



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**OBTENCIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES A PARTIR  
DE DESECHOS DE JAIBA (*Callinectes sapidus*)**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Samuel Mendoza Pérez**

**MÉXICO, D.F.**

**2014**





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:** Dra. María del Carmen Durán Domínguez  
**VOCAL:** M. en A.I. Landy Irene Ramírez Burgos  
**SECRETARIO:** Dra. Marisela Bernal González  
**1er suplente:** M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas  
**2 do suplente:** M. en C. Rolando Salvador García Gómez

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, (LIQAYQA) del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM

Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. María del Carmen Durán Domínguez**

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en C. Rolando Salvador García Gómez**

---

### **SUSTENTANTE:**

**Samuel Mendoza Pérez**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, pero en especial a mi madre por sus inmensos sacrificios y su apoyo incondicional durante el transcurso de mi carrera

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por la excelente formación académica recibida, así como por el desarrollo personal obtenido tanto dentro y fuera de las aulas

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la Sección 24 del AAPAUNAM por el apoyo otorgado a través de la Cátedra Fernando Orozco Díaz recibida durante el periodo de octubre de 2013 a marzo del 2014

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por su gran apoyo, confianza y consejos, por darme la oportunidad de trabajar en sus proyectos de investigación y aprender un poco de su gran experiencia y, por su tiempo y gran dedicación al revisar la tesis. Además, agradezco su intervención para poder obtener la ayuda económica para la realización de esta tesis, a través del Subprograma 217 “formación básica en investigación” de la Facultad de Química.

Al M. en C. Rolando Salvador García Gómez por su asesoría y su incondicional apoyo brindado durante toda la parte experimental, además por sus consejos y su compañía en esas largas tardes de experimentación

A la Dra. Carolina Peña Montes por el préstamo del equipo de sonicación, así como su asesoría para el empleo del mismo

A mis amigos Bisbal, Mariana, Rodrigo y Daniel por compartir su locura conmigo durante toda esta larga travesía, sin ustedes no hubiera sido lo mismo

A mis compañeros de los Laboratorios 301, 302 y 303, por su compañía durante el desarrollo de esta tesis

A los sinodales de mi jurado por tomar parte de su valioso tiempo y dedicárselo a la lectura y corrección de esta tesis

## DEDICATORIAS

---

***A mi familia por todo su amor, paciencia, apoyo y comprensión, sin ellos esto no sería posible***

***A mi padre***

***A mi madre por los increíbles e innumerables sacrificios que ha hecho para que este sueño se haga realidad ¡¡¡Te quiero mamá!!!***

---

# ÍNDICE

	Página
Glosario	x
Resumen	1
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivos	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Alcances	4
<b>CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS</b>	<b>5</b>
2.1. Cangrejo azul o jaiba ( <i>Callinectes sapidus</i> )	5
2.1.1. Características de la jaiba ( <i>Callinectes sapidus</i> )	5
2.1.2. Composición química de la jaiba	8
2.2. Panorama de la producción mundial y nacional de <i>Callinectes sapidus</i>	9
2.3. Procesamiento y subproductos de la jaiba y su utilización	11
2.4. Pigmentos en la industria química y alimentaria.	13
2.4.1. Clasificación de los pigmentos: naturales y sintéticos	14
2.4.2. Carotenoides: carotenos y xantofilas	16
2.4.2.1. Astaxantinas (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4, 4'-diona)	17
2.4.2.2. Propiedades fisicoquímicas de las astaxantinas	18
2.4.2.3. Fuentes de obtención de las astaxantinas	19
2.4.2.4. Usos y aplicaciones de las astaxantinas	22
2.4.2.5. Otros pigmentos carotenoides de origen marino	23
2.4.3. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos acuáticos	26
2.4.3.1. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando disolventes orgánicos	26
2.4.3.2. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando aceites comestibles vegetales y/o animales	27
2.4.3.3. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) por métodos microbiológicos y enzimáticos	27

2.4.3.4.	Otros métodos de extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)	28
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>30</b>
3.1.	Diseño experimental	31
3.2.	Preparación de la muestra	32
3.2.1.	Materia prima utilizada	32
3.2.2.	Procesos de despulpado, eviscerado y lavado	32
3.2.3.	Proceso de secado de los caparzones y tenazas	33
3.2.4.	Procesos de molienda de los caparzones y tenazas y tamizado de las harinas	33
3.2.5.	Desmineralización de la harina entera	33
3.3.	Análisis bromatológico de las harina enteras y desmineralizadas	34
3.4.	Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxaninas) empleando aceites vegetales comestibles	34
3.5.	Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxaninas)	35
3.6.	Análisis estadísticos de los datos experimentales	35
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
4.1.	Proceso de secado de los caparzones y tenazas	36
4.2.	Molienda de los caparzones y tenazas y tamizado de las harinas	37
4.3.	Desmineralizado de las harinas de jaiba	38
4.4.	Caracterización de las harinas de restos de jaiba	43
4.5.	Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)	51
4.6.	Porcentaje de recuperación de los pigmentos carotenoides para cada tipo de extracción	57
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>59</b>
5.1.	Conclusiones	59
5.2.	Recomendaciones	61
<b>ANEXOS</b>		<b>62</b>

<b>ANEXO 1</b>	<b>Descripción detallada de los análisis bromatológicos</b>	<b>62</b>
A.1.1.	Determinación de humedad por secado en estufa (DOF,1986)	62
A.1.2.	Determinación de cenizas (DOF, 1978)	63
A.1.3.	Determinación de proteína (DOF, 1980)	64
A.1.4.	Determinación de grasa bruta por el método Soxhlet (Nielsen, 2003)	66
A.1.5.	Determinación de fibra dietética total (Manula Sigma, 2002)	67
A.1.6.	Determinación de calcio por valoración con EDTA (Nielsen, 2003)	70
A.1.7.	Determinación de fósforo total (Nielsen, 2003)	73
A.1.8.	Cuantificación de hierro (DOF, 2011)	74
A.1.9.	Cuantificación de cloruros (Método de Mohr) (Nielsen, 2003)	76
<b>ANEXO 2</b>	<b>Acervo fotográfico</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 3</b>	<b>Curva patrón de fósforo</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 4</b>	<b>Curva patrón de hierro</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 5</b>	<b>Curva patrón de astaxantina</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 6</b>	<b>Análisis estadístico de los resultados bromatológicos</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 7</b>	<b>Diagrama ecológico</b>	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>89</b>

### Índice de Figuras y Tablas

<b>Figura 1</b>	<b>Filogenia de los decápodos (Meglitsch, 1985)</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Distribución mundial de <i>Callinectes sapidus</i> (FAO, 2013)</b>	<b>6</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Diferenciación sexual de jaiba (Velázquez y Ramírez, 2008)</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4a</b>	<b>Vista dorsal de una jaiba (Raz-Guzmán et al., 1992)</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4b</b>	<b>Vista ventral de una jaiba (Raz-Guzmán et al., 1992)</b>	<b>7</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Producción mundial anual de <i>Callinectes sapidus</i> (FAO, 2013)</b>	<b>9</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Principales especies pesqueras de México (CONAPESCA, 2012)</b>	<b>10</b>



<b>Figura 7</b>	<b>Serie histórica de la producción nacional de jaiba (2002-2012) (CONAPESCA, 2012)</b>	<b>10</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Diagrama de proceso para la obtención de la pulpa de jaiba (Morillo, 2006)</b>	<b>11</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Extracción manual de la pulpa de jaiba (Morillo, 2006)</b>	<b>12</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Estructura química de algunos carotenoides (Higuera-Ciapara et al., 2006)</b>	<b>17</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Estructura química de los isómeros de la astaxantina (Higuera-Ciapara et al., 2006)</b>	<b>19</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Estructura química del <math>\beta</math>-caroteno (Baduí, 2006)</b>	<b>24</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Estructura química del astaceno (Britton et al., 1999)</b>	<b>24</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Estructura química de la cantaxantina (Careri et al., 1999)</b>	<b>25</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Estructura química de la zeaxantina (Careri et al., 1999)</b>	<b>25</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Diagrama de flujo de la metodología realizada</b>	<b>30</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Resultado del secado a diferentes temperaturas y tiempos: A) 80°C por 3 horas, B) 100°C 2 hora y C) 110°C durante 1h</b>	<b>36</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Cambio en la coloración de los caparzones despues del secado</b>	<b>37</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Granulometría resultante de la molienda de los caparzones y tenazas</b>	<b>38</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Gráfica de % ceniza vs relación de harina: disolución a diversas concentraciones de EDTA</b>	<b>39</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Diagrama de Pareto estandarizado para el % de cenizas</b>	<b>40</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Fracción de la especie EDTA en función del pH (Gary, 2009)</b>	<b>41</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Aguas de lavado de harina desmineralizada con ácido acético al 8% (imagen izquierda) y con EDTA 1M (imagen derecha)</b>	<b>42</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Reaccion de hidrólisis de los esteres de astaxantina (Yuan y Chen,1999)</b>	<b>43</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Comparación de la composición de las harinas de jaiba</b>	<b>45</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Comparación en el contenido de calcio de las diversas harinas de jaiba.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 27</b>	<b>Concentración de pigmentos carotenoides (astaxantina)</b>	<b>52</b>
<b>Figura 28</b>	<b>Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de pigmentos carotenoides</b>	<b>53</b>
<b>Figura 29</b>	<b>Disminución de la concentración de astaxantina bajo diversas concentraciones de NaOH 0.01M (O), 0.02M (<math>\Delta</math>), 00.04M (<math>\square</math>) y 0.06M (<math>\blacktriangle</math>). Incremento de la constante de degradación conforme se aumentó la concentración de NaOH (Yuan y Chen, 1999)</b>	<b>54</b>

