la sintética, para esto se han realizado muchos estudios, como el que realizó Bjerkgeng *et al.* (2007), en el cual compararon dos dietas con diferentes fuentes de astaxantina, una fue suplementada con un cultivo de *Phaffia rhodozyma* y la otra con Lucantin[®] Pink (BASF). La conclusión de estudio fue que la primer dieta tuvo mayor rendimiento en la pigmentación de la piel y que el los peces alimentados con esta dieta la concentración de carotenoides fue mayor que en el otro caso. Estos resultados son similares a los reportados por Tangeras y Slinde (1994).

1.3.4.4. El papel de la Astaxantina en la salud.

La astaxantina tiene una función biológica muy importante dentro de los tejidos vivos; se le atribuye poder antioxidante, antiinflamatorio, antihipertensivo, es un potente neuroprotector (Liu *et al.*, 2007); previene la carcinogénesis (Kittikaiwa *et al.*, 2007); reduce el riesgo de ataque al corazón o enfermedades en las arterias coronarias (Negeswara *et al.*, 2005); ataca la infección por *Helicobacter pylorii*, promueve la respuesta inmune, es precursor de la vitamina A, aunque no en mamíferos (Guerin *et al.*, 2003); se asocia con la reproducción y con el desarrollo del embrión (Chen *et al.*, 2007; Higuera *et al.*, 2004). Algunas

especies de crustáceos poseen sistemas enzimáticos necesarios para convertir los carotenos en astaxantina. La mayoría de estas actividades biológicas se relacionan al poder antioxidante que tiene la molécula, el cual se debe a las dobles ligaduras conjugadas y a los grupos hidroxilo y ceto en los anillos. Las dobles ligaduras inhiben el efecto del oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno y el de los radicales libres, por lo que tiene una gran actividad en la inhibición de la oxidación de las grasas (Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). La actividad antioxidante se le atribuye solo a los isómeros con todas las dobles ligaduras en posición trans, aunque en estudios recientes han encontrado que algunos isómeros cis tienen mayor poder antioxidante (Liu *et al.*, 2007), atribuyéndose a estos isómeros trans un poder antioxidante 2500 veces mayor que el de las vitaminas E y C, β -caroteno, zeaxantina y cantaxantina (Arango *et al.*, 1998).

Con respecto a la astaxantina, Liu y Osawa (2007) mencionan que en reales coexisten los isómeros de astaxantina trans y cis, en especial 9-cis y 13-cis (figura 6); los isómeros cis que tienen una mayor actividad antioxidante que el isómero trans, esto les da una efectividad mayor para inhibir la oxidación de grasas poliinsaturadas y sobre la generación de formas reactivas de oxígeno. Esta isomerización se da naturalmente o por el contacto con disolventes orgánicos o ácidos, exposición a altas temperaturas, a la luz o iones metálicos, o por exposición a altas temperaturas o a la luz.

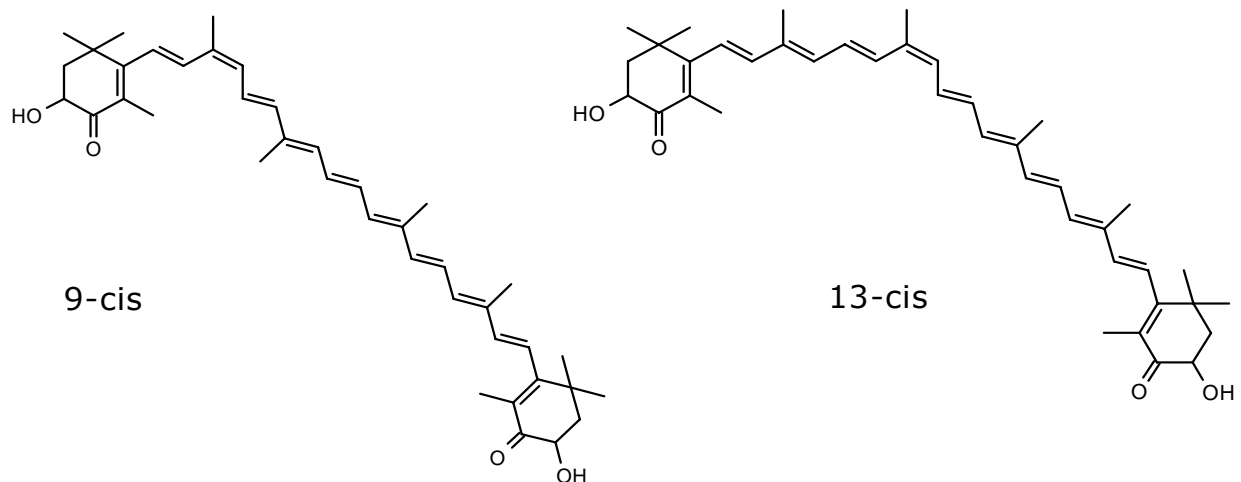


Figura 6: Estructura química de los principales isómeros cis de la astaxantina.

Los radicales libres y las formas reactivas del oxígeno son producidos por el metabolismo normal, por otro lado la contaminación ambiental, el humo de tabaco, la luz ultravioleta, entre otros factores pueden elevar la producción de estas especies reactivas. La alta concentración de estos compuestos puede dañar el ADN, las proteínas y las membranas lipídicas, por lo que el consumo de antioxidantes en la dieta puede prevenir o luchar contra las enfermedades causadas por estos factores.

Por estas funciones biológicas la astaxantina es muy utilizada en alimentos funcionales y dietas para la acuicultura, la limitante que se presenta al utilizarla como antioxidante es que tiene muy poca solubilidad en la fase acuosa. La pérdida de astaxantina durante el procesamiento ocasiona la pérdida de propiedades nutritivas o biológicas y se generan sabores o aromas indeseables (Chen *et al.*, 2007).

2. Ensilado.

El ensilado es una forma de conservación de productos que se basa en la disminución del pH para inhibir el desarrollo de microorganismos y, por tanto, retarda el deterioro. Este método de conservación es relativamente fácil de realizar y de ajustar a las necesidades del proceso. La acidificación del medio se puede hacer de dos formas: por adición directa de ácidos (ensilado químico) o por una fermentación con bacterias ácido lácticas (ensilado biológico). Cualquiera de estas dos formas de acidificación presentan ventajas y desventajas, aunque los dos métodos se utilizan para obtener productos con alto valor agregado como, hidrolizados de proteínas, quitina y pigmentos naturales. Este proceso es una alternativa para estabilizar y utilizar los residuos de camarón y sus componentes.

Cuando se alcanza un valor de pH 4 en el material ensilado, se activan las enzimas proteolíticas endógenas, por lo que el material se hidroliza. En el caso de los residuos del camarón, se hidrolizan las proteínas del exoesqueleto. La velocidad de esta hidrólisis depende de la calidad de la materia prima y de la temperatura (Meyers *et al.*, 1982). A este pH la astaxantina es estable y se da una baja conversión del diéster a monoéster, a pH ácido se promueve el ambiente reductor por lo que la estabilidad de los carotenoides se ve incrementada (Armenta, 2002).

Mientras el pH se mantenga entre 4 y 5, el ensilado se puede mantener a temperatura ambiente por varios meses. Conforme avanza la hidrólisis se liberan aminoácidos que amortiguan el pH del medio, aunado a esto las sales de calcio liberadas pueden neutralizar el ácido, por lo que es importante vigilar constantemente este parámetro (Zhang *et al.*, 2000; Fagbenro *et al.*, 1996).

El ensilado con residuos de camarón puede ser una buena fuente de astaxantina, además de que las dietas hechas a base de harina de residuos ensilados favorecen una buena coloración del músculo de salmónidos. Si, además, durante el procedimiento se utiliza alguna enzima proteolítica, se alcanza un rendimiento mayor en la extracción de la astaxantina y el tiempo se acorta (Meyers *et al.*, 1982; Guillou *et al.*, 1995; Guadarrama, 1997; García, 1997; Babu *et al.*, 2007).

Las limitantes para el uso de una dieta de animales formulada con harina de ensilado de camarón son las siguientes: se debe neutralizar el pH ácido de la harina; se puede producir una disminución en la calidad nutricional de la dieta si el ensilado representa más de 25% de la materia seca en la dieta; se pueden generar sabores indeseados en el producto final debido a los compuestos que le dan olor y sabor al camarón disueltos en la fase oleosa, entre otras (Neave *et al.*, 1986).

La digestibilidad de los nutrientes aumenta al llevar a cabo la hidrólisis, el grado de esta determina la calidad nutricional, debido a que se producen aminoácidos, péptidos activos y amoniaco, además se liberan las ácidos grasos y los carotenoides lo que facilita su extracción (Fagbenro *et al.*, 1996).

2.1. Ensilado químico.

Para llevar a cabo un ensilado químico, se utilizan mezclas de ácidos orgánicos y ácidos minerales. Uno de los más utilizados el ácido fórmico, debido a su poder antibacteriano; otros son el ácido clorhídrico, sulfúrico y acético, entre otros. Las concentraciones en las que se utilizan son, por lo general, muy bajas. Con la adición del ácido se busca un descenso rápido del pH, por lo tanto se inhiben el crecimiento microbiano; la hidrólisis de las proteínas dependerá de los factores antes mencionados. La desventaja de utilizar ácidos es que estos son muy corrosivos, lo que ocasiona subproductos altamente contaminantes (Neiva *et al.*, 1986; Bello *et al.*, 1994; Armenta, 2002).

Al realizar una acidificación directa con ácidos puede resultar en una conversión gradual del diester a monoester durante el almacenamiento, reduciendo con esto la estabilidad de la astaxantina. Por otro lado el tratamiento con ácidos orgánicos o minerales pueden degradar los carotenoides, al contrario de lo que se observa con el ensilado biológico, que puede tener un efecto benéfico sobre la estabilidad de los carotenoides.

Esta forma de acidificar los materiales es poco amigable con el ambiente, como se ha mencionado antes, por otro lado se ha observado que el ensilado químico tiene un menor rendimiento en la extracción de carotenoides, cuando se utilizan disolventes orgánicos o aceites vegetales (Sachindra *et al.*, 2007).

2.2. Ensilado biológico.

El ensilado biológico incluye a varios tipos de fermentación: acética, propiónica y láctica. La fermentación ácido láctica es uno de los métodos más antiguos para la preservación de los alimentos; en este procedimiento se puede utilizar la microbiota nativa o inóculos puros para asegurar la calidad de la fermentación.

La velocidad de fermentación en el ensilado biológico depende de la actividad de los microorganismos homofermentativos. Si dentro de la microbiota natural se encuentra bacterias heterofermentativas, habrá una producción de otros compuestos, como etanol, dióxido de carbono, y la de ácido láctico será lenta. Debido a que la concentración de carbohidratos asimilables en los residuos de camarón es muy baja, es necesario adicionar una fuente externa para favorecer el crecimiento de las bacterias (Neave *et al.*, 1986).

Los métodos de fermentación se pueden estandarizar utilizando un diseño experimental, utilizando las variables de concentración de fuente de carbono, porcentaje de cultivo iniciador y el tiempo de fermentación. Así lo hicieron Fagbenro (1996) y Bhaskar *et al.* (2007), quienes utilizaron *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici* CRF2182, respectivamente, como cultivo iniciador. Los otros parámetros dependen del cultivo iniciador y de la cepa que se utiliza, Fagbenro (1996) concluyó que, utilizando 5% (w/w) de inóculo, 15% (w/w) de melaza como fuente de carbono y dejado la fermentación durante 7 días a 30°C se tenían las condiciones óptimas. Por otro lado Bhaskar y colaboradores utilizó 5% (v/p) de inóculo (8.28 log ufc/ml), 15% (p/p) de glucosa y dejó la fermentación por 72 horas a 37±1°C, para llegar a un pH < 4.5. En ambos casos se observó una pérdida de triptófano debido a que este aminoácido es lábil a pH ácido.

Objetivos.

Objetivo general:

- Extraer y estabilizar astaxantina obtenida a partir de residuos ensilados de camarón.

Objetivos particulares:

- Estudiar comparativamente las dos formas de realizar el ensilado en residuos de camarón.
- Estudiar comparativamente dos métodos de extracción con respecto al rendimiento y estabilidad de astaxantina obtenida.
- Estudiar la estabilidad del pigmento bajo diversos factores como, luz temperatura y oxígeno.

Metodología.

1. Reactivos

Acetona, Reasol México

Acetonitrilo grado HPLC, Baker, México

Ácido acético, Baker, México

Acido bórico, Baker, México

Acido clorhídrico, Baker, México

Ácido fórmico, Baker, México

Ácido propiónico, Baker, México

Ácido propiónico grado HPLC, Baker, México

Ácido sulfúrico, Baker, México

Acoline (emulsificante comercial para embutidos) McCormick de México

Agua grado HPLC, Baker, México

Caldo MRS, Disco, Estados Unidos

Cloroformo grado HPLC, Baker, México

Cloruro de sodio, Baker, México

Éter de petróleo, Baker, México

Fosfato de potasio monobásico, Sigma, Estados Unidos

Hexano, Baker, México

Hidróxido de sodio, Baker, México

Metanol grado HPLC, Baker, México

Sulfato cúprico, Reasol, México

Sulfato de potasio, Reasol, México

2. Material biológico

Para este proyecto se utilizaron desechos de camarón (*Litopenaeus vannamei*) procedentes del mar de Cortés, frente a las costas de Sonora, México. Estos desechos fueron empacados por Deep Sea Shrimp Importing, Inc. bajo la marca Mar Lindo, la presentación es de marquetas congeladas de 5 libras.

Los desechos, principalmente cefalotórax, se molieron en un molino de carne a través de un cedazo de ¼" y se congelaron a -20°C. Posteriormente los residuos se sometieron a dos procesos de ensilado: ensilado químico, por adición directa de ácidos; y ensilado biológico por fermentación ácido láctica, utilizando la técnica descrita por Armenta y colaboradores (2002).

3. Ensilado Químico.

La acidificación química se llevó a cabo utilizando dos mezclas de ácidos, por separado:

C1: Ácido fórmico-ácido acético 4%/4% (v/v)

C2: Ácido fórmico-ácido propiónico 4%/4% (v/v)

Se colocaron 50 g de residuo en frascos ámbar y se adicionaron 7.4 mL de la mezcla correspondiente de ácidos, se dejaron reposar durante 24 h a 4°C; antes y después de agregar la mezcla de ácidos se determinó el pH.

4. Ensilado Biológico.

El cultivo iniciador utilizado para esta fermentación consistió en *Pediococcus pentosaceus*, aislado de residuos de camarón. La cepa liofilizada se reactivó en caldo MRS a 37°C hasta DO (densidad óptica)= 2. Se realizó una tinción de Gram para asegurar la pureza del cultivo.

En un frasco ámbar se colocaron 50 g de residuo, 5 g de dextrosa anhidra y el inóculo (5%); los frascos se incubaron a 37°C hasta pH_{final} 4.5, aproximadamente a las 48 h de incubación. La determinación del pH se llevó a cabo cada 12 horas por un total 2 días.

5. Extracción de pigmento

Para realizar la extracción de los pigmentos se realizaron dos secuencias de procesos:

EC. Por una extracción directa con una mezcla de disolventes orgánicos, éter:acetona:agua en una proporción de 15:75:10

CE. Llevando a cabo una centrifugación, de los residuos acidificados, previa a la extracción con el mismo sistema de disolventes

Después de la extracción, se procedió a separar el pigmento mediante una centrifugación, con lo que se obtuvieron un licor y un residuo sólido, a los cuales se les realizaron los análisis correspondientes.

Para la extracción se tomaron 10 g del residuo acidificado, químico o biológico, en un frasco con 100 mL de la mezcla de disolventes, los frascos se colocaron en una incubadora orbital a 200 rpm durante 3 h, después de este tiempo se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, y se decantó el licor. El residuo sólido se lavo con 25 mL de la misma mezcla de disolventes, se agitó en las mismas condiciones durante 30 min; posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, ambos licores se juntaron para eliminar la variabilidad. Al licor y al residuo sólido se le realizaron los estudios fisicoquímicos correspondientes

Para el proceso de centrifugación-extracción se tomaron 10 g de residuo acidificado, colocándolos en tubos para centrifuga. Esta centrifugación se realizó a 15000 rpm durante 20 min, esta operación se llevó a cabo para separar las sales. Después de la centrifugación se procedió a la extracción bajo las mismas condiciones ya descritas. Al licor y al residuo sólido se le realizaron los estudios fisicoquímicos correspondientes.

6. Análisis fisicoquímicos

6.1. pH

Para realizar la determinación del pH en la muestra se tomó 1 g del residuo y se agregaron 9 mL de agua destilada, se homogeneizó y se midió con el electrodo, se registró la lectura del potenciómetro.

6.2. Humedad.

Para este análisis se utilizó el método estándar de la AOAC (AOAC 2000), basado en la pérdida de peso de la muestra por la evaporación del agua libre. Se llevó una caja Petri a peso constante; se colocó en la balanza con ayuda de las pinzas, se registró el peso, se colocaron aproximadamente 5 g de muestra y se registró el peso. Se tomó la caja con las pinzas y se metió en el horno por 24 h a 80°C. Después de este tiempo, se sacó la caja del horno y se colocó dentro del desecador, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, registrándose el peso final. El porcentaje de humedad se determinó con la siguiente fórmula:

Donde:

A: Muestra húmeda (g)

B: Muestra seca (g)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

6.3. Cenizas.

Se empleó la técnica de calcinación en mufla convencional (AOAC 2000), fundamentada en la calcinación de la materia orgánica, quedando como residuo algunas sales minerales y óxidos, considerados como las cenizas. Para realizar

esta determinación se empleó la muestra seca utilizada en la determinación de humedad, se colocó en un crisol, previamente puesto a peso constante, con ayuda de las pinzas se colocó en la parrilla eléctrica y se calcinó hasta que la muestra no produjera humo. En este momento, se tomó el crisol con las pinzas y se llevó a la mufla durante el tiempo necesario para que la muestra quedara de color blanco y el peso no variara. Una vez que se alcanzó el peso final se sacó el crisol de la mufla y se colocó en el desecador, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se pesó y se registró el peso final. La fórmula usada es la siguiente:

Donde:

A: Peso de las cenizas (g)

B: Peso de la muestra (g)

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{A \times 100}{B}$$

6.4 Proteína total

Para la determinación de proteínas totales se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 2000) fundamentado en la digestión de la materia orgánica por el ácido sulfúrico, formándose sulfato de amonio que en presencia de NaOH libera amoníaco, que en contacto con una solución de ácido bórico forma borato de amonio, esta solución es titulada con ácido clorhídrico para determinar la cantidad de nitrógeno total liberado en la muestra. Para calibrar el método se llevó a cabo una determinación con un blanco negativo, utilizando dextrosa.

Para las determinaciones en las muestras, se pesó aproximadamente un gramo en un papel Whatman y se colocó en un matraz Kjeldahl, se le agregó 1.5 g de una mezcla catalizadora formada por los sulfatos de potasio y cúprico en una proporción 10:1, 10 mL de ácido sulfúrico y perlas de ebullición. El matraz se colocó en la parrilla y se calentó hasta que la solución tomara un color verde-azul translucido, aproximadamente por 4 h. Posteriormente se colocó la disolución en el equipo de destilación, recibiendo el destilado con ácido bórico al 4% y con indicador. La solución de ácido bórico se tituló con ácido clorhídrico, registrando el volumen necesario para llegar al vire de color. El contenido de proteína se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(V_m - V_b)(\text{meq})(N)(100)}{M}$$

Donde:

%N: nitrógeno total

V_m: volumen gastado de HCl en la muestra

V_b: volumen gastado de HCl en el blanco

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

N: normalidad de HCl

m: masa de la muestra, en gramos

Se empleó el factor 6.25 para convertir el contenido de N total a proteína total,

Por la siguiente fórmula:

$$\%P = (\%N)(6.25)$$

6.5 Grasa cruda.

Para determinar la grasa total se utilizó el método de Soxhlet (AOAC 2000), que se fundamenta en la alta solubilidad de los lípidos en los disolventes orgánicos, lo que facilita el arrastre de estos. Una vez extraído el material lipídico el disolvente es recuperado, la cantidad de grasa removida se determina por diferencia de peso de la muestra seca.

Se colocó dentro del dedal a peso constante aproximadamente un gramo de muestra, se cubrió con algodón y con ayuda de las pinzas se colocó en el equipo de extracción, en el vaso se colocó hexano (50 mL) y se adaptó en el equipo, se dejó 30 min en la posición de ebullición, después 15 min en extracción; para finalizar, se colocó en posición de enjuagar durante 15 min. Utilizando las pinzas se colocó el dedal dentro del horno para evaporar el hexano. El vaso se colocó en el equipo para recuperar el solvente. Cuando el dedal estuvo seco se pesó, la cantidad de grasa extraída se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Grasa} = \frac{(B - C) \times 100}{A}$$

Donde:

A: peso de la muestra (g)

B: peso del vaso de extracción después de secarlo en la estufa

C: peso del vaso de extracción a peso constante (g)

6.6. Xantofilas totales

Para la determinación de xantofilas totales se utilizó el método descrito en el AOAC (2000) que se fundamenta en el hecho que las moléculas de carotenoides, al tener dobles ligaduras conjugadas, absorben energía de una longitud de onda determinada, la cual es medida en un espectrofotómetro. Después de utilizar la mezcla de disolventes como blanco a 474 nm, se colocó en la celda la cantidad necesaria de muestra para hacer la lectura de absorbancia, la cual se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Xantofilas totales (mg/Kg)} = \frac{A \times D}{P \times 236} \times 1000$$

Donde:

A: absorbancia a 474 nm

D: factor de dilución=12.5= (125 mL)/(100 mL iniciales+25 mL lavado)/10 g de muestra

P: peso de la muestra

236: absortividad específica de transluteína, utilizada como referencia para xantofilas totales

1000: factor de conversión

7. Análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

El equipo HPLC empleado bajo condiciones isocráticas tuvo las siguientes características: una columna de fase reversa Symmetry (Waters) C₁₈ de 150mm de largo y 3.9 mm de diámetro interno, sistema de bombeo Waters 626, unidad de control Waters 600S, detector de arreglo de diodos Waters 994 y unidad de registro y control por PC Dell 486 utilizando programa Millennium. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo/cloroformo/metanol/agua/acido propiónico (71:22:4:2:1) y una velocidad de flujo de 1 mL/min. Esta fase móvil fue filtrada previamente con una membrana Millipore 0.45 µm resistente a disolventes orgánicos y desgasificada durante su uso en el cromatógrafo por inyección de nitrógeno gaseoso. Las fracciones obtenidas también fueron filtradas previamente utilizando filtros Gelman Acrodisc GHP de 0.45µm. Se inyectaron volúmenes de 250 µL con un tiempo total de análisis de 10 minutos. El intervalo de longitud de onda empleado fue entre 400 y 500 nm. Los cromatogramas fueron obtenidos a una longitud de onda de 474 nm que es la longitud de onda de máxima absorbancia para la astaxantina. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

8. Concentración del pigmento

Una vez obtenido el licor se concentró para retirar la mezcla de disolventes y evitar que el agua interfiera en las pruebas posteriores; se empleó un rotavapor y un baño de agua a 40°C para evitar la oxidación de los pigmentos por acción de la temperatura excesivamente alta. Al concentrarse, la grasa y el pigmento

extraídos por la mezcla de disolventes orgánicos forman un sólido. El matraz de concentración se lavó con 100 mL de acetona; el pigmento en solución acetónica se colocó en un frasco ámbar y refrigeró a 4°C para su posterior utilización.

9. Estabilidad de la astaxantina en sistemas modelo

Se emplearon dos modelos para determinar la estabilidad de las xantofilas totales y específicamente la de la astaxantina obtenida:

1. Emulsión cárnica
2. Aceite vegetal

9.1. Estabilidad en una emulsión cárnica modelo.

La emulsión cárnica consistió en 69 g de carne magra de cerdo, 16.5 g de lardo congelado, 25 g de agua fría, 3.52 g de cloruro de sodio, 0.1107 g de Acoline (emulsificador comercial) y 0.5031 g de fosfato de potasio monobásico.

Una parte de la carne, el cloruro de sodio, el fosfato de potasio y el agua fría se molieron en una licuadora por 1 min. El resto de la carne y el Acoline se molieron por separado en una licuadora; esta mezcla se incorporó a la anteriormente hecha. La pasta no debe calentarse, por lo que el molido debe hacerse por lapsos cortos de tiempo. Se consideró hecha la emulsión cárnica cuando la pasta se tenía un aspecto homogéneo.

Se pesaron aproximadamente 5 g de esta pasta en vasos pequeños, suficiente para formar 3 series de 5 vasos cada una. A cada vaso se le agregó una alícuota del concentrado del pigmento: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL respectivamente, se almacenaron a 4°C y se analizaron a las 2, 3 y 4 semanas. A cada tiempo de análisis se extrajo el pigmento colocando la pasta en un frasco ámbar con 50 mL de la mezcla de disolventes de extracción, este frasco se colocó en una agitadora orbital a 200 rpm por 3 h, después de este tiempo el licor obtenido se centrifugó (10 min a 7000 rpm) para separar la grasa extraída, el sistema de solventes con el pigmento se almacenó en frascos ámbar para analizar la concentración de astaxantina por HPLC, con la metodología ya descrita.