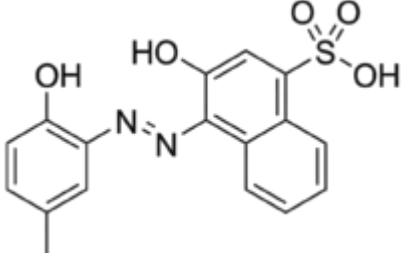
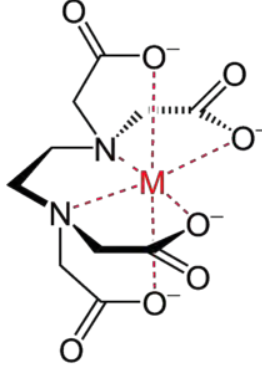
<b>Figura 30</b>	<b>Concentración de astaxantina (<math>\mu\text{g/g}</math>) en función del ajuste de pH (Herrera-Andrade et al., 2011)</b>	<b>54</b>
<b>Figura 31</b>	<b>Cantidad de pigmentos (astaxantina) obtenidos por cada gramo de harina</b>	<b>55</b>
<b>Figura 32</b>	<b>Porcentaje de recuperación de astaxantina para cada tipo de extracción</b>	<b>57</b>
<b>Figura A.2.1</b>	<b>Muestra de jaiba fresca</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.2</b>	<b>Eviscerado de la jaiba</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.3</b>	<b>Acomodamiento de los restos de jaiba</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.4</b>	<b>Molienda de los restos de jaiba</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.5</b>	<b>Tamizado de las harinas de jaiba malla 40 y 80 (<math>420\mu\text{m}</math> y <math>177\mu\text{m}</math> respectivamente)</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.6</b>	<b>Harina tamizada de jaiba</b>	<b>77</b>
<b>Figura A.2.7</b>	<b>Desmineralizado de las harinas con EDTA dibásico de sodio</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.8</b>	<b>Filtrado de la harina desmineralizada empleando tela de poro pequeño y que no suelte pelusa</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.9</b>	<b>Secado de harinas desmineralizadas</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.10</b>	<b>Comparación de harinas de jaiba</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.11</b>	<b>Calcinado de las harinas para determinación de cenizas</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.12</b>	<b>Determinación de calcio mediante titulación con EDTA</b>	<b>78</b>
<b>Figura A.2.13</b>	<b>Determinación de cloruros por el método de Mohr</b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.14</b>	<b>Determinación de proteína por el método de Kjeldahl</b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.15</b>	<b>Cuantificación de grasa mediante el método de Soxhlet</b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.16</b>	<b>Determinación de fibra dietética total mediante el método gravimétrico enzimático</b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.17</b>	<b>Elaboración de solución patrón de astaxantina para la curva estándar</b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.18</b>	<b>Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) mediante calentamiento a <math>80^{\circ}\text{C}</math></b>	<b>79</b>
<b>Figura A.2.19</b>	<b>Extracción de los pigmentos mediante agitación/24 horas</b>	<b>80</b>
<b>Figura A.2.20</b>	<b>Extracción de los pigmentos mediante sonicación</b>	<b>80</b>
<b>Figura A.2.21</b>	<b>Centrifugado de las muestras</b>	<b>80</b>
<b>Figura A.2.22</b>	<b>Cuantificación de los pigmentos carotenoides</b>	<b>80</b>
<b>Figura A.3</b>	<b>Curva patrón de fósforo total a <math>660\text{nm}</math></b>	<b>81</b>

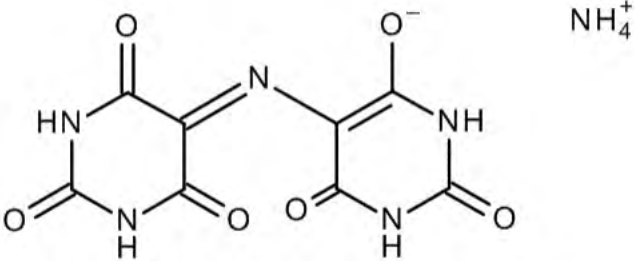
<b>Figura A.4</b>	<b>Curva patrón de hierro</b>	<b>82</b>
<b>Figura A.5</b>	<b>Curva patrón de astaxantina</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 1</b>	<b>Composición de la parte comestible del cangrejo azul o jaiba (Kirk et al., 2009)</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Análisis aproximado o bromatológico de jaibas enteras (Otwell y Koburger, 1985)</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Composición aproximada o bromatológica de los desechos de jaiba (Morillo et al., 2006)</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>Especificaciones para el uso de pigmentos sintéticos en México (DOF, 2012)</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 5</b>	<b>Concentración de astaxantina en diversos crustáceos</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 6</b>	<b>Diseño experimental propuesto para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina)</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 7</b>	<b>Diseño experimental propuesto para el análisis de los componentes de las harinas de jaiba</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 8</b>	<b>Resultados de las pruebas de desmineralización</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 9</b>	<b>Análisis de varianza para el % de cenizas</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 10</b>	<b>Análisis bromatológico de las harinas de caparazón y de las tenaza de jaiba</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 11</b>	<b>Composición mineral de las harinas de jaiba</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 12</b>	<b>Concentración de pigmentos carotenoides en diferentes tipos de harina de desechos de jaiba</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 13</b>	<b>Análisis de Varianza entre la concentración de pigmentos carotenoides obtenidos de los diferentes tipos de harina</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 14</b>	<b>Comparación del contenido de astaxantinas obtenidas en la presente investigación contra lo reportado en la literatura</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 15</b>	<b>Análisis de varianza para el porcentaje de recuperación de cada tipo de extracción</b>	<b>58</b>
<b>Tabla A 6.1</b>	<b>ANDEVA para % cenizas por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.2</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % cenizas por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.3</b>	<b>ANDEVA para humedad por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.4</b>	<b>ANDEVA para % proteína por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.5</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % proteína por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.6</b>	<b>ANDEVA para % grasa por tipo de harina</b>	<b>84</b>
<b>Tabla A 6.7</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % grasa por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.8</b>	<b>ANDEVA para % fibra por tipo de harina</b>	<b>85</b>

<b>Tabla A 6.9</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % fibra por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.10</b>	<b>ANDEVA para % carbohidratos por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.11</b>	<b>ANDEVA para % calcio por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.12</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % calcio por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.13</b>	<b>ANDEVA para % fósforo por tipo de harina</b>	<b>85</b>
<b>Tabla A 6.14</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % fósforo por tipo de harina</b>	<b>86</b>
<b>Tabla A 6.15</b>	<b>ADEVA para contenido de Fe por tipo de harina</b>	<b>86</b>
<b>Tabla A 6.16</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para contenido de Fe por tipo de harina</b>	<b>86</b>
<b>Tabla A 6.17</b>	<b>ANDEVA para % NaCl por tipo de harina</b>	<b>86</b>
<b>Tabla A 6.18</b>	<b>Pruebas de múltiple rangos para % NaCl por tipo de harina</b>	<b>86</b>

**Esta investigación usa el punto decimal (DOF, 2009)**

## GLOSARIO

<p>Calmagita</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>La calmagita es estable en disolución acuosa, es un ácido triprótico, <math>H_3In</math>, y el grupo sulfónico está altamente disociado en disolución acuosa; los colores son para <math>H_2In^-</math> rojo, <math>HIn^{2-}</math> azul e <math>In^{3-}</math> anaranjado-rojizo. Tomado de las redes internacionales (p. 165): <a href="http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Julio_2011/IF_BARRETO_PIO_FIARN/CAP.%20IX.PDF">http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Julio_2011/IF_BARRETO_PIO_FIARN/CAP.%20IX.PDF</a></p>
<p>Valoración complejométrica con EDTA</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Complejo Metal-EDTA</p> <p>El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA o AEDT), tiene cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino que pueden actuar como donantes de pares de electrones o bases de Lewis. La capacidad del EDTA, para potencialmente donar hasta sus seis pares de electrones libres a los cationes metálicos, para la formación de enlaces covalentes coordinados hace del EDTA un ligando hexadentado. Sin embargo, en la práctica el EDTA está, por lo general, sólo parcialmente ionizado y, por lo tanto, forma menos de seis enlaces covalentes coordinados con los cationes metálicos.</p> <p>El EDTA dibásico de sodio se utiliza comúnmente para estandarizar las soluciones acuosas de cationes metálicos de transición. El EDTA dibásico de sodio (a veces escrito como <math>Na_2H_2Y</math>) sólo forma cuatro enlaces covalentes coordinados con los cationes metálicos a valores de <math>pH \leq 12</math>. En este rango de <math>pH</math>, los grupos amino permanecen protonados y por lo tanto no pueden donar electrones para la formación de enlaces covalentes coordinados. Debe tenerse en cuenta que la forma abreviada <math>Na_{4-x}H_xY</math> puede utilizarse para representar una especie de EDTA, donde <math>x</math> designa el número de protones ácidos unidos a la molécula de EDTA. El EDTA forma un complejo octaédrico con la mayoría de los cationes metálicos divalentes, <math>M_{2+}</math>, en solución acuosa. La principal razón de que el EDTA se utilice tan ampliamente en la estandarización de soluciones de</p>

	<p>cationes metálicas es que la constante de formación de la mayoría de los complejos catión metálico-EDTA es muy alta, lo que significa que el equilibrio de la reacción:</p> $M^{2+} + H_4Y \rightarrow MH_2Y + 2H^+$ <p>se encuentra muy desplazado hacia la derecha. Llevar a cabo la reacción en una solución amortiguadora básica elimina los <math>H^+</math>, conforme se van formando, lo que también favorece la formación del producto de reacción catión metálico-EDTA. Para la mayoría de los propósitos se puede tener en cuenta que, la formación del complejo catión metálico-EDTA es completa, y es por esto por lo que el EDTA se utiliza en las valoraciones / estandarizaciones de este tipo. Para llevar a cabo las valoraciones de cationes metálicas utilizando EDTA, casi siempre es necesario utilizar un indicador complejométrico para determinar cuándo se ha alcanzado el punto final. Los indicadores más comunes son colorantes orgánicos como el Negro sulfónico, Negro eriocromo T, Rojo eriocromo B o murexida. Estos colorantes se unen a los cationes metálicos en solución para formar complejos coloreados. Sin embargo, como el EDTA se une a los cationes metálicos mucho más fuertemente que al colorante utilizado como indicador, el EDTA se desplaza el colorante de los cationes metálicos de la solución analito. Un cambio de color en la solución que está siendo valorada indica que todo el colorante ha sido desplazado de los cationes metálicos en solución, y que se ha alcanzado el punto final. De esta forma, el indicador libre (más que el complejo metálico) sirve como indicador de punto final.</p> <p>Tomado de las redes internacionales: <a href="http://es.wikipedia.org/wiki/Valoraci%C3%B3n_Complejom%C3%A9trica">http://es.wikipedia.org/wiki/Valoraci%C3%B3n_Complejom%C3%A9trica</a></p>
Murexida	<div style="text-align: center;">  </div> <p>La murexida o purpurato de amonio es un indicador para valorar metales.</p> <p>Tomado de las redes internacionales :</p> <p><a href="http://www.merckmillipore.com.mx/chemicals/murexida/MDA_CHEM-106161/spanish/p_0u2b.s1LthYAAAEWtOEFvhtI">http://www.merckmillipore.com.mx/chemicals/murexida/MDA_CHEM-106161/spanish/p_0u2b.s1LthYAAAEWtOEFvhtI</a></p>
Cavitación	<p>Formación de burbujas de vapor o de gas en el seno de un líquido, causada por las variaciones que éste experimenta en su presión.</p> <p>Tomado de las redes internacionales:</p> <p><a href="http://lema.rae.es/drae/?val=cavitaci%C3%B3n">http://lema.rae.es/drae/?val=cavitaci%C3%B3n</a></p>