La concentración inicial de astaxantina en el licor fue 1118.81 mg/kg residuos (1.12 g/kg residuos). La alícuota que se colocó en cada muestra fue de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mililitros respectivamente, por tanto la concentración de xantofilas totales en cada muestra, al tiempo 0 fue: 0.112, 0.224, 0.336, 0.448 y 0.56 g/kg.

9.2. Estabilidad en aceite vegetal.

Para esta prueba, se diluyó una alícuota del concentrado en aceite de girasol, en frascos cerrados de vidrio transparente y en frascos cerrados ámbar. Se diluyeron 3 mL de concentrado en 72 mL de aceite, obteniéndose una relación de 4%^{V/V}. Un lote de los frascos, tanto transparentes como ámbar, se abrieron

cada 24 h y agitaron para incorporar aire. Otro lote de frascos ámbar y transparentes se taparon herméticamente y se conectaron al vacío para asegurar la ausencia de aire. Los frascos ámbar se protegieron contra la luz almacenándolos en latas metálicas y cubriéndolos con papel aluminio. Todo este lote se almacenó a 4°C. Una repetición de estas muestras se almacenó a 22°C. De cada frasco se tomaron 10 mL cada semana, durante 5 semanas. Una parte fue empleada para determinar xantofilas totales. La otra parte de la muestra se almacenó en congelación (-14°C) para su análisis en HPLC, con el fin de determinar la concentración de astaxantina. Para esto, al cabo de las 5 semanas se tomaron 2 mililitros de la muestra y se agregaron 10 mL de la mezcla de disolventes, se colocaron en frascos ámbar y se agitaron por tres horas a 200 rpm, pasando este tiempo se centrifugó el licor (10 min a 7000 rpm), para separar el aceite de la mezcla de disolventes; este se guardó en frascos ámbar y se analizó en HPLC.

10. Análisis estadístico.

El estudio de la secuencia óptima de extracción se llevó a cabo en un diseño de bloques divididos, donde la secuencia de proceso se tomó como el bloque principal y las fracciones obtenidas como los sub-bloques.

Para el estudio de estabilidad del pigmento en una emulsión cárnica modelo, se empleó un diseño factorial completo 5x4, consideraron las siguientes fuentes de variación:

- Concentración del extracto (0.112, 0.224, 0.336, 0.448 y 0.56 g/kg)
- Tiempo de almacenamiento (0, 2, 3, 4 semanas)

Para los estudios de la estabilidad del pigmento en aceite vegetal se empleó un modelo factorial completo $2^3 \times 5$, asignando las muestras en forma totalmente al azar. Se consideraron las siguientes fuentes de variación:

- Exposición a la luz o en oscuridad
- Temperatura de almacenamiento (4 y 20°C)
- Disponibilidad y ausencia de oxígeno
- Tiempo de almacenamiento (0, 1, 2, 3, 4 y 5 semanas)

En todos los casos, los análisis estadísticos se realizaron a un nivel de significancia $\alpha=0.05\%$, sujetándose los datos a una prueba de análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1988), este análisis se llevó a cabo por medio de un paquete estadístico SAS 1998 (SAS Institute, 1998).

Resultados.

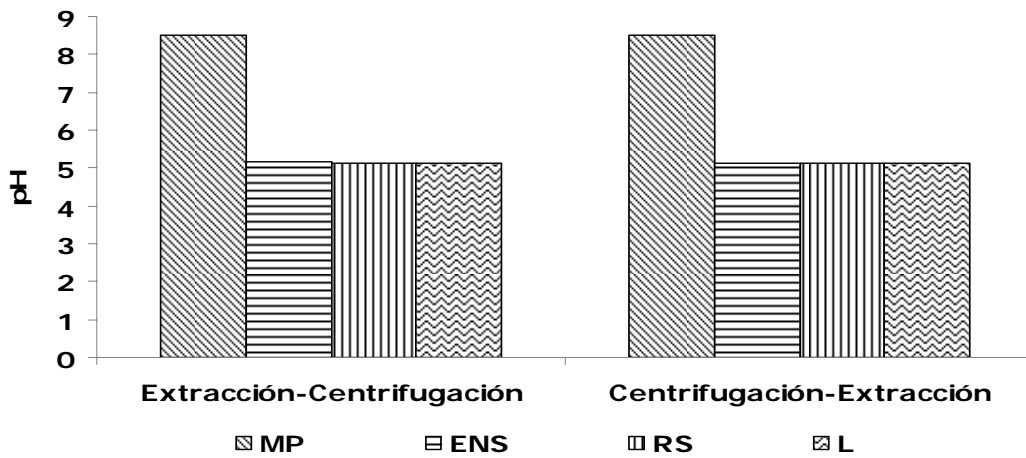
1. Ensilado biológico

Los resultados valores medios de los análisis se muestran en la Tabla 2. En esta tabla se muestran las medias para cada prueba; no se incluyeron los valores de astaxantina y astaceno, ya que se obtuvieron pocos valores lo que hace poco representativo el análisis por este método estadístico.

Tabla 2: Valores medios para las variables fisicoquímicas en ensilado biológico.

Proceso	Fracción	pH	Proteínas	Lípidos	Humedad	Cenizas
Extracción-Centrifugación	MP	8.52	35.65	6.10	76.80	39.42
	ENS	5.15	30.17	1.88	73.50	27.25
	RS	5.12	26.79	0.68	79.70	26.52
	L	5.12	3.38	1.20	na	na
Centrifugación-Extracción	MP	8.50	35.65	6.10	76.80	39.43
	ENS	5.13	30.61	6.03	72.71	27.63
	RS	5.12	27.37	2.35	67.30	26.83
	Lo	5.11	3.24	3.69	na	na

Los resultados de la tabla anterior, se presentan en las siguientes gráficas:

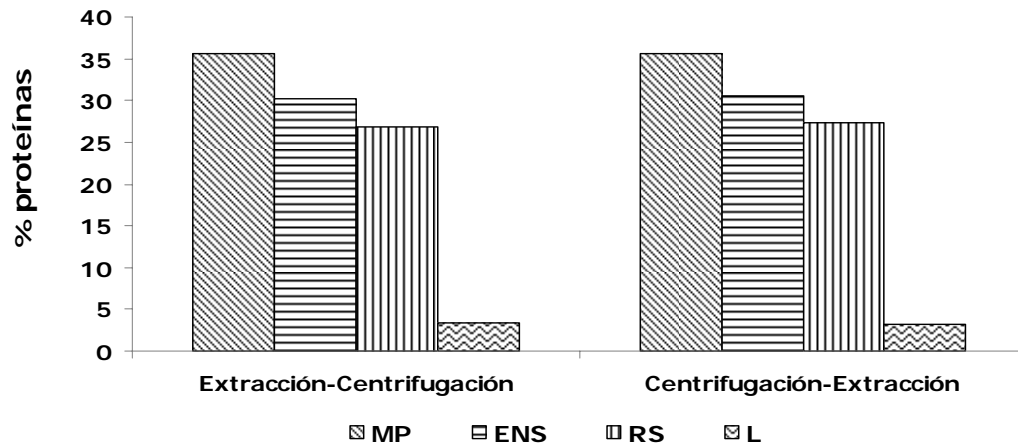


MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 7: Variación del pH en las fracciones del ensilado biológico

El pH del residuo ensilado estuvo por encima de lo que se esperaba (Figura 7), es decir 4.5, esto pudo ser por el efecto amortiguador que tienen algunos aminoácidos libres producidos durante la hidrólisis; en el licor se pudo deber a la presencia de aminoácidos libres solubles o a los disolventes orgánicos utilizados para la extracción. Otro factor que pudo afectar es que las condiciones utilizadas para incubar los residuos no fueron las óptimas para la cepa inoculada.

Estadísticamente el valor del pH para el ensilado, el residuo y el licor es igual y significativamente diferente al valor de la materia prima, lo cual es claramente uno de los objetivos principales de este método de conservación.



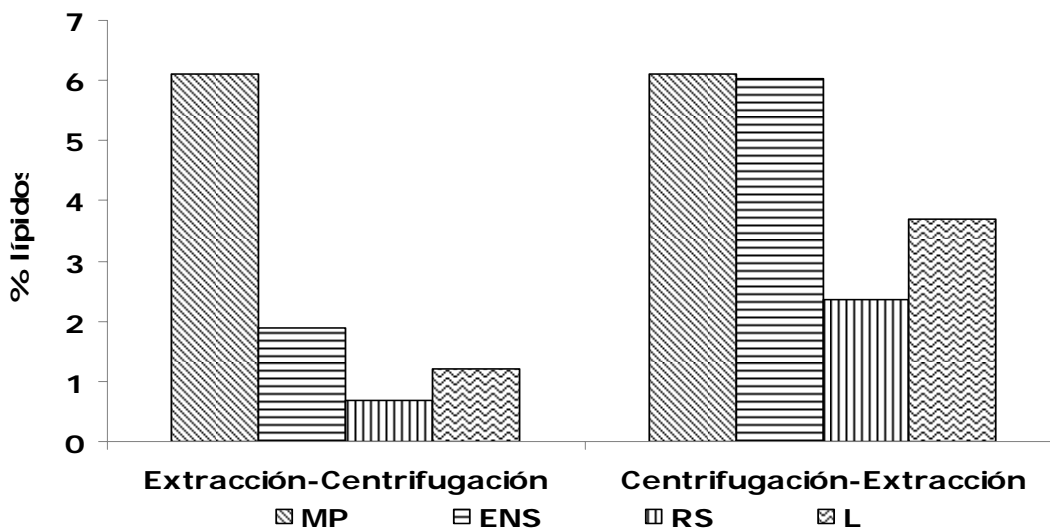
MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 8: Variación del porcentaje de proteínas en las fracciones del ensilado biológico.

Se observó que la cantidad de proteínas (Figura 8) fue menor en los residuos acidificados en comparación con la materia prima, este es otro de los

objetivos del ensilado, la hidrólisis de las proteínas. El punto final del ensilado es obtener un líquido semifluido; llegar a ese punto no fue el objetivo de este trabajo, sino romper los enlaces que unen a las xantofilas con la red de quitina.

Al comparar la cantidad de proteínas presentes en el residuo ensilado, antes y después de la extracción de pigmentos se observó que después de la extracción esta cantidad fue menor para ambos procesos. La concentración de proteínas presentes en el licor, obtenida por diferencia, pudo deberse a la presencia de aminoácidos libres disueltos en el licor o a que se volatizaran algunos aminoácidos durante el proceso.



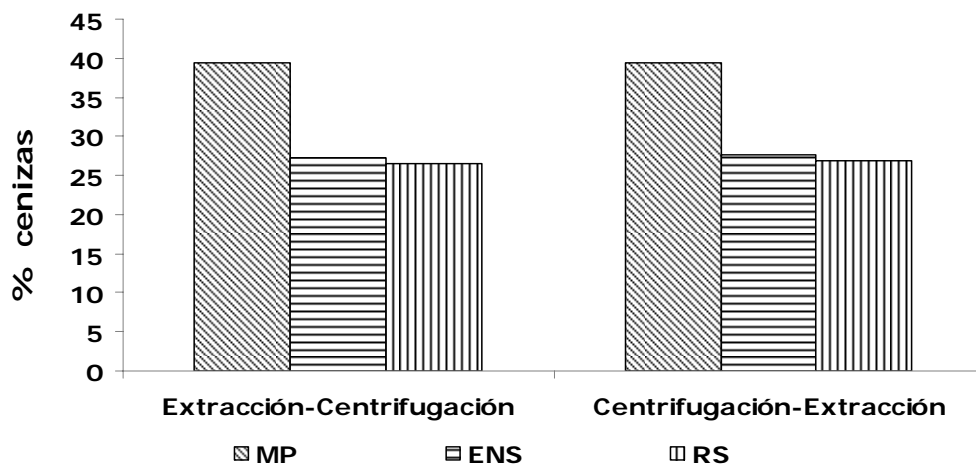
MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 9: Variación del porcentaje de lípidos en las fracciones del ensilado biológico.

Solo algunos de los ácidos grasos presentes en el camarón están unidos a la red de quitina, la mayoría esta formando parte del sistema muscular, es por esto

que la concentración obtenida de lípidos fue baja (Figura 9). Para el proceso de EC se observó una pérdida significativa de lípidos en el ensilado en comparación con el proceso de CE; esto se debe a que se eliminaron componentes como sales minerales, aminoácidos, quitina, entre otros, con la centrifugación que llevó a cabo antes de la extracción. Estos componentes dificultan la extracción de la fracción lipídica. Es por esto que en el proceso CE se obtuvo una cantidad mayor de lípidos.

Por otro lado, se observó que después de la extracción la fracción mayor de lípidos se encontró en el licor, gracias a su alta afinidad con los disolventes utilizados. La cantidad de ácidos grasos que queda en el residuo sólido debe estar aun esterificada con algún residuo de proteína o a la quitina, por lo que no fue arrastrada durante la extracción.