## RESUMEN

La captura de crustáceos en México ha aumentado a través de los años debido a la demanda nacional e internacional cada vez mayor de la pulpa de estos productos. Desafortunadamente, los subproductos que genera esta industria no son utilizados y se eliminan al ambiente produciendo una fuente de contaminación. Éste es el caso de la jaiba (*Callinectes sapidus*) en la cual el porcentaje de desechos oscila entre el 86-90%. Estos desechos son ricos en productos de valor agregado como lo son las proteínas, la quitina y los pigmentos. En particular, estos últimos son de un gran interés debido a la tendencia mundial en el uso de pigmentos naturales. Por ello, existen gran cantidad de estudios conducentes a la extracción de pigmentos carotenoides a partir de desechos de crustáceos. En la presente investigación se emplearon los residuos de jaiba para extraer pigmentos carotenoides (astaxantinas), utilizando tecnologías amigables con el ambiente. Dada la escasa información sobre las condiciones adecuadas de desmineralización así como los efectos que este proceso tiene sobre los residuos de jaiba, se realizó la evaluación bromatológica de las harinas resultantes de dos tratamientos desmineralizantes (desmineralización con EDTA o con ácido acético) y se les comparó con unas harinas “enteras” (sin tratamiento desmineralizante). Debido a que el empleo de desechos de jaiba para obtener pigmentos carotenoides no ha sido estudiado ampliamente como es el caso de los del camarón, otro crustáceo, se evaluaron tres métodos de extracción: agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, calentamiento a 80°C/15 minutos y sonicación a 20kHz/6 minutos, empleando aceite de soya como disolvente. Adicionalmente, se estudiaron también dos relaciones de harina:aceite las cuales fueron 1:10 y 1:100. Entre los resultados obtenidos, se puede mencionar que la mejor desmineralización de las harinas de jaiba se obtuvo al emplearse una solución de EDTA dibásico de sodio en una concentración 1M, obteniéndose harinas con solamente un 1.4% de cenizas. Por otra parte, al desmineralizar utilizando ácido acético al 8% (V/V) solamente fue posible obtener harinas con un 36.7% de cenizas. Al realizar los análisis de varianza (ANDEVA) de una vía ( $\alpha=0.05$ ), se encontró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de grasa, proteínas, fibra y cenizas. Esto se debió al pH alcalino de la solución de EDTA dibásico, lo que ocasionó la pérdida de estos componentes. Lo anterior se comprobó mediante las pruebas de rangos múltiples ( $\alpha=0.05$ ), donde se encontró que los contenidos de grasa y de proteínas fueron estadísticamente iguales para las harinas enteras y las harinas desmineralizadas con ácido acético. Respecto del contenido inorgánico (minerales) los valores del ANDEVA correspondientes indicaron la existencia de una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) en el contenido de todos los minerales analizados (calcio, cloruros, hierro y fósforo). Finalmente, la cantidad más alta de pigmentos carotenoides (astaxantinas) extraídos en el extracto oleoso, fue de 6.89µg/mL o, medido en masa, de 184µg/g a partir de las harinas enteras mediante un calentamiento a 80°C. Este contenido máximo de pigmentos carotenoides fue superior a lo reportado en otras investigaciones de la literatura. El análisis multivariable, que se realizó para evaluar las diversas condiciones de extracción, indicó la presencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) para los factores: tipo de harina y la relación harina:aceite y no así para el factor tipo de extracción; sin embargo, para la triple interacción entre el tipo de harina, la relación harina:aceite y el tipo de extracción sí hubo una diferencia significativa.

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Justificación

La explotación de los productos marinos constituye uno de los rubros económicos de mayor importancia para los países que, gracias a su situación geográfica, tiene costas en dos océanos como es el caso de México. Por ello, el aprovechamiento de las especies marinas, sobre todo de los crustáceos es de gran relevancia (Cabello et al., 2005).

Sin embargo, el proceso de captura e industrialización de alimentos de origen marino deja residuos o subproductos al ambiente que no son aprovechados en su totalidad. Entre estos casos están los crustáceos, como el camarón (*Litopenaeus spp.*) o el cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*). En el caso de la jaiba solamente se aprovecha entre un 10-20%, dejando sin uso aproximadamente el 80% de la masa corporal que constituyen el caparazón, las patas y el abdomen, los cuales pueden tener un valor agregado. Estos desechos son ricos en quitina, carbonato de calcio y pigmentos carotenoides siendo estos últimos el objeto de estudio de la presente investigación (Flores, 2008; Zakaria et al., 1998).

Las astaxantinas son algunos de los pigmentos carotenoides presentes en mayor proporción en los crustáceos (Félix-Valenzuela, 2001; Higuera-Ciapara et al., 2006). El mercado mundial para este pigmento se estima entre 150-200 millones de dólares anuales (Higuera-Ciapara et al., 2006). Sin embargo, la creciente demanda de alimentos naturales y el alto costo y daños potenciales a la salud de los pigmentos sintéticos ha estimulado la búsqueda de las fuentes naturales de estos pigmentos.

En México, la captura de jaiba se encuentra en el décimo lugar de participación de la producción pesquera, siendo de 23,668 toneladas anuales (CONAPESCA, 2011). El caparazón de jaiba es utilizado parcialmene como alimento balanceado para ganado de engorda; sin embargo, gran parte es desechado en las zonas cercanas a las plantas



procesadoras o directamente al mar. Según Krantz (1983), muchos de los desechos flotan en el agua de ríos o lagunas causando contaminación no solamente superficial, sino también generando una alta demanda de oxígeno en el agua eliminando una parte de la flora y la fauna o biota acuáticas que dependen del oxígeno disuelto para sobrevivir.

La forma en que algunos autores han obtenido los pigmentos encontrados en crustáceos ha sido por métodos químicos mediante la extracción usando disolventes orgánicos (Gilchrist y Lee, 1972; Jiménez, 2003; Shahidi y Synowiecki, 1991); métodos enzimáticos (Armenta et al., 2002; Duarte-de-Holanda y Netto, 2006; Gildberg y Stenberg, 2001; Ramírez, 2003); métodos de extracción con aceites vegetales y/o animales, como los de soya o girasol o pescado (Chen y Meyers, 1982; Luna, 2003, Torres-Aguirre, 2007) y empleando CO<sub>2</sub> supercrítico (Félix-Valenzuela et al., 2001; Gouveina et al., 2007). A últimas fechas, la técnica que está siendo cada vez más utilizada para la extracción de pigmentos naturales es la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la cual es un método eficiente aunque debe seguirse investigando ya que se generan subproductos de degradación al aplicar ultrasonido a las astaxantinas (Zhao et al., 2006).

Es por ello que en la presente investigación se plantea la extracción de pigmentos carotenoides (astaxantina) a partir de desechos de caparzones y tenazas de jaiba empleando aceites comestibles para su extracción. La finalidad es aprovechar estos residuos generando un producto de alto valor agregado para la industria alimentaria empleando tecnologías amigables con el ambiente.

## **1.2. Objetivos**

### **Objetivo general**

Obtener pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de residuos de jaiba empleando una extracción sólido-líquido con aceite de soya como disolvente.

## **Objetivos particulares**

- Conocer las mejores condiciones de desmineralización empleando EDTA o ácido acético para conocer si este proceso ayuda a mejorar la extracción de los pigmentos carotenoides
- Determinar la eficiencia de extracción de los pigmentos carotenoides empleando como disolvente aceite de soya
- Evaluar el mejor método de extracción mecánica y/o sónica de los pigmentos carotenoides
- Evaluar los cambios en la composición bromatológica de las harinas debidos a los diferentes tratamientos desmineralizantes

### **1.3. Hipótesis**

Por medio de la extracción mecánica y/o sónica empleando aceites vegetales comestibles será posible la obtención de pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos de jaiba (*Callinectes sapidus*).

### **1.4. Alcances**

Se estudiará solamente la eficiencia de los diversos métodos de extracción propuestos en la metodología. Durante las extracciones se fijó un tiempo de proceso de acuerdo con lo recomendado por la literatura pero no se estudiaron las condiciones óptimas para cada tipo de extracción. Toda la fase experimental es a escala de laboratorio.

## CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS

### 2.1. Cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*)

#### 2.1.1. Características del cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*)

El cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*) es un crustáceo perteneciente al orden de los decápodos, familia que incluye a las langostas, a los langostinos y a los camarones. Tal como se aprecia en la Figura 1 pertenece al *Phylum* Artrópoda (Meglitsch, 1985)

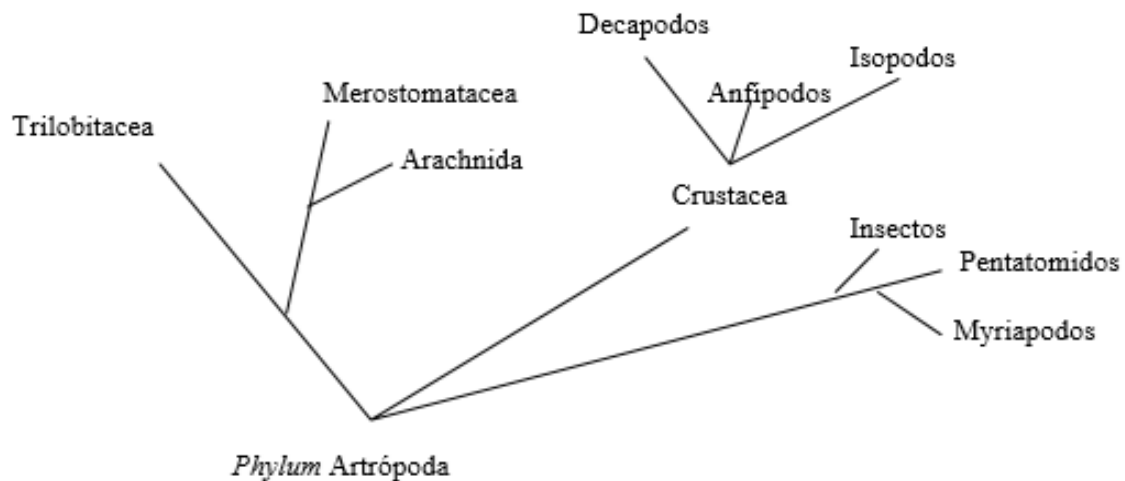
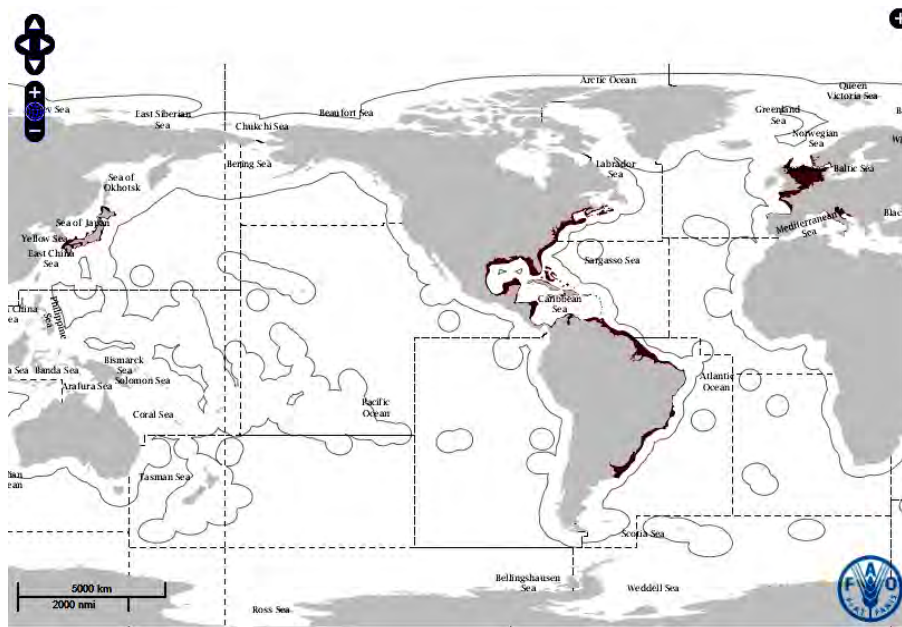


Figura 1. Filogenia de los decápodos (Meglitsch, 1985)

En la Figura 2 se aprecia la distribución de este crustáceo, el cual se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de la costa del océano Atlántico, desde Cabo Cod en Massachussetts, EEUU, hasta la bahía del río de la Plata en Argentina (FAO, 2013).

La importancia de este crustáceo recae en el comercio de su pulpa, la cual es altamente valorada en mercados como el estadounidense y el japonés (Millikan y Williams, 1984).



**Figura 2. Distribución mundial de *Callinectes sapidus* (FAO, 2013)**

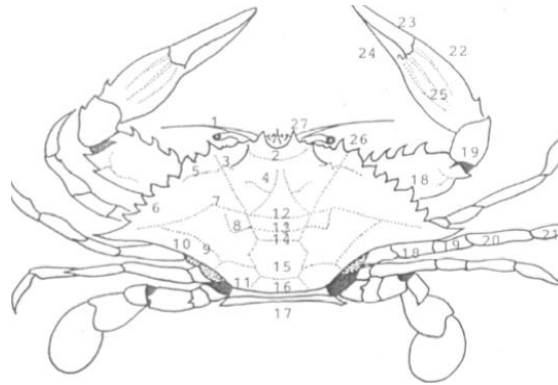
El cuerpo suave de la jaiba está completamente encerrado en una concha dura llamada cefalotórax, por encontrarse la cabeza y los segmentos torácicos fusionados. Aunque aparentemente todo es de una sola pieza, el cuerpo de la jaiba está formado por varios segmentos unidos. La jaiba macho o “jaibón” presenta diferencias anatómicas significativas con respecto de la hembra. El macho tiene abdomen en forma de T, el cual mantiene apretado el cuerpo hasta su madurez. Las hembras inmaduras tienen un abdomen en forma de triángulo sellado y conforme madura la hembra, su abdomen se vuelve redondo y puede ser fácilmente separado del cuerpo. Otra característica distintiva de los machos es que generalmente poseen tenazas y piernas brillantes en varias tonalidades azules, mientras que las hembras tienen tenazas de color naranja o color marrón. Lo anteriormente descritos puede apreciarse en la Figura 3.

Dentro del cuerpo por la parte central, se encuentran los órganos internos, los cuales a su vez se encuentran recubiertos y protegidos por una parte muscular que constituye la parte comestible de este animal. Las jaibas tienen 5 pares de patas (de ahí que pertenezcan a los decápodos), que le ayudan a desplazarse. El primer par, lleva unas fuertes tenazas, usadas para conseguir comida y como arma de defensa. Después se encuentran las llamadas

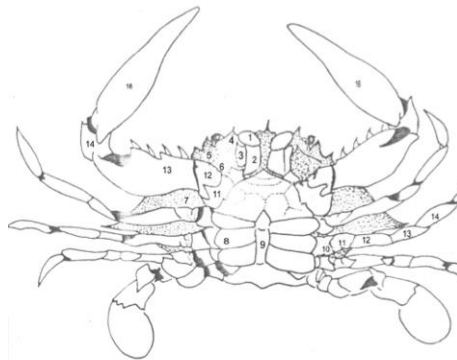
queliópodos; los tres pares siguientes son utilizados para caminar y el último par, tienen forma de pala y son utilizados para nadar, en las Figuras 4a y 4b se pueden apreciar la vista dorsal y la ventral de una jaiba (Raz-Guzmán et al., 1992).



**Figura 3. Diferenciación sexual de la jaiba (Velázquez y Ramírez, 2008)**



**Figura 4a. Vista dorsal de una jaiba (Raz-Guzmán et al., 1992)**



**Figura 4b. Vista ventral de una jaiba (Raz-Guzmán et al., 1992)**

Las jaibas macho llegan a medir en promedio 203.2mm, mientras que las hembras alcanzan solamente 177.8mm. Las jaibas hembras producen hasta dos millones de huevos, pero

solamente cerca de un millón sobrevive. Aparecen de abril a agosto o septiembre (De-Dios, 2002).

### 2.1.2 Composición química de la jaiba

La composición química de la parte comestible de la jaiba se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición de la parte comestible del cangrejo azul o jaiba (Kirk et al., 2009)**

Componente	g por 100g de parte comestible
Agua	79
Proteína	18
Grasa	1
Carbohidratos	2

Otwell y Koburger (1985) reportan el contenido de proteína, humedad, grasa y ceniza para las jaibas enteras. Esta composición se aprecia en la Tabla 2.

**Tabla 2. Análisis aproximado o bromatológico de jaibas enteras (Otwell y Koburger, 1985)**

Componente	Porcentaje en base húmeda
Humedad	84.68 <sup>±0.25</sup>
Proteína	10.91 <sup>±0.53</sup>
Grasa	1.40 <sup>±0.06</sup>
Ceniza	2.84 <sup>±0.10</sup>
Carbohidratos	0.60 <sup>±0.01</sup>

Por su parte los desechos de jaiba (caparazón y tenazas), objetos de la presente investigación tienen la composición aproximada o bromatológica que se aprecia en la Tabla 3.

La pigmentación *in vivo* de *Callinectes sapidus* es debida a un grupo de proteínas unidas a grupos carotenoides las cuales se denominan carotenoproteínas, siendo la principal de ellas la crustacianina, la cual es un complejo heteroproteico formado por 3 fracciones proteicas ( $\alpha$ -

crustacianina,  $\beta$ -crustacianina y una fracción variable entre ellas) y un grupo prostético, que en este caso es una astaxantina.

**Tabla 3. Composición aproximada o bromatológica de los desechos de jaiba en % m/m (Morillo et al. ,2006)**

Variable	Abdomen	Caparazón	Tenaza
<b>Proteína, nitrógeno</b>	41.76 $\pm$ 0.53	27.37 $\pm$ 0.53	22.57 $\pm$ 0.53
<b>Grasa</b>	4.64 $\pm$ 0.35	6.18 $\pm$ 0.35	0.04 $\pm$ 0.35
<b>Ceniza</b>	29.27 $\pm$ 1.03	37.18 $\pm$ 1.03	53.55 $\pm$ 1.07
<b>Humedad</b>	5.46 $\pm$ 0.32	5.73 $\pm$ 0.32	5.27 $\pm$ 0.32

## 2.2. Panorama de la producción mundial y nacional de *Callinectes sapidus*

Según la FAO en el año 2011 (FAO, 2013), a nivel mundial fueron capturadas 110,502 toneladas de jaiba. En la Figura 5, se aprecia el crecimiento de la captura de este crustáceo y, según la FAO (2013), el principal país productor es Estados Unidos con una producción de 60,329 toneladas.



**Figura 5. Producción mundial anual de *Callinectes sapidus* (FAO, 2013)**

Por su parte en México, según datos de la CONAPESCA, en el 2012 fueron capturadas 23,668 toneladas anuales de este crustáceo, lo cual le da el noveno lugar en las principales especies pesqueras capturadas en México (Figura 6), siendo la tasa media de crecimiento anual en los últimos 10 años de 2.42%, tal y como se aprecia en la Figura 7, donde se

muestra la serie histórica de la producción por captura de este crustáceo en la última década. Por otra parte su valor en pesos fue de \$238,252,000 (CONAPESCA, 2012).

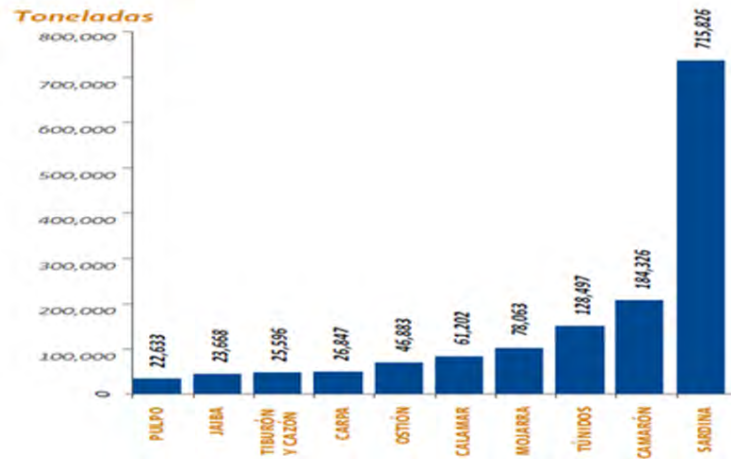


Figura 6. Principales especies pesqueras de México (CONAPESCA, 2012)

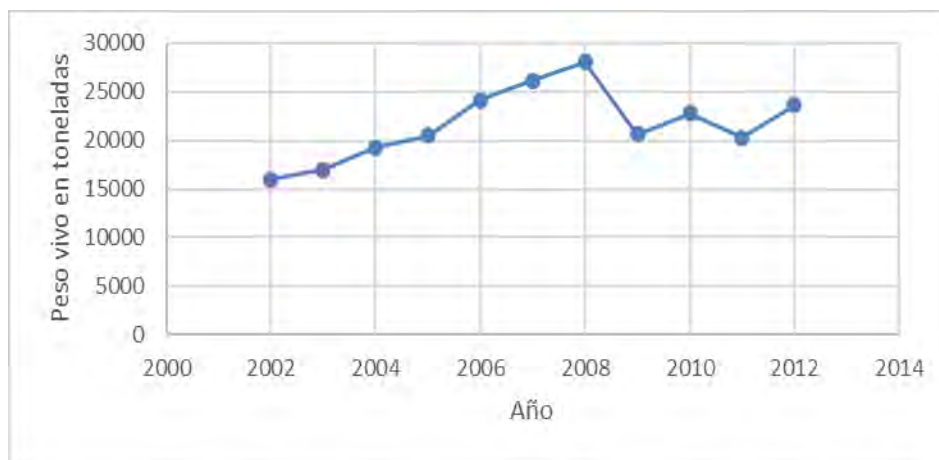


Figura 7. Serie histórica de la producción nacional de jaiba (2002-2012) (CONAPESCA, 2012)

De acuerdo con los datos de CONAPESCA en el 2012 las principales entidades productoras fueron: Sinaloa, Sonora, Veracruz y Tamaulipas, con un 30.14, 20.10, 17.33 y 16.90% de la producción respectivamente.