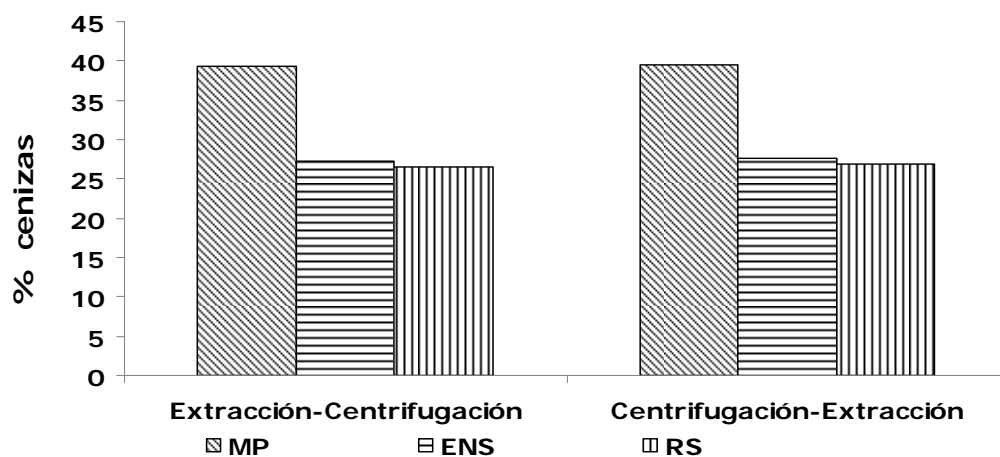


MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 10: Variación del porcentaje de humedad en las fracciones del ensilado biológico.

Aunque la humedad es significativamente diferente (Anexo 2) ($P > 0.01$), solo hay un 3% de diferencia entre la materia prima y el residuo ensilado, la cual se debió a que durante la hidrólisis las proteínas retienen moléculas de agua uniéndolas a sus grupos hidrofílicos.

Sin embargo, esta diferencia aumentó para el residuo sólido del proceso EC, en comparación con el proceso CE, posiblemente debido a que la centrifugación hecha antes de la extracción, en el segundo proceso, arrastra agua libre, dejando solo el agua fuertemente unida a la matriz quitina-proteica.



MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 11: Variación del porcentaje de cenizas en las fracciones del ensilado biológico.

En el proceso de CE, la cantidad de cenizas presentes en el ensilado y en el residuo sólido fue menor con respecto a la materia prima, debido a que durante la centrifugación son retirados los minerales que se encontraban libres, lo que hizo

que la posterior extracción fuera más eficiente. Es decir, aumente la cantidad de lípidos extraídos en el licor, y por ende las xantofilas que son solubles en el material lipídico.

2. Ensilado químico:

Los resultados obtenidos para cada prueba fisicoquímica se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Valores medios para las variables fisicoquímicas en ensilado químico.

Proceso	Combinación de ácidos	Fracción	pH	Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas
Extracción-Centrifugación	Fórmico-Acético	MP	8.83	35.65	6.10	76.83	39.42
		ENS	4.46	35.58	1.70	77.96	37.23
		RS	4.45	28.46	0.10	46.80	30.07
		L	na	7.12	1.60	na	na
Centrifugación-Extracción		MP	8.62	35.65	6.10	76.83	39.43
		ENS	4.28	34.14	4.92	79.60	34.39
		RS	4.44	27.58	1.37	69.90	25.03
		L	4.20	8.72	3.55	na	na
Extracción-Centrifugación	Fórmico-Propiónico	MP	8.77	35.65	6.10	76.83	39.42
		ENS	4.34	35.07	2.10	78.79	34.42
		RS	4.34	30.07	0.60	58.31	34.28
		L	na	5.00	1.50	na	na
Centrifugación-Extracción		MP	8.61	35.65	6.10	76.80	39.42
		ENS	4.40	34.05	3.62	79.40	33.66
		RS	4.63	27.85	1.84	69.67	27.12
		L	4.40	8.27	1.78	na	na

Las gráficas correspondientes a estos resultados se muestran a continuación:

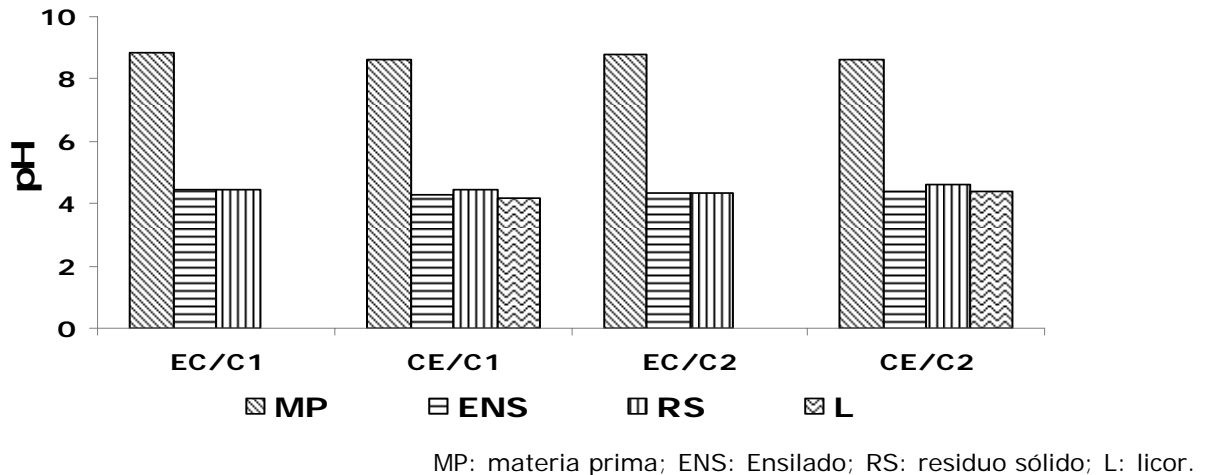
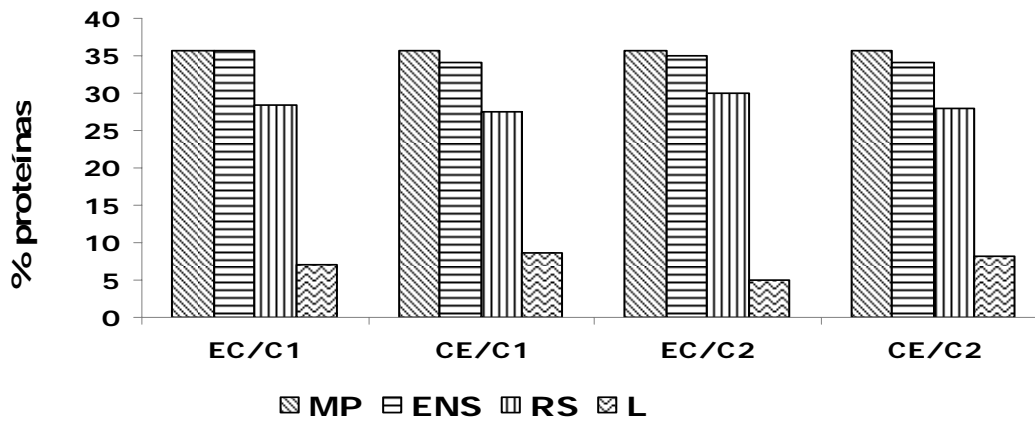


Figura 12: Variación de pH en las fracciones del ensilado químico.

El pH de la materia prima (Figura 12), aunque diferente, es estadísticamente igual para todas las fracciones ($P > 0.01$) (Anexo 4). Después de la acidificación el pH de cada fracción estuvo por debajo del límite deseado el cual era de 4.5, aunque con diferencias estadísticas entre ellos ($P < 0.0001$), al contrario de lo ocurrido en el ensilado biológico en el cual todos los valores de pH estuvieron por encima de este valor de pH.

Esta diferencia se debió a que la combinación de ácidos orgánicos tiene una capacidad acidificante mayor que el efecto búfer de los aminoácidos, permitiendo que el pH permanezca en valores debajo de 4.5.

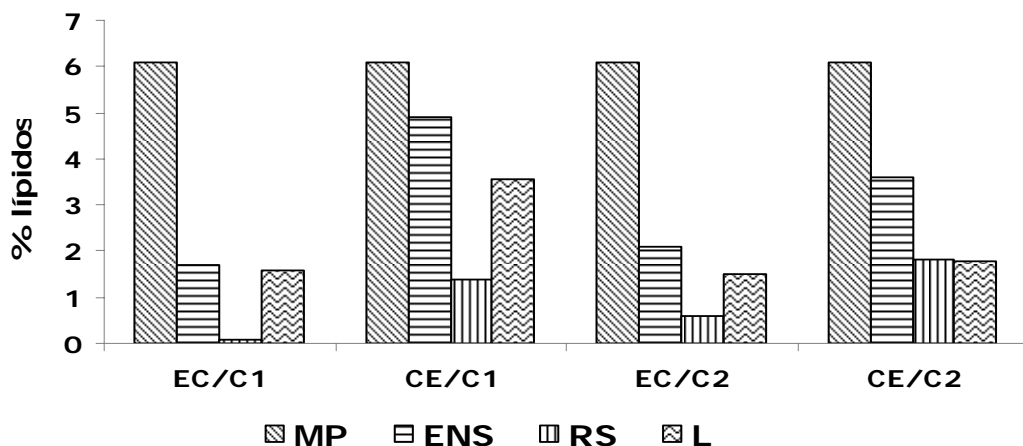


MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 13: Variación de porcentaje de proteínas en las fracciones del ensilado químico

La concentración de proteína (Figura 13) permitió observar que en el ensilado químico no hubo un proceso de hidrólisis tan marcado como en el proceso biológico, aunque el tratamiento ácido fue más severo. Esto debió ser consecuencia de que, al no haber actividad bacteriana intensa que incluya aminoácidos libres o péptidos a su metabolismo para la obtención de energía, la concentración de proteínas totales fuera estadísticamente igual ($P > 0.01$) en el residuo ensilado y en la materia prima.

Se observó una concentración baja de proteína en el licor, lo cual indicó la presencia de aminoácidos libres o péptidos solubles en los disolventes utilizados.

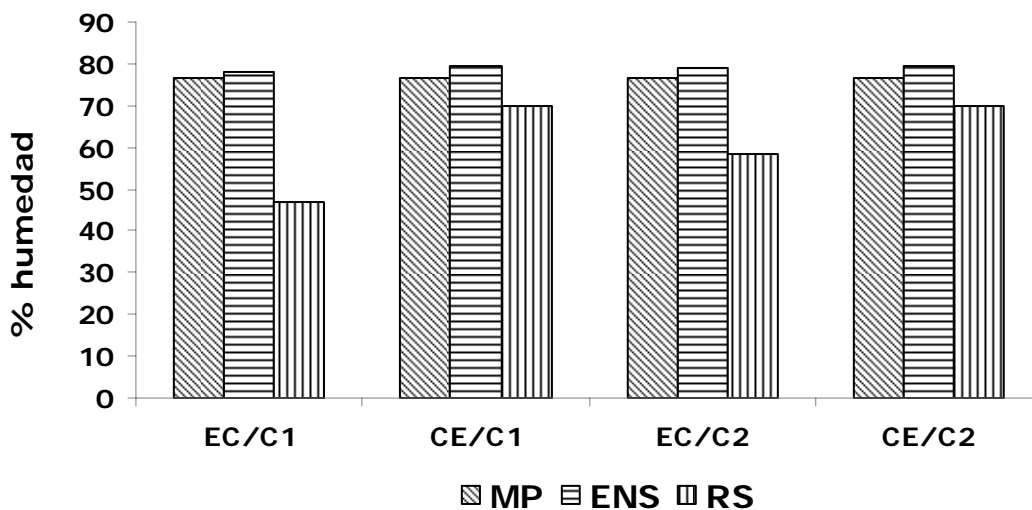


MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 14: Variación de porcentaje de lípidos en las fracciones del ensilado químico.

De forma similar que con el proceso CE, la cantidad de lípidos extraída por acción de los dos ácidos fue mayor en comparación con el proceso EC ($P < 0.0001$) (Anexo 4). Como ya se indicó, esta diferencia pudo deberse a que en la centrifugación previa a la extracción fueron eliminados los componentes que dificultan la extracción de la fracción lipídica.

Particularmente para la combinación de ácidos C2, aunque la cantidad de lípidos extraída es estadísticamente igual ($P > 0.01$), la concentración de lípidos para el licor fue mayor que en el del residuo sólido.

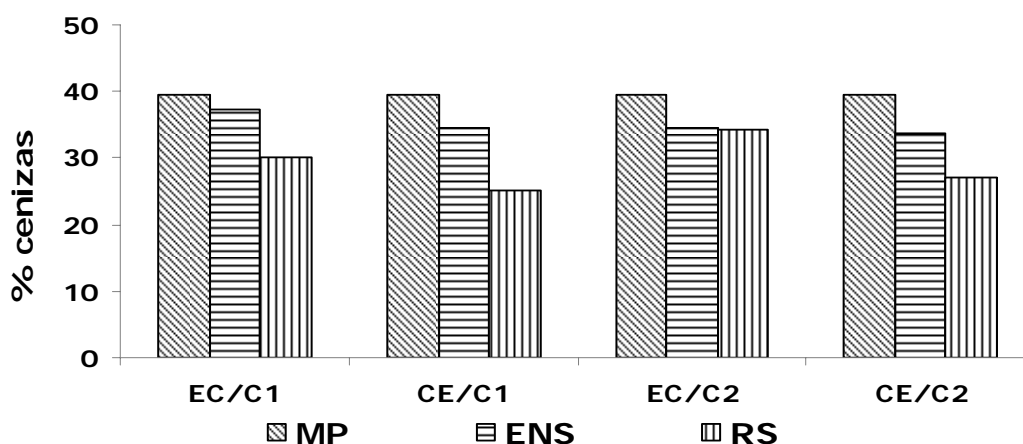


MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 15: Variación del porcentaje de humedad en las fracciones del ensilado químico.

En general, se observó que el porcentaje de humedad de la fracción ensilada es mayor que en la materia prima (Figura 15), debido a que al hidrolizarse las proteínas, estas pueden liberar moléculas de agua ligadas; por otra parte, se adicionó agua con la mezcla de ácidos.

La humedad en los residuos sólidos del proceso CE, tratados con las dos mezclas de ácidos, es mayor que en los residuos sólidos del proceso EC. Esto se pudo deber a que se eliminaron cenizas, aminoácidos y ácidos grasos libres, producidos durante la hidrólisis. Este hecho se pudo confirmar con la concentración de proteínas y lípidos en los licores de las diferentes fracciones obtenidas, y con la disminución en el contenido de cenizas en los residuos sólidos, en comparación con los residuos ensilados.



MP: materia prima; ENS: Ensilado; RS: residuo sólido; L: licor.

Figura 16: Variación del porcentaje de cenizas en las fracciones del ensilado químico.

La Figura 16 confirma lo dicho en el párrafo anterior; al llevar a cabo la centrifugación previa a la extracción se extrajeron parte de las cenizas que dificultan la extracción posterior. Se observó que la cantidad de cenizas en las fracciones del proceso CE es menor que las presentes en el proceso EC.

De acuerdo a estos resultados el ensilado químico fue más eficiente, por lo que se usó este procedimiento para las posteriores pruebas, aunque es un proceso poco amigable con el ambiente en comparación con el ensilado biológico. Es necesario, por tanto, llevar a cabo estudios posteriores para conocer las condiciones óptimas del proceso basado en una fermentación ácido-láctica (ensilado biológico).

3. Concentración de Xantofilas totales y Astaxantina en los ensilados:

En cuanto a la extracción de xantofilas obtenida, tanto en la secuencia EC como en la CE, así como en los dos procesos de acidificación, se observó que la mayor concentración estuvo en los licores en comparación con los residuos sólidos, por lo que se puede concluir que la extracción de pigmentos fue eficiente. En el caso de la secuencia EC, aunque la concentración de xantofilas fue considerable, 296.54 mg/Kg para el ensilado biológico y 432.04 y 400.53 para el ensilado químico, la extracción fue menos eficiente en los dos tipos de ensilado, debido a que se encuentran presentes los componentes que dificultan la extracción de los pigmentos, como cenizas, aminoácidos libres, péptidos, entre otros.

Con respecto al uso de ácidos en el ensilado químico, en ambas secuencias de proceso (CE y EC) se observó mayor eficiencia de extracción cuando se aplicó la combinación de ácidos fórmico-acético. Otro factor que indicó la eficiencia de la extracción, fue el bajo valor de xantofilas totales en los residuos sólidos, encontrándose la mayoría de estos pigmentos en el licor de extracción.

Es cierto que para la secuencia CE la cantidad de xantofilas totales extraídas para las dos mezclas de ácidos fue estadísticamente no significativa ($P > 0.01$), pero numéricamente el valor para C1 es mayor (Figura 18); por otro lado, la cantidad de astaxantina fue mayor en esta mezcla (Figura 20). En el caso

del ensilado biológico, la diferencia entre los procesos es mayor (Figura 17), la cantidad de xantofilas para la secuencia CE de este ensilado fue mayor a la obtenida en el ensilado químico para ambas mezclas y procesos. Sin embargo, la cantidad de astaxantina obtenida fue mayor en el proceso CE/C1 del ensilado químico (Figura 18).

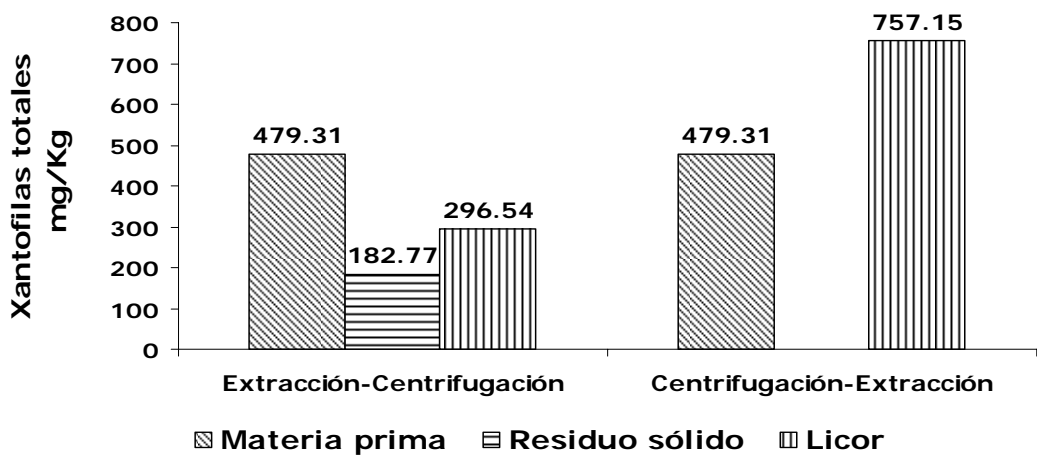


Figura 17: Concentración de xantofilas totales en el ensilado biológico.

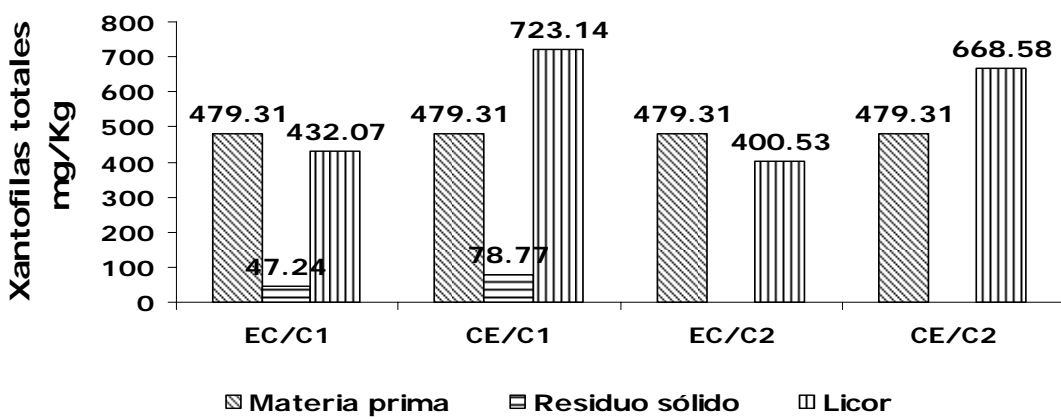


Figura 18: Concentración de xantofilas totales en el ensilado químico.

Con respecto a la concentración de astaxantina, nuevamente el proceso más eficiente es CE para ambas combinaciones de ácidos; se obtuvo mayor eficiencia con la combinación de ácidos C1 (Figura 20). Comparando los ensilados químico y microbiano, se observó que en el primero hubo una mayor concentración de astaxantina que en el segundo.

Los bajos niveles de astaceno (forma oxidada de astaxantina) indicaron que durante el proceso de extracción la astaxantina no se oxidó en forma considerable (Figura 19 y 20). Estos valores no se incluyeron en los análisis estadístico porque se contó con pocos datos, lo que impidió darles un tratamiento estadístico. Es importante resaltar los bajos valores de astaceno, los cuales se deben al ambiente reductor que tiene que propició la estabilidad de la astaxantina.

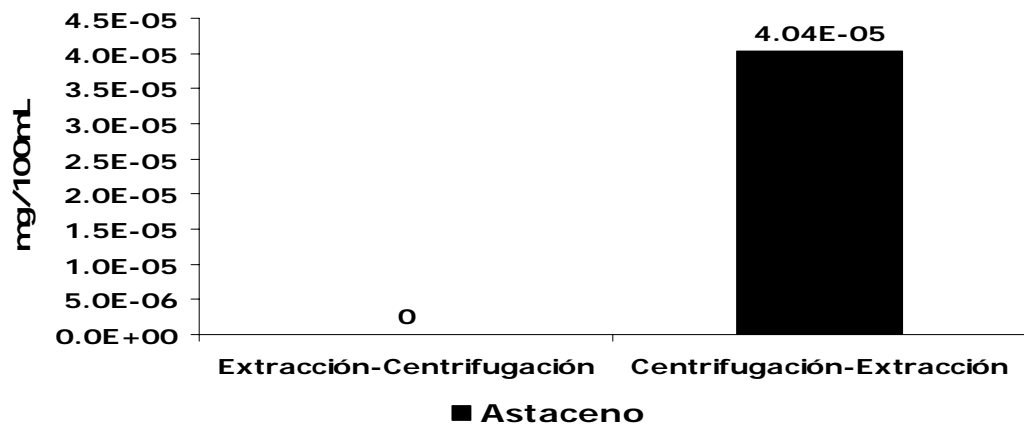
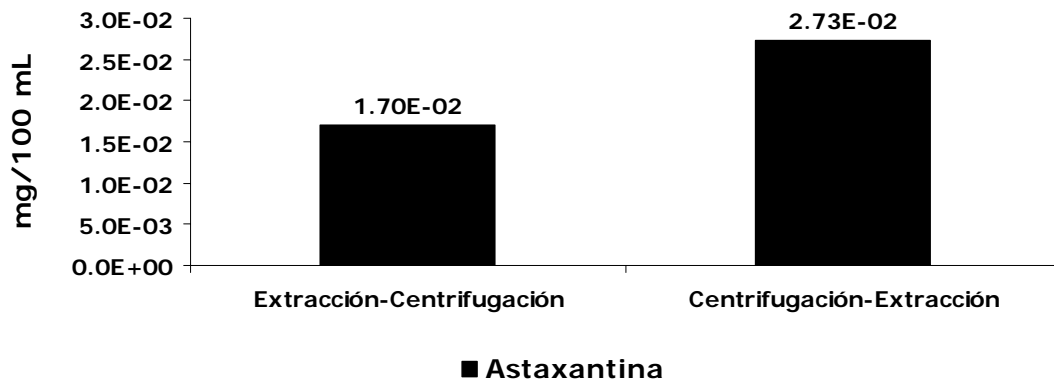


Figura 19: Concentración de astaxantina y astaceno en el licor del ensilado biológico (mg/100mL de licor)