En el año 2011 se exportaron 3,816 toneladas de jaiba con un valor de 34,389,000 dólares, siendo los principales países de exportación Estados Unidos y Japón, en donde es muy apreciada la pulpa de este animal (CONAPESCA, 2011). La pulpa representa solamente el



14% de la masa viva de la jaiba. En promedio, cada animal contiene 57g de carne, siendo una excelente fuente de proteína, vitaminas y minerales como el fósforo, zinc, cobre, calcio y el hierro (Gates y Parker, 1992).

### 2.3. Procesamiento y subproductos de la jaiba y su utilización

Como ya se ha mencionado, del 86-90% de la masa del cangrejo azul no es utilizada, ya que la parte comestible, es decir la pulpa solamente representa el 14%. En la Figura 8 se aprecia el diagrama de flujo para la obtención de carne de jaiba (*Callinectes sapidus*).

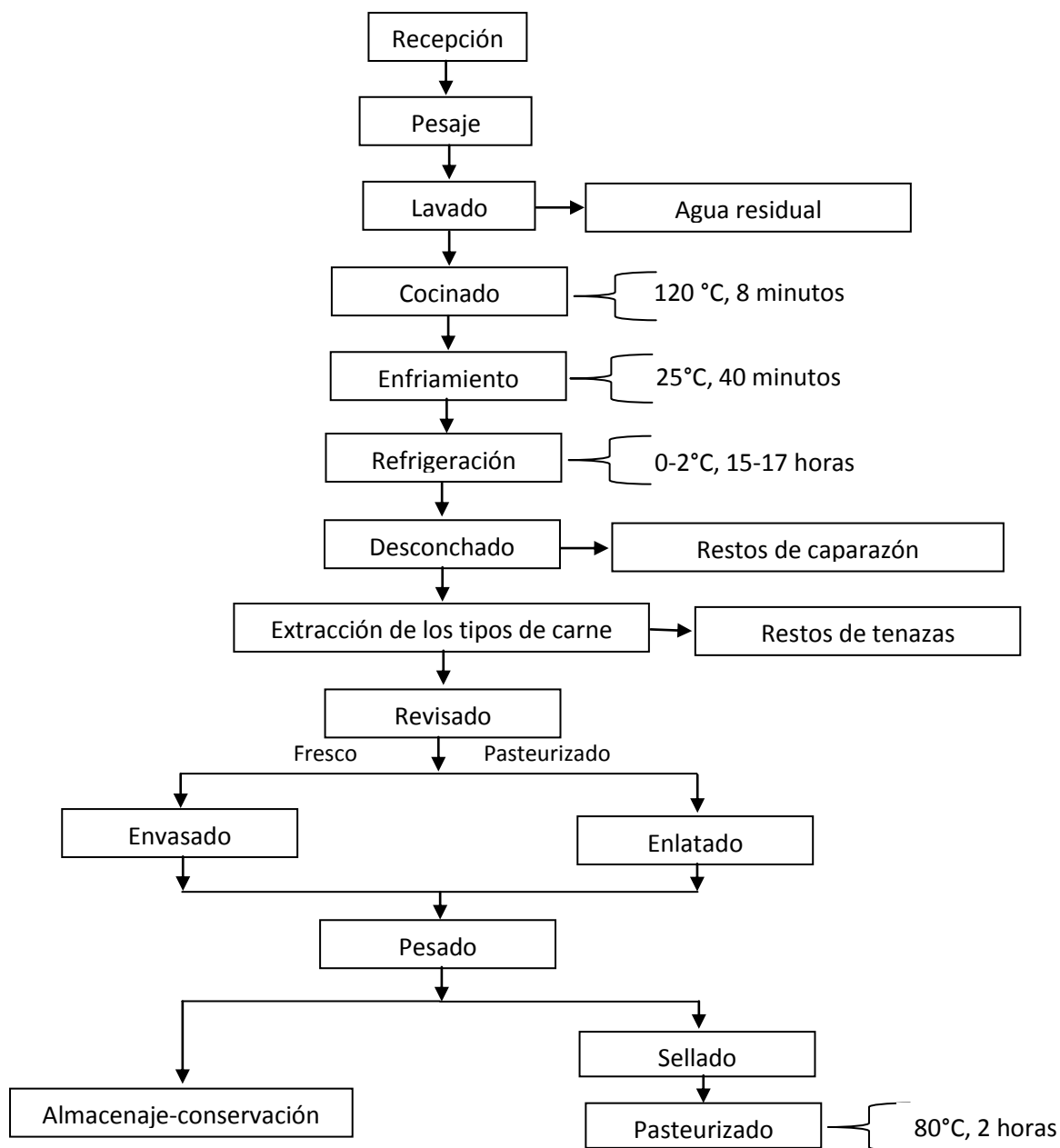


Figura 8. Diagrama de proceso para la obtención de la pulpa de jaiba (Morillo, 2006)

Cabe destacar que la extracción de la carne se realiza de forma manual por personal capacitado, el cual con un cuchillo de acero inoxidable extrae los diferentes cortes de carne como puede apreciarse en la Figura 9 (Morillo, 2006).



**Figura 9. Extracción manual de la pulpa de jaiba (Morillo, 2006)**

Los subproductos de las jaibas son vendidos a productores de alimentos balanceados para animales, quienes los biodegradan a través de composta o ensilaje. Desafortunadamente, una parte importante de estos desechos son simplemente eliminados al ambiente, representando una importante fuente de contaminación (De-Dios, 2002).

A últimas fechas se han empleado los desechos de estos crustáceos para la extracción de quitina, siendo aproximadamente el 40% del exoesqueleto correspondiente a este biopolímero (Horst, 1990).

La quitina y especialmente su derivado desacetilado, la quitosana<sup>1</sup>, tiene numerosas aplicaciones en cosméticos, fármacos, agricultura e industria alimentaria, en el tratamiento de aguas y en la producción de empaques biodegradables (Lalov et al., 2000; Mayer et al., 1989; Weiner, 1991).

Algunos otros usos que se le ha dado a estos desechos han sido como ingrediente alimenticio en la preparación de alimentos balanceados para dietas de bagre (Deán et al., 1992).

---

<sup>1</sup> Las gomas, según la nomenclatura química, terminan en -ana. Por ejemplo, de la dextrosa su goma es la dextrana, por lo que para la quitina, su goma debería ser la quitana, pero por imitación del inglés donde una se llama chitin y la otra chitosan, se ha dado en llamarla quitosano, quitosán o quitosan. En esta investigación se usará la palabra quitosana

## 2.4. Pigmentos en la industria química y alimentaria

El color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz y que, por lo tanto, puede medirse en términos físicos de energía radiante y por su longitud de onda. Dado que el ojo humano solamente es capaz de percibir cuando la longitud de onda oscila entre 380 y 780nm, el color se define como: “la parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina en el ojo” (Baduí, 2006).

La calidad de un alimento sin tomar en cuenta los aspectos sanitarios, toxicológicos y nutricionales, se basa en los siguientes parámetros: color, olor, sabor y textura. Sin embargo, el primer acercamiento del consumidor al alimento es por su aspecto, siendo entonces el color el primer criterio de aceptación o rechazo.

Según la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (*FDA, Food and Drug Administration*), un pigmento es cualquier material que imparte color a otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar, extraída o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad, a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que cuando es añadido o aplicado en alimentos, medicamentos o cosméticos es capaz de conferir color por sí misma (Baduí, 2006).

Los pigmentos pueden ser separados de los tintes, debido a que los pigmentos son prácticamente insolubles en el objeto en el que se aplican dando como resultado una suspensión. Por su parte los tintes, que son líquidos o son solubles en el vehículo de aplicación, brindan como resultado una solución. Por lo tanto, un colorante puede ser un pigmento o un tinte dependiendo del vehículo en el que se utilice (Zollinger, 1991).

La industria de los pigmentos es una de las industrias de mayor volumen de ventas a nivel mundial; se producen 700 toneladas al año de pigmentos naturales y sintéticos, de los cuales un 25% se destina a la industria alimentaria (Baduí, 2006).

### **2.4.1. Clasificación de los pigmentos: naturales y sintéticos**

De manera general los pigmentos se pueden dividir en 2 grandes grupos: Los sintéticos y los naturales. Los pigmentos sintéticos son colorantes que no se generan por la naturaleza y son producidos vía síntesis química. Estos a su vez químicamente se dividen en 2 grandes grupos (Baduí, 2006):

- Azoicos: su estructura es de mono, di o triazo. Producen casi todos los colores, se caracterizan por tener el grupo cromóforo azo  $-N=N-$ . Los principales representantes de este grupo son el amarillo No. 5 y 6, los rojos No. 2, 4 y 40 y el naranja B.
- Antraquinonas: sus estructuras son de uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, teniendo al menos tres anillos condensados. Los principales representantes de este grupo son el verde No. 5, el 6 y los violetas No. 2 y 20.

El mercado mundial de pigmentos sintéticos representa un volumen de ventas de 400 millones de dólares al año. Requieren de una certificación de su pureza. Sin embargo, debido a la preocupación por la seguridad en el uso de los pigmentos sintéticos, estos se han estudiado exhaustivamente con respecto a su efecto sobre la salud. Pero aún queda duda sobre su participación en alteraciones a la salud. Por esto se ha reducido cada vez más su uso en alimentos (Baduí, 2006). De acuerdo con la Secretaría de Salud de México, las especificaciones y limitaciones en el uso de pigmentos sintéticos en México son las que se muestran en la Tabla 4.

Los pigmentos naturales son los obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza como microorganismos, vegetales, animales o minerales, son sujetos a las mismas pruebas de calidad que los sintéticos, pero la FDA y otras agencias gubernamentales no requieren que se certifique su pureza química y, por lo tanto, se refiere a ellos como aditivos de color no certificados; algunos de estos pigmentos sí están sujetos a restricciones en su uso, como el nivel máximo permitido o el uso en animales y/o humanos (Baduí, 2006).

**Tabla 4. Especificaciones para el uso de pigmentos sintéticos en México (DOF, 2012)**

Nombre oficial	Clasificación química	Color	Usos
<b>Rojo 3 (Eritrocina)</b>	Xantana	Rojo-azul	Salsas, bebidas carbonatadas, pan, cereales, emulsiones aceite/agua
<b>Rojo 40</b>	Monoazo	Rojo-amarillo	Gelatinas, salsas, bebidas carbonatadas, bebidas en polvo, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua
<b>Amarillo 5 (tartrazina)</b>	Pirazolona	Verde-amarillo	Gelatinas, bebidas en polvo, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua
<b>Azul 1</b>	Trifenilmetano	Verde-azul	Bebidas carbonatadas, bebidas en polvo, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua
<b>Azul 5</b>	Índigo	Azul intenso	Confitería, gelatinas, emulsiones aceite/agua
<b>Verde 3</b>	Trifenilmetano	Verde-azul	Gelatinas, bebidas en polvo, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua
<b>Naranja B</b>	Pirazolona	Rojo-amarillo	Helados

La Secretaría de Salud de México reporta que, aunque no requieren de alguna certificación, deben cumplir con las siguientes especificaciones químicas y toxicológicas (DOF, 2012):

- No deben tener más de 3mg de arsénico /kg
- No deben tener más de 10mg de plomo /kg
- Máximo contenido de mercurio: 1mg/kg
- En su desecación debe haber menos de 0.2% de pérdidas
- Debe de ser analizable por espectrofotometría de absorción atómica
- Debe de ser analizable por cromatografía

Los pigmentos naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen, aunque pueden agruparse en 6 categorías:

- I. Carotenoides
- II. Clorofilas
- III. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos
- IV. Betalaínas
- V. Hemopigmentos
- VI. Otros pigmentos naturales

El mercado mundial de pigmentos naturales representa 940 millones de dólares al año en ventas y, debido a la preocupación del consumidor por el uso de productos que no alteren o dañen a su salud, crece con una tasa del 4% anual (Britton et al., 1999).

#### **2.4.2. Carotenoides: carotenos y xantofilas**

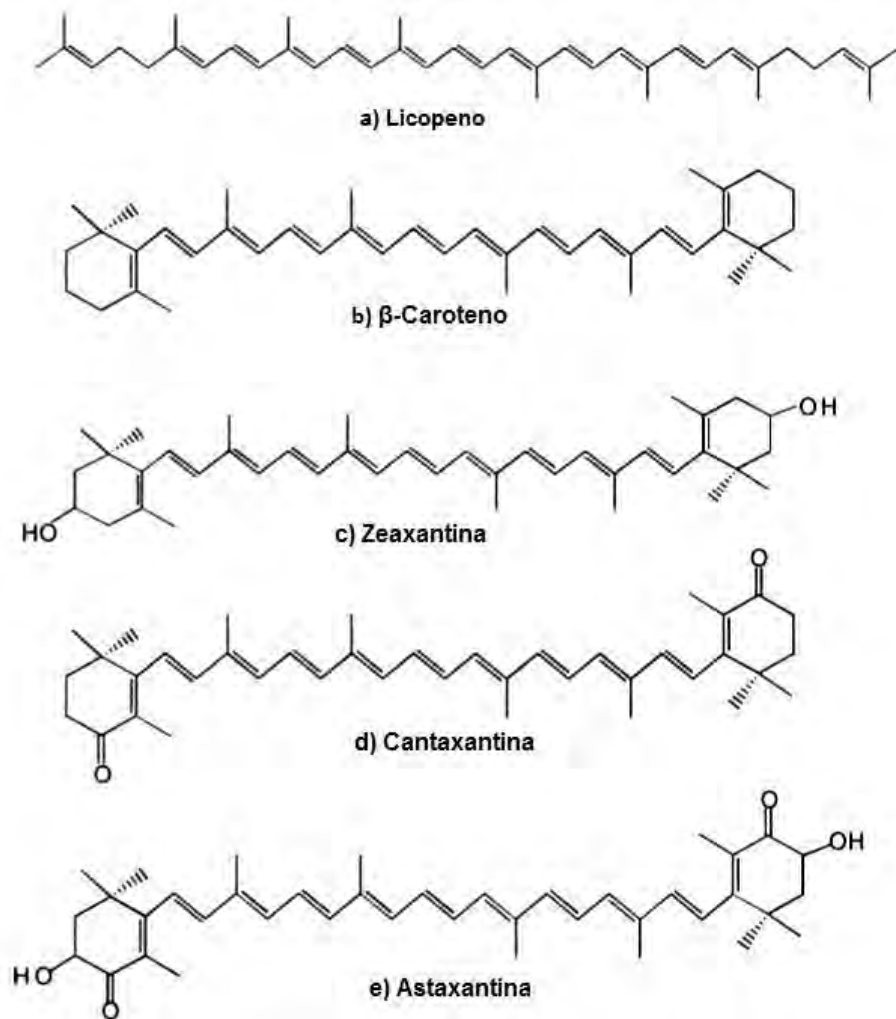
Los carotenoides comprenden una familia de más de 600 pigmentos los cuales son sintetizados en plantas superiores, algas, musgos, bacterias y hongos (Belitz et al., 2009). Los carotenoides no pueden ser sintetizados “*de novo*” por los animales, aunque pueden ser modificados durante su metabolismo para ser acumulados en sus tejidos (Shahidi y Brown, 1998). La estructura de los carotenoides es derivada del licopeno. La mayoría son hidrocarburos de 40 átomos de carbono, los cuales contienen dos anillos terminales unidos por una cadena de dobles enlaces conjugados o por un sistema poliénico (Baduí, 2006).

Dos grupos han sido señalados como los más importantes: los carotenos los cuales están compuestos únicamente por carbono e hidrógeno y las xantofilas las cuales son derivados oxigenados. En este último el oxígeno puede estar presente como grupos OH como en la zeaxantina, o como grupos oxo como en la cantaxantina o en una combinación de ambos como lo es la astaxantina. En la Figura 10 se muestra la estructura de los carotenoides anteriormente mencionados (Higuera-Ciapara et al., 2006).

El sistema poliénico da a los carotenoides su distintiva estructura molecular, sus propiedades químicas y sus características de absorción de luz. Cada doble enlace de la cadena poliénica puede existir en dos configuraciones, como isómeros geométricos *cis* o *trans*.

Los isómeros *cis* son termodinámicamente más inestables que los isómeros *trans*. La mayoría de los carotenoides encontrados en la naturaleza son predominantemente isómeros *trans* (Britton, 1995). Adicionalmente a los isómeros geométricos y considerando que cada molécula tiene centros quirales, se pueden presentar una gran variedad de enantiómeros. Muchos de los pigmentos carotenoides tienen la característica de encontrarse enlazados a

otros grupos macromoleculares como son las proteínas, los lípidos y los glucósidos, que les brinda una mayor estabilidad. Tanto los carotenoides como las xantofilas se encuentran unidos a otras moléculas a través de enlaces ésteres (Shahidi y Brown, 1998).



**Figura 10. Estructura química de algunos carotenoides (Higuera-Ciajara et al., 2006)**

Estos complejos cambian de color si se les proporciona calor debido a la desnaturalización de las proteínas, con lo cual se libera el pigmento de estados complejos proteicos, tal es el caso de la crustacianina, que es generalmente de color verde-grisáceo y al desnaturalizarse cambia a un color naranja.

#### **2.4.2.1. Astaxantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4, 4'-diona)**

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) es un pigmento que pertenece a la familia de las xantofilas, los derivados oxigenados de los carotenoides los cuales son sintetizados en plantas y algas a partir del licopeno. La astaxantina es uno de los principales pigmentos presentes en crustáceos, salmónidos, truchas y en algunas aves. La principal función es proveer una deseable coloración rojo-naranja en estos organismos que no tienen acceso a fuentes naturales de carotenoides.

El uso de la astaxantina en la industria acuícola no solamente es importante desde el punto de vista de la pigmentación y aceptación por parte del consumidor, sino también como componente nutricional esencial para el adecuado crecimiento y reproducción de estos organismos (Higuera-Ciapara et al., 2006).

Además de su efecto en el color, una de las propiedades más importantes de la astaxantina es su capacidad antioxidante la cual se ha encontrado que es superior a las del  $\beta$ -caroteno o incluso al  $\alpha$ -tocoferol (Miki, 1991). Debido a su actividad antioxidante excepcional, se le ha atribuido a la astaxantina de un extraordinario potencial para proteger al organismo contra una amplia gama de dolencias tales como los problemas cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y enfermedades inmunológicas (Higuera-Ciapara et al., 2006).

#### **2.4.2.2. Propiedades fisicoquímicas de la astaxantina**

La astaxantina es una xantofila bicíclica de coloración naranja-rojizo. La astaxantina existe como tres enantiómeros: (3R, 3'R), (3R, 3'S) y (3S, 3'S), además de poder tener en la forma *cis* o *trans*. En la Figura 11 se muestra la estructura de la astaxantina y sus diferentes isómeros y enantiómeros. Químicamente, las astaxantinas son el cromóforo más abundante en los crustáceos. Conjugadas con proteínas pueden encontrarse mono o diesterificadas (Britton et al., 1999). En la literatura se reporta que en los crustáceos solamente el 8% de la astaxantina se encuentra de manera libre, un 22.5% monoesterificada y un 69.5% diesterificada (Torrissen, et al, 1981).



### 2.4.2.3 Fuentes de obtención de las astaxantinas

Actualmente la principal fuente de astaxantinas para uso comercial es la astaxantina sintética, la cual consiste en una mezcla 1:2:1 de sus isómeros (3S, 3S'), (3R, 3S') y (3R, 3R), respectivamente.