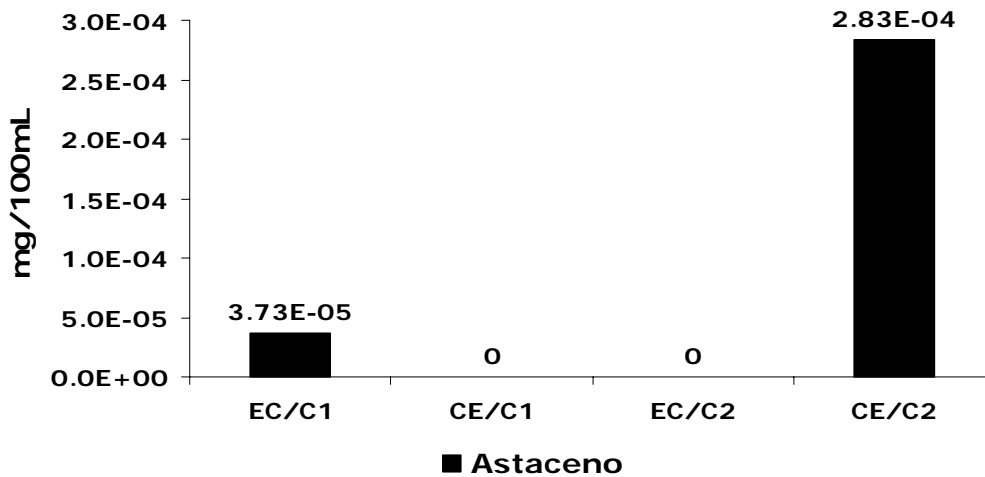
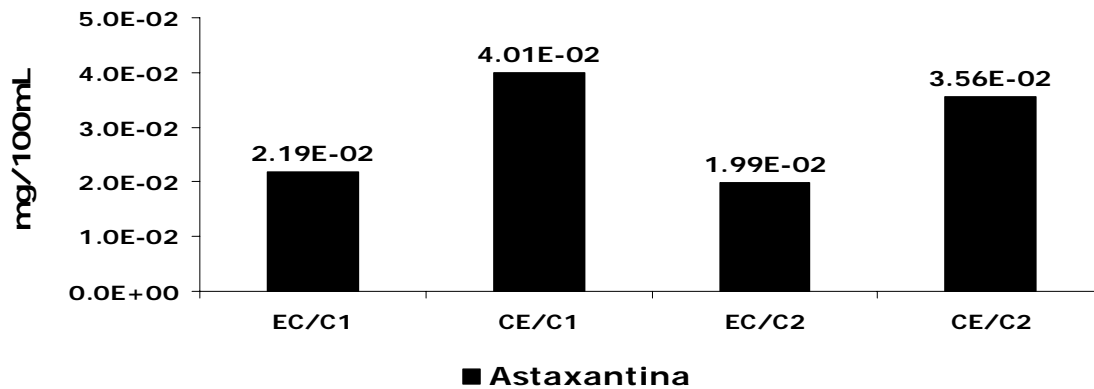


Figura 20: Concentración de astaxantina y astaceno en el licor del ensilado químico (mg/100mL de licor)

4. Pruebas de estabilidad:

Para realizar las pruebas de estabilidad de los pigmentos, estos se extrajeron por el proceso con mayor rendimiento. Por lo tanto se utilizó el método de ensilado químico, con la mezcla de ácidos C1 (fórmico-acético) y la secuencia de proceso CE (centrifugación-extracción).

4.1 Estabilidad en aceite vegetal:

En el estudio realizado por Sachindra y Mahendrakar (2005), se reportó un alto rendimiento de extracción al emplear aceite de girasol en comparación con otros aceites vegetales. Por este motivo se empleó este aceite como sistema modelo para realizar las pruebas de estabilidad.

Los carotenoides, y específicamente las xantofilas, tienen un alto número de insaturaciones en su estructura, por lo que es necesario protegerlas de los agentes oxidantes, principalmente del oxígeno, la temperatura y la luz.

En la tabla 4 se muestran los valores medios de la concentración de xantofilas totales para cada semana de la vida de almacenamiento.

Tabla 4: Valores medios de concentraciones de xantofilas totales en el aceite vegetal (mg/kg)

Temperatura °C	Disponibilidad de oxígeno	Disponibilidad de luz	Tiempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
4	SI	LUZ	198.20	180.83	174.35	168.61	149.00	147.52
25			207.40	198.51	180.30	173.08	170.76	152.99
4		OSCURIDAD	200.35	172.99	169.40	162.62	153.77	151.76
25			179.16	173.30	174.79	168.00	159.73	146.99
4	NO	LUZ	192.08	180.83	176.97	172.55	170.54	170.01
25			182.62	180.96	175.36	172.33	168.61	162.27
4		OSCURIDAD	179.64	177.32	174.22	172.03	164.98	163.71
25			191.20	188.49	183.45	181.92	177.94	176.80

Se observa que la cantidad de xantofilas totales disminuye con el tiempo de almacenamiento; esto se muestra también en la figura 21 y 22.

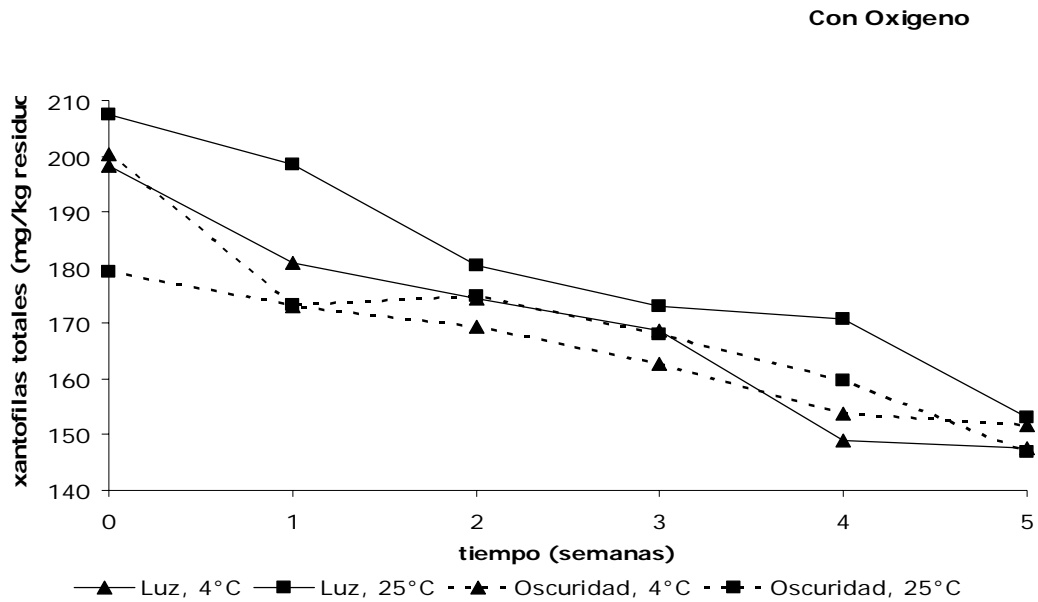


Figura 21: Concentración de Xantofilas totales en presencia de oxígeno (mg/kg de muestra).

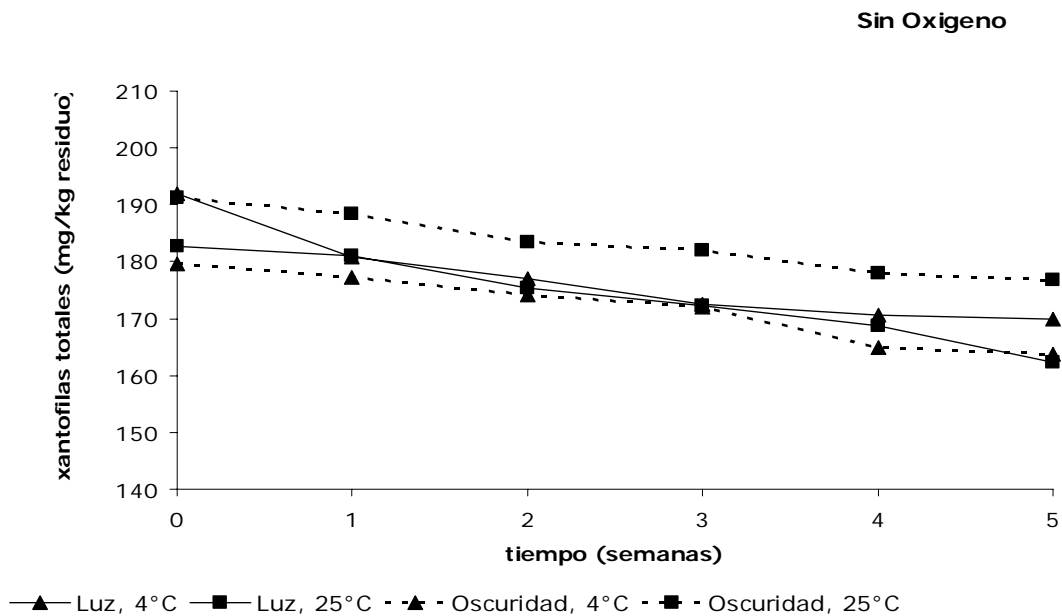


Figura 22: Concentración de Xantofilas totales en ausencia de oxígeno (mg/kg de muestra)

Se observó la tendencia negativa tanto en las muestras almacenadas en presencia como en ausencia de oxígeno (Figuras 21 y 22), lo que significa que la

cantidad de xantofilas disminuyó con el tiempo; sin embargo, en ausencia de oxígeno la velocidad con la que se degradaron las xantofilas es menor.

Por otro lado se observó que las muestras almacenadas en la oscuridad tuvieron una pendiente menor y menos variabilidad para ambas condiciones de disponibilidad de oxígeno. Cabe resaltar que las muestras almacenadas en la oscuridad, en ausencia de oxígeno y a 25°C fueron en las que se observó menor pérdida de las xantofilas.

Se observó que tanto la disponibilidad de oxígeno como la temperatura causan diferencias significativas ($P < 0.001$) en la concentración de xantofilas, pero no en la astaxantina; la disponibilidad no ocasiona diferencias significativas en ninguna de las dos variables de respuesta ($P > 0.01$) (Anexo 5). Esto es, la concentración de xantofilas totales está afectada por la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, el tiempo, pero no la luz; además fueron significativas las interacciones de oxígeno con luz y con tiempo.

La tabla 5 muestra la concentración de astaxantina en muestras almacenadas en las condiciones indicadas. De igual forma que con la concentración de xantofilas, también se observó una disminución en la concentración de astaxantina conforme avanza el tiempo de almacenamiento, es

decir hubo degradación del pigmento. Para verlo mejor se presentan las graficas correspondientes.

En las figuras 23 y 24 se observa esta disminución, aunque a diferencia de las xantofilas, hubo una menor pendiente en las muestras almacenadas con luz a 4°C, en ambas condiciones de disponibilidad de oxígeno. Esto se pudo deber a que la astaxantina es más estable que otras xantofilas presentes en el licor. Estadísticamente, se encontró que solamente el tiempo y la interacción temperatura y luz tuvieron un efecto significativo en la concentración de astaxantina ($P < 0.001$) (Anexo 6).

Las figuras 23 y 24 indican que la concentración de astaxantina no fue afectada por el almacenamiento bajo luz para ambas condiciones de oxígeno.

Tabla 5: Valores medios de concentraciones de astaxantina en el aceite vegetal (E-02 mg/100mL de licor)

Temperatura °C	Disponibilidad de Oxígeno	Disponibilidad de Luz	Tiempo					
			0	1	2	3	4	5
4	SI	Luz	3.92	3.69	3.61	3.50	3.24	3.12
25			5.08	4.77	4.67	4.38	3.76	3.65
4		Oscuridad	4.79	4.32	3.54	3.47	3.46	3.38
25			5.20	3.90	3.81	2.91	2.74	2.68
4	NO	Luz	4.22	4.18	3.98	3.90	3.52	3.44
25			5.11	4.36	3.95	3.67	3.57	3.37
4		Oscuridad	5.84	5.70	4.34	3.92	3.72	3.46
25			5.03	5.03	3.93	3.74	3.48	3.40

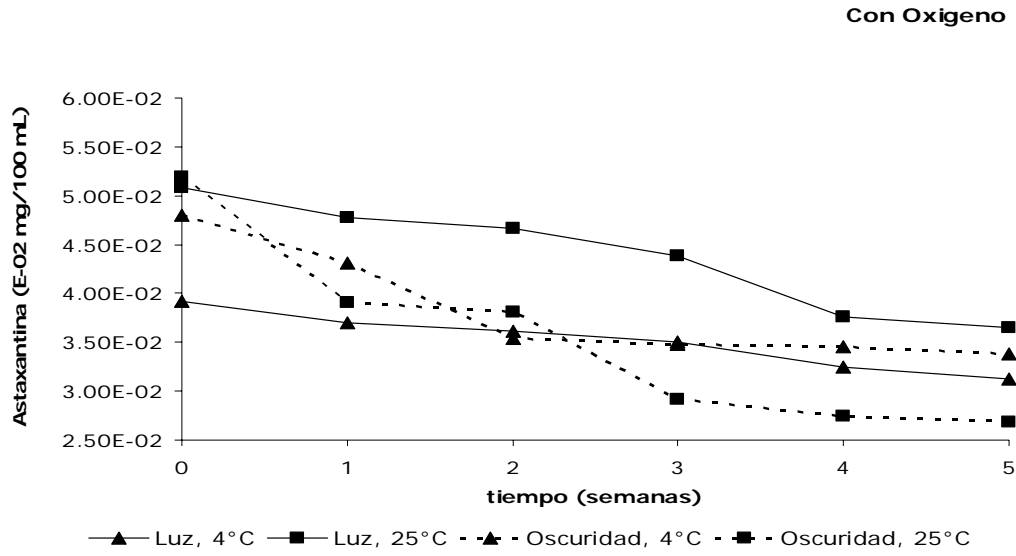


Figura 23: Concentración de astaxantina en presencia de oxígeno (mg/100mL de licor)