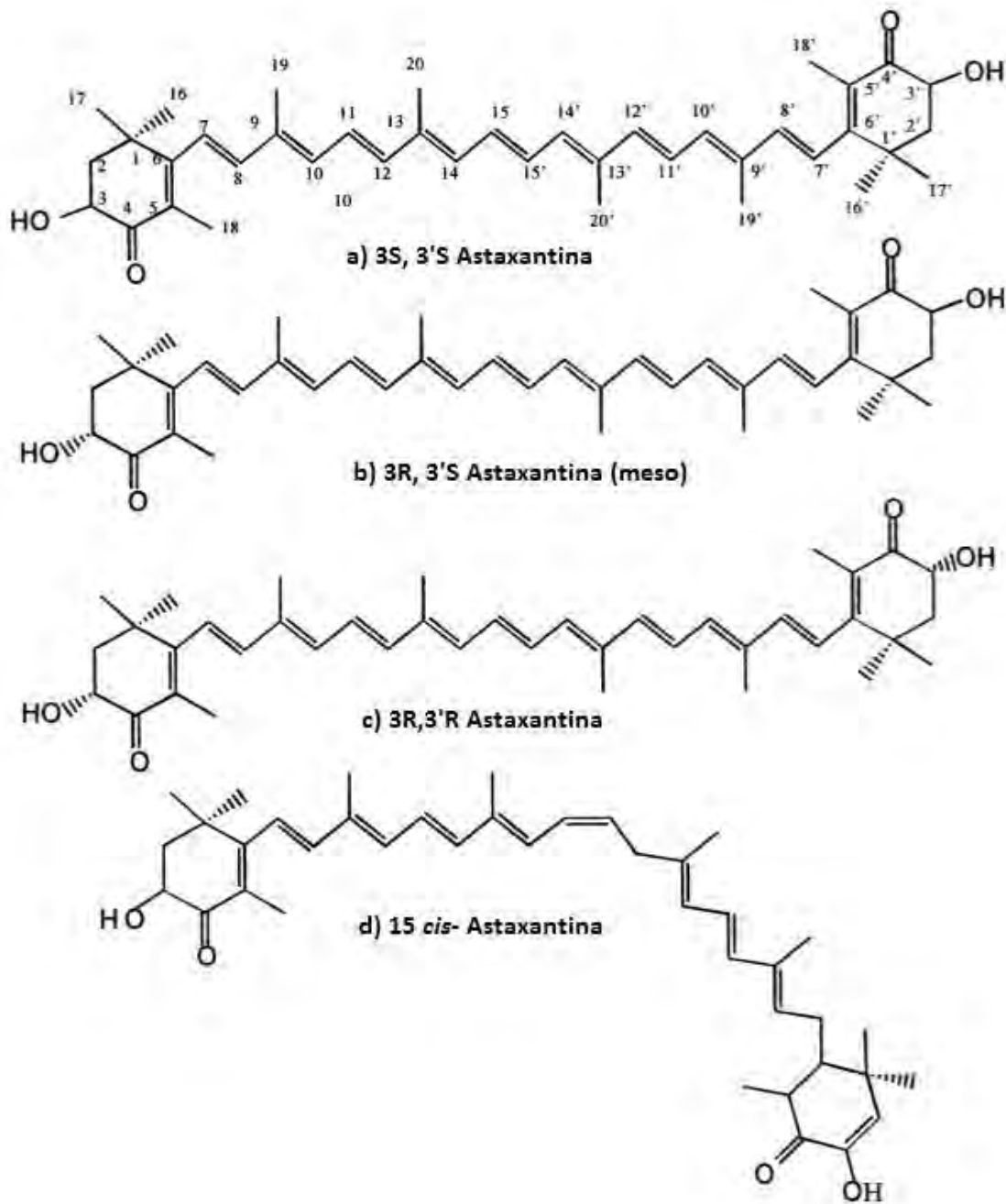


Figura 11. Estructura química de los isómeros de la astaxantina (Higuera-Ciapara et al., 2006)

Desde 1990, la empresa Roche® comenzó la producción a gran escala de la astaxantina sintética satisfaciendo prácticamente el 100% de la demanda mundial de este pigmento que en el año 2006 se estimó era de 150 millones de dólares (Higuera-Ciapara et al, 2006).

Solamente se han explorado algunas opciones que puedan competir a nivel de rentabilidad económica con la astaxantina sintética. Entre ellas destacarse la extracción de la microalga *Haematococcus pluvialis* y la levadura roja *Phaffia rhodozyma*. A pesar de que muchas empresas han tratado de comercializar la astaxantina de fuentes naturales, su participación en el mercado ha sido muy reducida debido a que su producción es muy pequeña comparada con la astaxantina sintética fabricada por Roche (Higuera-Ciapara et al, 2006).

A pesar de ello, la demanda de pigmentos obtenidos de fuentes naturales es cada vez más alta para el uso en la acuicultura debido a que algunos estudios demuestran que la astaxantina presente en fuentes naturales se encuentra en forma esterificada, lo que la hace más efectiva que la astaxantina sintética, ya que la astaxantina en sus formas esterificadas es más asimilable para los peces que la astaxantina en forma libre (Darachai et al., 1999; Guerin y Hosokawa, 2001).

Numerosos investigadores (Choi et al., 2002; Fabregas et al., 2000; Harker et al., 1996; Hata et al., 2001; Kakizono et al., 1992; Kobayashi et al., 1992; Orosa et al., 2001) reportan que el principal microorganismo productor de astaxantina es *Haematococcus pluvialis*. Estudios señalan que la astaxantina presente en este microorganismo se encuentra en una concentración de 1.5 al 3% de masa en base seca. Los sistemas de producción consisten en cultivar a las microalgas en largos tanques bajo condiciones controladas, después se procede a romper la pared celular y finalmente se procede a un proceso de secado obteniéndose un polvo fino de color rojo, el cual se usa en la alimentación de especies acuáticas o para dar coloración a las yemas de los huevos de gallina (Higuera-Ciapara et al., 2006).

Por otra parte, por más de dos décadas la levadura *Phaffia rhodozyma* ha sido estudiada por su capacidad de producir astaxantina. Esta levadura es cultivada en biorreactores bajo

condiciones controladas y después es secada y vendida como ingrediente para alimentos balanceados de salmónidos. Se calcula que la astaxantina se encuentra en una concentración de 8000 µg/ g de producto terminado (Higuera-Ciapara et al., 2006).

Finalmente, los residuos de crustáceos son generados durante las operaciones de procesamiento de los camarones, cangrejos, jaibas, langostas, etc. Generalmente, estos desechos están compuestos de sales minerales, proteínas, quitina, lípidos y pigmentos (Lee y Peniston, 1982). Los carotenoides que contienen estos desechos han sido estudiados y cuantificados en numerosas investigaciones donde se han encontrado concentraciones que oscilan entre los 100 a los 1000µg/g; por ejemplo, la astaxantina presente en el camarón y en los cangrejos varía entre 119 a 148µg/g de astaxantina. A pesar de ser una fuente considerable de carotenoides presentan algunas desventajas como lo son su alto contenido de cenizas y quitina, lo cual disminuye considerablemente la digestibilidad por parte de los peces y otras especies.

Se han ideado diversos métodos de extracción de los carotenoides para hacer más biodisponibles y digeribles estos pigmentos, entre los cuales destacan la extracción con aceites vegetales, lo que permitiría su adición en forma directa como ingrediente alimentario en las formulaciones (Chen y Meyers, 1982; Coral et al., 1998; Meyers y Chen, 1985; Omara-Alwala et al., 1985). En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de astaxantina encontrada en diversos residuos de crustáceos.

**Tabla 5. Concentración de astaxantina en diversos crustáceos**

Fuente	Astaxantina total µg/ g	Astaxantina (%)			Otros carotenoides	Referencias
		Libre	Monoester	Diester		
Camarón ( <i>P. borealis</i> )	147.7	3.95	19.72	74.29	Zeaxantina	Shahidi y Synowiecki, 1991
Camarón ( <i>P. boreales</i> )	49.7	8	22.5	69.5	NR	Torrissen et al., 1981
Camarón ( <i>P. boreales</i> )	30.9	5.6	18.5	75.6	NR	Guillou et al, 1993
Langosta ( <i>P. clarkii</i> )	153	40.3	NR	NR	Astaceno	Meyers y Bligh, 1981
Cangrejo de la nieve ( <i>Ch. opilio</i> )	119.6	21.16	5.11	56.27	Luteina, zeaxantina, astaceno	Shahidi y Synowiecki, 1991
Jaiba ( <i>C. sapidus</i> )	30.5	NR	NR	NR	NR	Félix-Valenzuela et al., 2001

NR: No reportado

#### **2.4.2.4. Usos y aplicaciones de la astaxantina**

El colorido de los salmónidos y crustáceos es percibido como un indicador de calidad en estos productos, la astaxantina representa entre el 84 al 99% de los pigmentos carotenoides responsables de esa coloración. Los peces y crustáceos de granja (acuicultura) no tienen acceso a fuentes naturales de astaxantina, por lo que no adquieren la pigmentación característica. Es por ello que se ha usado extensamente la astaxantina y la cantaxantina como agentes pigmentantes en la acuicultura. Actualmente, la forma sintética de ambos pigmentos representa la fuente más importante para estos crustáceos y peces criados mediante acuicultura. Los carotenoides para acuicultura están disponibles bajo los nombres comerciales de Carophyll Pink <sup>™</sup> para la astaxantina y Carophyll Red <sup>™</sup> para la cantaxantina. Ambas son propiedad de los Laboratorios Hoffman-LaRoche (Storebakken y No, 1992).

Estudios recientes demuestran que la astaxantina no sólo es necesaria en la industria acuícola para dar una coloración deseable a estos peces y crustáceos, sino también cumple un papel fundamental en la nutrición y correcto desarrollo de especies así como un rol relevante en la reproducción de los mismos (Higuera-Ciapara et al., 2006).

Un antioxidante es una molécula que tiene la capacidad de remover los radicales libres de un sistema al reaccionar con ellos y producir otros compuestos inocuos o impedir las reacciones de oxidación (Britton, 1995). El poder antioxidante de la astaxantina ha sido ampliamente estudiado y se ha encontrado que es superior a la del  $\beta$ -caroteno, el  $\alpha$ -tocoferol, el licopeno o el ácido ascórbico.

Los beneficios de la inclusión de la astaxantina en la dieta humana son varios, entre ellos, se le ha atribuido una gran actividad anticancerígena (Chew et al., 1999, Kang et al., 2001; Tanaka et al., 1994). También se le ha relacionado con la disminución en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como angina de pecho, ataque al miocardio, trombosis, arteriosclerosis, etc. Asimismo, se ha demostrado que disminuyen los niveles de colesterol de baja densidad o “colesterol malo” (*Low Density Lipoprotein LDL*) ya que inhibe

su oxidación (Carpenter et al., 1997; Golstein y Brown, 1977; Iwamoto et al., 2000; Kidd, 2011; Miki et al., 1998).

A últimas fechas se ha encontrado que la astaxantina presenta actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, la cual es considerada un factor importante en la inducción del desarrollo de gastritis, úlceras pépticas y cáncer de estómago. Wang y colaboradores (2000) demostraron que la irritación de la mucosa gástrica se veía disminuida en ratones que consumían dietas ricas en astaxantina en comparación con aquellos que no lo hacían. Aunque el mecanismo no se conoce aún con exactitud se piensa que la astaxantina impide la colonización de la mucosa por parte de *H. pylori*.

Jyonouchi y colaboradores (1994,1996) encontraron que la astaxantina potencia y regula la respuesta del sistema inmune. También encontraron que *in vitro* en sangre humana la astaxantina elevaba el número de linfocitos T, así como la producción de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Otros estudios del mismo autor trabajando con ratones *in vivo* han demostrado que la astaxantina es capaz de aumentar los anticuerpos, lo que sugiere que una suplementación con carotenoides puede ser útil para restablecer la respuesta inmune (Jyonouchi et al., 1994). Acorde con lo anterior la astaxantina ha sido usada para el tratamiento enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad de Chron (Lignell y Bottiger, 2001).

Finalmente, la astaxantina ha sido usada para incrementar la coloración de las yemas de los huevos de las gallinas. Además, se encontró que al suministrar dietas ricas en astaxantina no solamente los huevos presentaban una mayor coloración, sino también la carne de estas aves (Akiba et al., 2001).