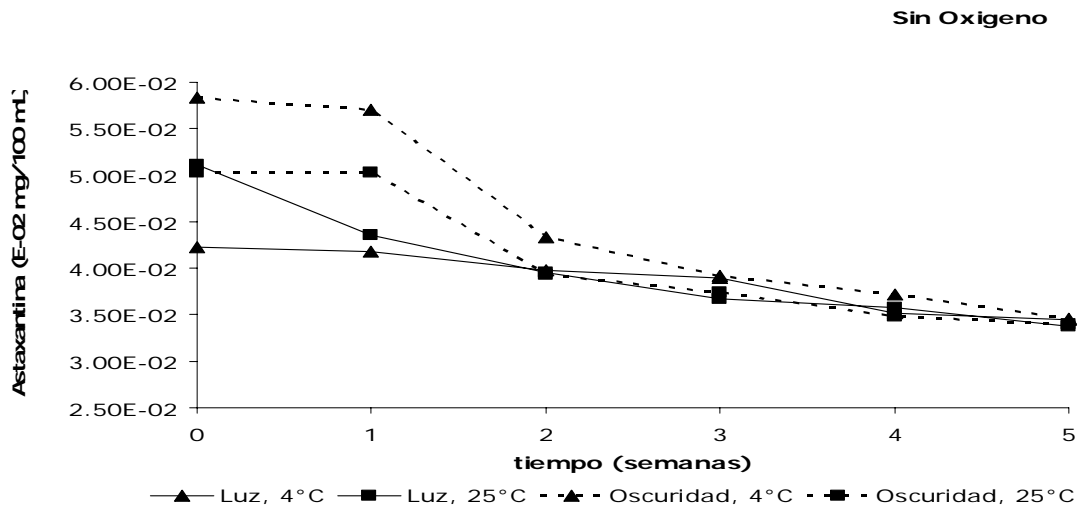


Figura 24: Concentración de astaxantina en ausencia de oxígeno (mg/100mL de licor)

4.2 Estabilidad en emulsión cárnica modelo:

La tabla 6 muestra la concentración de xantofilas totales en la emulsión cárnica modelo durante el tiempo de almacenamiento a diferentes concentraciones iniciales de xantofilas totales.

Tabla 6: Valores medios de concentraciones de xantofilas totales en la emulsión cárnica modelo (mg/kg de muestra)

Concentración inicial de astaxantina (g/kg)	Tiempo (semanas)			
	0	2	3	4
0.112	8.93	7.18	3.50	3.24
0.224	19.61	19.22	10.29	3.37
0.336	15.50	13.09	10.68	6.08
0.448	16.11	14.62	13.83	11.42
0.56	21.01	19.48	11.03	10.42

En la figura 25 se observa la disminución en la concentración de xantofilas totales; sin embargo, a una concentración inicial de 0.336 y 0.448 g/kg hubo menor degradación (pendiente menor). Las muestras con una concentración inicial de 0.224 y 0.56 g xantofilas totales / kg muestra tuvieron una disminución marcada después de la segunda semana de almacenamiento.

La poca estabilidad de las xantofilas en la emulsión cárnica puede deberse a que se producen algunos compuestos que afecten a la estructura misma de los pigmentos. Estos compuestos son producidos por la descomposición tanto de la grasa como de la carne, aunado con la presencia de oxígeno, que afecta significativamente a la estabilidad de los pigmentos estudiados.

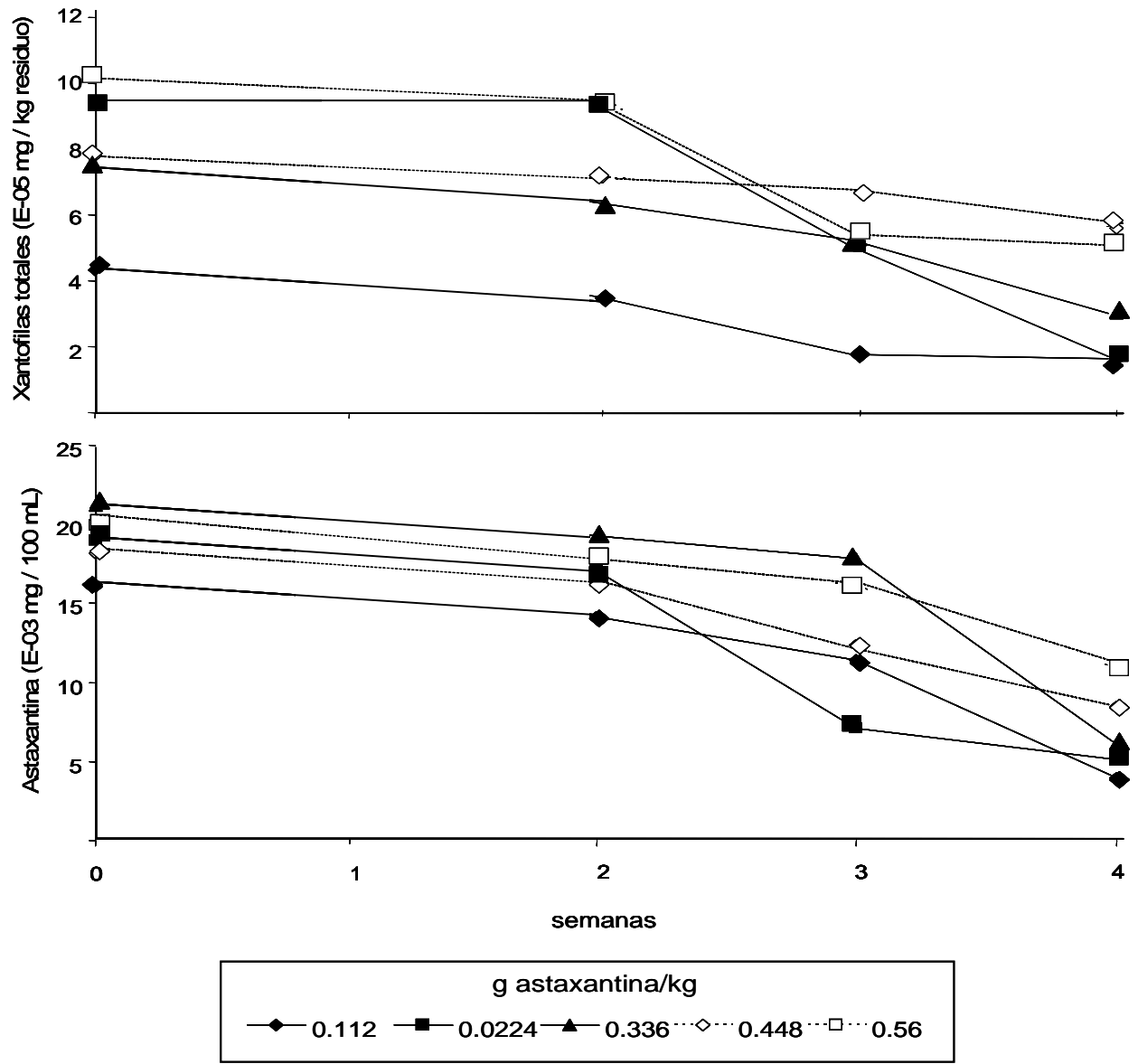


Figura 25: Concentración de xantofilas totales y astaxantina en la emulsión cárnica modelo.

Se observó una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre las concentraciones de xantofilas, tanto con respecto a la concentración inicial de astaxantina como con respecto al tiempo de almacenamiento (Anexo 8), si bien el efecto del tiempo de almacenamiento es más notable.

La tabla 7 muestra la concentración de astaxantina en la emulsión cárnica modelo con respecto al tiempo de almacenamiento.

Tabla 7: Valores medios de concentraciones de astaxantina en una emulsión cárnica modelo (mg/kg)

Concentración inicial de astaxantina (mg/ml)	Tiempo (semanas)			
	0	2	3	4
0.17	1.61E-02	1.41E-02	1.14E-02	3.93E-03
0.34	1.90E-02	1.71E-02	7.09E-03	5.13E-03
0.51	2.12E-02	1.93E-02	1.78E-02	6.10E-03
0.68	1.82E-02	1.63E-02	1.24E-02	8.47E-03
0.85	1.99E-02	1.80E-02	1.61E-02	1.09E-02

En la figura 25 se observa, al igual que en la estabilidad en aceite, que la astaxantina es más resistente que el resto de las xantofilas que componen el extracto. La pendiente de las líneas es negativa pero menor que en el caso de las xantofilas, solo el punto que va del tiempo 1 al 2 en la muestra correspondiente a la alícuota 0.2 y el que va del tiempo 2 al 3 de la alícuota 3 son los que presentan una disminución considerable.

Al igual que con la concentración de xantofilas totales, la concentración de astaxantina presentó diferencias significativas con respecto a la concentración inicial añadida, como con respecto al tiempo ($P < 0.001$) (Anexo 9), aunque la concentración inicial tuvo menor efecto en la concentración de astaxantina que en la de xantofilas totales.

Conclusiones.

Durante el proceso de acidificación la astaxantina no sufre oxidación, debido al ambiente reductor, promovido por las formas empleadas de acidificación. En el proceso de acidificación utilizando ácidos orgánicos se obtuvo una mayor concentración de xantofilas y astaxantina, debido a una mayor hidrólisis de los complejos quitina-carotenoide y proteína-carotenoide.

La combinación de ácidos más eficientes para la extracción del pigmento fue la de fórmico-acético (C1), ya que con esta se obtuvo una mayor concentración de astaxantina y menor de astaceno en los licores correspondientes.

De las dos secuencias de proceso estudiadas, con la centrifugación-extracción se obtuvo mayor cantidad de astaxantina. Algunos componentes presentes, como la quitina y las sales minerales, dificultan la extracción; estos compuestos son eliminados durante la centrifugación previa a la extracción, haciendo a este proceso más eficiente.

Para la estabilidad, tanto de xantofilas totales como para la astaxantina, las fuentes de variación más importantes fueron la presencia de luz y la disponibilidad de oxígeno; si estas condiciones se mantienen condiciones

controladas, la temperatura no juega un papel importante en cuanto a la estabilidad de los pigmentos extraídos de los residuos de camarón.

El aceite vegetal proporciona una mayor protección a la astaxantina en comparación con la emulsión cárnica, ya que al esterificarse con los ácidos grasos se forman complejos más estables. Este también es el caso de las xantofilas totales; posiblemente debido a la presencia de pigmentos menos estables se observó una mayor pérdida en la concentración xantofilas totales.

Tanto para el sistema modelo en aceite, como para la emulsión cárnica, el tiempo de almacenamiento fue la variable de mayor importancia en la estabilidad del pigmento.

Bibliografía

- Akdes, D.H., Sutrisno, N.I., Suryadi I., *Extraction of astaxanthin from giant tiger (Panaeus monodon) shrimp waste using palm oil*, Bioresource Technology 99, 4414-4419 (2008).
- AOAC. Meat and Meat Products, Capítulo 39, pp. 1.39.1.02 (humedad); 5.39.1.15 (proteína); 3.39.1.08 (grasa); 4.39.1.09 (cenizas), Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. Estados Unidos (2002).
- Armenta-López R.E. *Obtención de Astaxantina a partir de Residuos de Camarón Fermentados*, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, pp. 6-68 (2002).
- Armenta-López R.E., Guerrero-Legarreta. I., Huerta-Ochoa S., *Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex*, Journal of Food Science 67(3), 1002-1006 (2002).
- Babu C., Chakrabarti R., *Enzymatic isolation of carotenoide-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids*, LWT-Food Science and Technology 41, 227-235 (2008).
- Bhaskar N., Suresh P.V., Sakhare P.Z., Sachindra N.M., *Shrimp biowaste fermentation with Pediococcus acidolactici CFR2182: Optimization of fermentation condition by response surface methodology and effect of*

- optimized condition on deproteination/demineralization and carotenoid recovery*, *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1427-1434 (2007).
- Bjerkeng B., Peisker M., von Schwartzberg K., Ytrestøyl T., Åsgård T., *Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon (Salmo salar) fed diets with the red yeast Phaffia rhodozyma in comparison with synthetic formulated astaxanthin*, *Aquaculture* 269, 476-489 (2007).
- Chen X., Chen R., Guo Z., Li C., Li P., *The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin*, *Food Chemistry* 1001, 1580-1584 (2007).
- Cira L., Huerta S., *Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery*, *Process Biochemistry* 37, 1359-1366 (2002).
- CONAPESCA, *Plan de Manejo Para la Pesquería de Camarón en el Litoral del Océano Pacífico Mexicano*, México, pp. 6-8, 11-13 (2003).
- CONAPESCA, *Anuario Estadístico de Pesca 2005*, México, pp.16-20, 24-25, 30, 41-44, 183-185 (2005).
- De la Fuente J., Oyarzún B., *Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide*, *Fluid Phase Equilibria* 247, 90-95 (2006).
- Fagbenro, O.A., *Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads*, *Food Research International* 29(7), 595-599 (1996).
- Fang T., Wang J., *Extractibility of astaxanthin in a mixed culture of carotenoid over-producing mutant of Xanthophyllomyces dendrorhous and Bacillus*

- circulans in two-stage batch fermentation*, Process Biochemistry 37, 1235-1245 (2002).
- Fanimo A., Oduguwa O., *Protein Quality of shrimp-waste meal*, Bioresource Technology 72, 185-188 (2000).
- Fennema O., *Food Chemistry*, Marcel Dekker, 3^{ra} edición, Nueva York, Estados Unidos (1996).
- García Gómez, R.S., *Extracción de Carotenoproteínas de Cefalotórax de Camarón Empleando una Proteasa Comercial*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 9-13, 24 (1997).
- Gildberg, A., Stenberg, E., *A new process for advanced utilisation of shrimp waste*, Process Biochemistry 36, 809-812 (2001).
- Guadarrama Mendoza, P.C., *Estudio de Factibilidad Técnica Para la Obtención de Pigmentos a Partir de Cefalotórax de Camarón*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, p. 1-9, 25-48, 59-67 (1997).
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., *Haematococcus astaxanthin: application for human health and nutrition*, Trends in Biotechnology 21(5), 210-216 (2003).
- Guillou A., Khalil M., *Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (Pandalus borealis) waste*, Aquaculture 130, 351-360 (1995).

- Hagen, R.R., Einbu, A., Vårum, K.M., *A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (Pandalus borealis)*, Carbohydrate Polymers 71, 388-393 (2008).
- Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F. M., Argüelles-Monal W., *Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix*, Carbohydrate Polymers 56, 41-45 (2004).
- Kalinowski C.T., Izquierdo M.S., Schuchardt D., Robaina L.E., *Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (Pagrus pagrus) skin colour and carotenoid concentration*, Aquaculture 27, 451-457 (2007).
- Kittikaiwa, P., Powthongsook S., Pasavant P., Shotipruk A., *Encapsulation of Haematococcus pluvialis using chitosan for astaxanthin stability enhancement*, Carbohydrate Polymers 70, 378-385 (2007).
- Liu, X., Osawa, T., *Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer*, Biochemical and Biophysical Research Communications 357, 187-193 (2007).
- Luna Rodríguez, A., *Extracción con Lípidos de los Pigmentos Carotenoides del Cefalotórax de Camarón y su Evaluación como Ingrediente de Dietas en Larvicultura de Litopenaeus vannamei*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp.5-23,28-30 (2003).

- Meyers S., Benjamin G., *Feeding values of crustacean waste can be improved through proper ensilage treatment*, *Feedstuffs* 30, 12-13 (1987).
- Nageswara, R., Naseeruddin, A., Nageswara, B., *Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1076, 189-192 (2005).
- Neiva, V. H., *Introducción a la Tecnología de Productos Pesqueros*, Compañía Editorial Continental, México, pp. 102-103, 305-310 (1986).
- Oliveira J.M., Oliveira E., *Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed*, *Bioresource Technology* 98, 602-606 (2007).
- Renstrøm, B., Gunner, B, Liaaen-Jensen, S. *Natural occurrence of enantiomeric and Meso-astaxanthin 4. shrimps (*Pandalus borealis*)*, *Corap. Biochemistry and Physiology* 69B, 621-624 (1981).
- Rivera Sánchez, P. S., *Optimización de la Extracción de Pigmento de Origen Natural Proveniente de la Cabeza de Camarón*, Tesis de Maestría, FES-Cuautitlán, México (1995).
- SAS Institute, *SAS User's Guide*, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos (1998).
- Sachindra N.M., Bhaskar N., Mahendrakar N.S., *Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents*, *Waste Management* 26, 1092–1098 (2006).

- Sachindra N.M., Bhaskar N., Siddegowda G.S., Sathisha A.D., Suresh P.V., *Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste*, Bioresource Technology 98, 1642-1646 (2007).
- Sachindra N.M., Mahendrakar N.S., *Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils*, Bioresource Technology 96, 1195-1200 (2005).
- Steel, R.G., Torrie, J.H, Bioestadística: Principios y Procedimientos, McGraw-Hill, Bogotá, Colombia, (1988).
- Torrissen O., Tidermann E., *Ensiling acid: a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (Salmo gairdneri)*, Aquaculture 26, 77-83 (1981/1982).
- Zhang J., Cai Y., *Characteristic of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation*, Journal of the Science of Food and Agriculture 80,1455-1460 (2000).

Anexo.

1. Tablas de Análisis estadístico.

Anexo 1. ANOVA para el ensilado biológico

Bloque principal	Sub-bloque		Error				
Secuencia de proceso	Fracciones	Variable de respuesta	gl	MC	P> Modelo	R ²	CV
Extracción-Centrifugación	Materia prima Ensilado Residuo sólido licor	pH	8	0.00106	0.0001	0.9996	0.5463
		Proteínas	8	4.532	0.0001	0.9804	8.872
		Lípidos	8	0.5924	0.0001	0.9206	31.225
		Xantofilas	8	1853.37	0.0004	0.9235	13.4727
	Materia prima Ensilado Residuo sólido	Humedad	6	2.0293	0.0053	0.8258	1.8581
		Cenizas	6	4.2809	0.0004	0.9245	6.660
Centrifugación-Extracción	Materia prima Ensilado Residuo sólido Licor (Lo2)	pH	8	0.00285	0.0001	0.9991	0.895
	Materia prima Ensilado Residuo sólido Licor (Lo2) Licor (LR2)	Proteínas	10	2.2797	0.0001	0.9925	7.637
	Materia prima Ensilado Residuo sólido Licor (Lo2)	Lípidos	8	0.6428	0.0001	0.8561	17.654
	Materia Prima Licor (LR2)	Xantofilas	4	14518.7 9	0.0476	0.6659	19.490
	Materia prima Ensilado Licor	Humedad	6	0.4826	0.0001	0.9792	0.9613
		Cenizas	6	2.6718	0.0001	0.9490	5.223

Anexo 2. Comparación múltiple de medias de Duncan para el ensilado biológico

Bloque principal	Sub-bloque	Valores medios*					
Secuencia de proceso	Fracción	pH	Proteínas	Lípidos	Humedad	Cenizas	Xantofilas
Extracción- Centrifugación	Materia prima	8.52A	35.65A	6.10A	76.80B	39.42A	479.31A
	Ensilado	5.15B	30.17B	1.88B	73.50C	27.25B	
	Resido sólido	5.12B	26.79B	0.68B	79.70A	26.52B	182.77C
	Licor del residuo sólido	5.12B	3.38C	1.20B			296.54B
Centrifugación- Extracción	Materia prima	8.50A	35.65A	6.10A	76.80A	39.43A	479.31B
	Ensilado	5.13B	30.61B	6.03A	72.70B	27.62B	
	Resido sólido	5.12B	27.37C	2.35B	67.29C	26.83C	
	Licor de centrifugación	5.11B	3.243D	3.69B			
	Licor del residuo sólido		1.96D				757.15A

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

Anexo 3. ANOVA para el ensilado químico

Secuencia de proceso	Variable de Respuesta	Error		P> modelo	R ²	CV
		gl	MC			
Extracción- Centrifugación	pH	12	0.00481	0.0001	0.9992	1.1834
	Humedad	12	0.1018	0.0001	0.996	1.3712
	Cenizas	12	8.9208	0.0166	0.6466	8.3413
	Proteína	16	6.2471	0.0001	0.9724	9.4058
	Lípidos	16	0.0426	0.0001	0.994	8.3477
	xantofilas	12	1923.84	0.0001	0.9633	13.7264
Centrifugación- Extracción	pH	16	0.00585	0.0001	0.9988	1.405
	Humedad	12	1.1560	0.0001	0.9561	1.4265
	Cenizas	12	3.036	0.0001	0.9377	5.2531
	Proteínas	20	2.649	0.0001	0.9912	7.6805
	Lípidos	16	0.3286	0.0001	0.9359	15.6668
	Xantofilas	8	1767.53	0.0001	0.9112	7.155

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

Anexo 4. Comparación múltiple de medias de Duncan para el ensilado químico

Bloque principal	Sub-bloque	Valores medios*						
Secuencia de proceso	Fracción	Combinación de ácidos	pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Xantofilas
Extracción-centrifugación	MP	C1	8.83A	76.83B	39.42A	35.65A	6.10A	479.31A
	MP	C2	8.77A	76.83B	39.42A	35.65A	6.10A	479.31A
	ENS	C1	4.46B	78.79A	37.23A	35.57A	1.70C	
	ENS	C2	4.34B	77.96AB	34.42AB	35.07A	2.10B	
	RS	C1	4.45B	46.80D	30.07B	28.46B	0.097E	47.24B
	RS	C2	4.34B	58.31C	34.28AB	30.07B	0.60D	78.78B
	L	C1				7.11C	1.60C	432.07A
	L	C2				5.00C	1.50C	400.53A
Centrifugación-Extracción	MP	C1	8.67A	76.83B	39.43A	35.65A	6.10A	479.31B
	MP	C2	8.61A	76.80B	39.42A	35.65A	6.10A	479.31B
	ENS	C1	4.28DE	79.60A	34.39B	34.14A	4.92B	
	ENS	C2	4.40CD	79.40A	33.66B	34.05A	3.61C	
	RS	C1	4.63B	69.66C	27.12C	27.85B	1.37D	
	RS	C2	4.44C	69.90C	25.03C	27.58B	1.84D	
	Lo	C2	4.40CD			6.21C	1.78D	
	Lo	C1	4.20E			6.55C	3.55C	
	L	C1				2.17D		723.14A
	L	C2				2.06D		668.58A

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

Anexo 5. ANOVA para pruebas de estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en aceite.

Variable de Respuesta	Error		P> modelo	R ²	CV
	gl	MC			
Xantofilas	69	71.522	0.0001	0.7569	4.8608
astaxantina	69	0.000054	0.0001	0.5399	18.860

Anexo 6. Probabilidad de fuentes de variación en la concentración de xantofilas totales y astaxantina

Fuente de variación	P>	
	Xantofilas totales	astaxantina
Oxígeno	0.0043	0.1371
Temperatura	0.0157	0.9672
Luz	0.1384	0.8513
Tiempo	<0.0001	<0.0001
Oxígeno x temperatura	0.8374	0.0619
Oxígeno x luz	0.007	0.1197
Oxígeno x tiempo	0.0003	0.9959
Temperatura x luz	0.7135	0.0016
Temperatura x tiempo	0.4056	0.8314
Luz x tiempo	0.5391	0.3903

Anexo 7. Comparación múltiple de medias de Duncan para la estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en aceite.

		Valores medios*					
		Oxígeno					
		Sin		Con			
Xantofilas ¹		176.53A	171.43B				
Astaxantina ²		0.0404A	0.0381A				
		Temperatura (°C)					
		4		25			
Xantofilas ¹		171.88A	176.12B				
Astaxantina ²		0.0392A	0.0393A				
		Iluminación					
		Luz		oscuridad			
Xantofilas ¹		175.27A	172.69A				
Astaxantina ²		0.0394A	0.0391A				
		Tiempo (semanas)					
		0	1	2	3	4	5
Xantofilas ¹		191.33A	181.65B	176.105B,C	171.39C	164.41D	159.00D
Astaxantina ²		0.0489A	0.0435B	0.0395B,C	0.0365C,D	0.0342C,D	0.0329D

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

¹ mg /kg

² E-02 mg /100 mL

Anexo 8. ANOVA para pruebas de estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en una emulsión cárnica modelo.

Variable de Respuesta	Error		P> modelo	R ²	CV
	gl	MC			
Xantofilas	12	1.551E-10	0.0002	0.8650	21.5765
astaxantina	12	4.24E-06	<0.0001	0.9083	14.7978

Anexo 9. Probabilidad de fuentes de variación en la concentración de xantofilas en una emulsión cárnica modelo

Fuente de variación	P>	
	Xantofilas totales	astaxantina
Concentración del extracto	0.0016	0.0163
Tiempo	0.0003	<0.0001

Anexo 10. Comparación múltiple de medias de Duncan para la estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en una emulsión cárnica modelo.

Valores medios*					
Concentración inicial de pigmento ¹					
	0.112	0.224	0.336	0.448	0.56
Xantofilas ²	7.50A ²	6.77A	5.47A	6.34A	2.76B
Astaxantina ³	16.22A ³	13.7681A,B	16.100A	12.080B	11.38B
Tiempo (semanas)					
	0	2	3	4	
Xantofilas ²	7.86A**	7.116A	4.774B	3.34B	
Astaxantina ³	18.88A	16.96A	12.95B	6.84C	

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

¹ g astaxantina/kg emulsión

² E-05 mg/kg

³ E-03 mg/100 mL