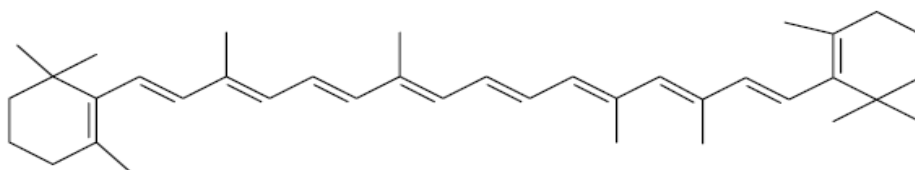
#### **2.4.2.5. Otros pigmentos carotenoides de origen marino**

En crustáceos como el camarón (*Litopenaeus japonicus*) se ha determinado el contenido de pigmentos dentro del caparazón, encontrándose los siguientes porcentajes: 52.7% de astaxantina, 25.5% de foenicoxantina (25.5%), 4.9% de  $\beta$ -caroteno, 2.4% de tetrahidropirardixantina, 1.8% de tetradihidroxantina, 1.4% de equinona, trazas de cantaxantina, dihidroastaxantina, trihidrato piradixantina y un 10% de pigmentos no

identificados (Muriana et al., 1993). A continuación se describen los carotenoides más abundantes en el medio acuático sin incluir la astaxantina que ya fue abordada previamente.

### **$\beta$ -caroteno ( $\beta$ , $\beta$ , caroteno)**

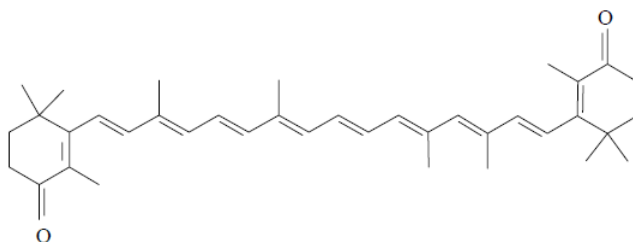
El pigmento  $\beta$ -caroteno contiene una estructura  $\beta$ -ionona en cada extremo de la molécula, enlazada por un sistema de dobles enlaces conjugados (Francis, 1999) (Figura 12). Este carotenoide es soluble en éter de petróleo con una absorbancia máxima de 425, 450 y 475 nm y en cloroformo a 497 y 466 nm (Rodríguez-Amaya, 1999). El  $\beta$ - caroteno es una potente provitamina A con 100% de actividad ya que estructuralmente se forman dos vitaminas A (Rodríguez-Amaya, 1999).



**Figura 12. Estructura química del  $\beta$ -caroteno (Baduí, 2006)**

### **Astaceno ( $\beta$ , $\beta$ , caroteno-3, 3', 4, 4'-tetrona)**

El astaceno es un pigmento carotenoide rojo-café que resulta de la oxidación de la astaxantina. Estructuralmente se diferencia de la astaxantina por tener dos dobles enlaces en los carbonos 4, 5 y 4, 5' de los anillos  $\beta$ -ionona y contener más grupos éster y ningún grupo hidroxilo (Figura 13). Se ha aislado del caparazón de crustáceos, algas, esponjas, pescado y reptiles. Prácticamente es insoluble en agua, pero es soluble en cloroformo, piridina, dioxano, disulfuro de carbono y soluciones de álcali. Es ligeramente soluble en benceno, etilacetato, ácido acético glacial y poco soluble en éter de petróleo y en metanol (Britton et al., 1999).



**Figura 13. Estructura química del astaceno (Britton et al., 1999)**

### Cantaxantina ( $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4, 4'-diona)

La cantaxantina se encuentra formada por ocho unidades de isoprenos invertidos en el centro de la molécula y dos anillos con sustituyentes oxígeno (Figura 14). Contiene dos grupos carbonilos y tiene un espectro máximo a 466nm con un pico amplio en solución en éter de petróleo, produciendo color rojo. Se genera un dihidroxicarotenoide, la isozexantina, por reducción con hidruro de boro sodio desplegando el pico de absorción espectral en tres (Rodríguez-Amaya, 1999). Este pigmento es soluble en cloroformo y en aceites.

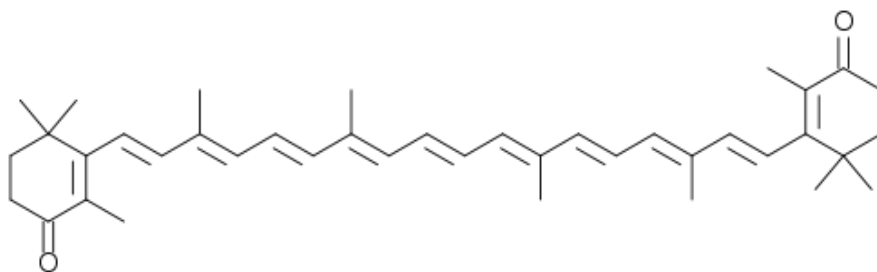


Figura 14. Estructura química de la cantaxantina (Careri et al., 1999)

### Zeaxantina ( $\beta$ , $\beta$ , caroteno-3, 3'-diol)

La zeaxantina, según Britton y colaboradores (1999), se puede obtener químicamente por isomerización de la luteína. Contiene en su estructura dos grupos hidroxilos en sus extremos (Figura 15). No contiene actividad provitamínica y es prácticamente insoluble en agua y soluble en éter de petróleo, metanol, disulfuro de carbono, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y etilacetato. Es soluble en ácido acético glacial. Sus bandas de absorción máximas se encuentran entre 483 y 451 nm.

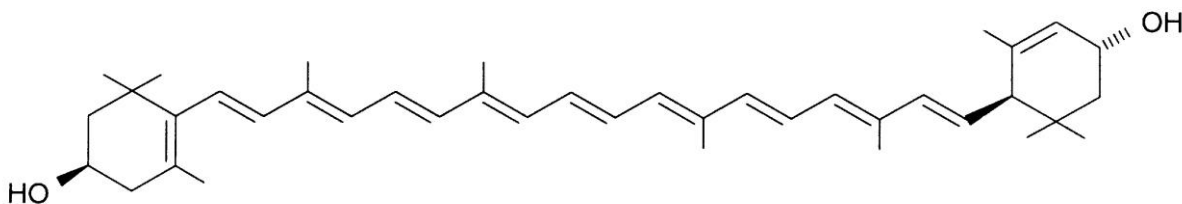


Figura 15. Estructura química de la zeaxantina (Shahidi y Brow 1998)

### **2.4.3. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos acuáticos**

#### **2.4.3.1. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando disolventes orgánicos**

La extracción de pigmentos de crustáceos se puede llevar a cabo a través de disolventes orgánicos (Muzarelli, 1977). A continuación se describen las condiciones empleadas por diferentes autores para la extracción de los pigmentos carotenoides mediante el uso de este tipo de disolventes.

Muzarelli (1977) menciona que es posible recuperar estos pigmentos a partir de material quitinoso de crustáceos utilizando solventes y/o desnaturalizantes de proteínas solamente si las conchas han sido descalcificadas. El ácido cítrico acuoso, las sales de ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y el ácido clorhídrico disuelven el carbonato de calcio pero dejan todos los pigmentos firmemente asociados con la quitina. Los pigmentos en el caparazón descalcificado se extraen con acetona o etanol y con ácido acético tibio.

Gilchrist y Lee (1972) utilizaron un sistema múltiple de extracción e identificación de pigmentos en cangrejos de arena (*E. analoga*) manejando tres tipos de disolventes, acetona, dietil éter y éter de petróleo, y descalcificando con hidróxido de potasio metanólico, identificando pigmentos carotenoides en el tejido y en el caparazón. Estos pigmentos identificados fueron  $\beta$ -caroteno, astaxantina, zeaxantina y cantaxantina.

Meyers y Bligh (1981) caracterizaron las astaxantinas en los desechos del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) obteniendo concentraciones de 153 $\mu$ g/g de pigmentos totales identificados como ésteres de astaxantina, astaxantina y, su forma oxidada, el astaceno en 49.4, 40.3 y 10.3%, respectivamente, utilizando previamente un método de descalcificación con ácido acético y extracción por el sistema éter de petróleo/acetona/agua (15:75:10 v/v/v).



### **2.4.3.2. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando aceites comestibles vegetales y/o animales**

Otros procesos de extracción incluyen el uso de aceites de soya, girasol, algodón, pescado, etc. La extracción de la astaxantina con aceite contribuye al incremento de la estabilidad del pigmento, debido a que este es una buena barrera al oxígeno, previniendo la oxidación.

Chen y Meyers (1982), además de identificar los pigmentos separados con aceite compararon la eficiencia de dos tipos de antioxidantes en la solución obtenida de carotenoide-aceite de soya: Etoxiquin® y Endox®. Los resultados con Endox® fueron mejores, ya que este producto es una combinación de BHA (antioxidante), mono y diglicéridos (emulsificantes), ácido fosfórico (sinergista) y ácido fosfórico dietil sodio (secuestrador de metales); el antioxidante Etoxiquin® fue 11.4% menos efectivo.

Simpson (1978) llevó a cabo una separación de proteínas de desechos de procesamiento de camarón y de cangrejo como componente alimenticio para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y caracterizó el contenido de carotenoides. El autor empleó ácido acético como agente desmineralizante, el cual permitió mantener la astaxantina sin deterioro hasta su uso, ya que a pH alto es oxidado hasta astaceno. Los pigmentos identificados fueron astaxantina (7.18µg/g), astaceno (55.4µg/g), éster de astaxantina (66.1µg/g), zeaxantina (trazas), luteína (trazas), 4-ceto-4'-hidroxi-β-caroteno (0.74µg/g) y equinenona (0.25µg/g).

Shahidi y Synowiecki (1991) extrajeron quitina y pigmentos, principalmente astaxantina y sus ésteres, a partir del camarón (*Pandalus borealis*) y del cangrejo de la nieve (*Chionoecetes opilio*) calentando a 60°C, usando aceite de bacalao y desmineralizando los caparazones de ambos crustáceos con soluciones de ácido clorhídrico diluido.

### **2.4.3.3. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) por métodos microbiológicos y enzimáticos**

Gildberg y Stenberg (2001), reportaron un método de extracción integral de desechos de camarón utilizando una proteasa. Este método permite extraer quitina, pigmentos y proteína

hidrolizada más eficientemente que los métodos tradicionales en cuanto a la proporción de proteína recuperada y quitosana de alta calidad.

Por su parte, Armenta y colaboradores (2002), reportaron el empleo de inóculos de la bacteria *Lactobacillus spp.* para llevar a cabo una biodegradación láctica para desproteínizar los residuos de camarón así como para estabilizar los pigmentos. Pasado un periodo de 24 horas de reacción, procedieron a la extracción de los carotenoides con diversos sistemas de disolventes: agua:cloroformo:metanol (1:2:4), éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), etanol:agua (40:60) y aceite de soya. Los extractos resultantes fueron sometidos a una desproteínización empleando una mezcla de enzimas comerciales así como proteasas aisladas en el camarón. Una vez hidrolizadas las muestras procedieron a la cuantificación de la astaxantina por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), encontrando que la concentración de astaxantina fue de 1.25 mg/L en los residuos sometidos a biodegradación y de 0.96 mg/L en los no biodegradados.

El método por biodegradación láctica no ha sido utilizado únicamente en pigmentos, sino también se ha aplicado en la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón (Zakaria et al., 1998) o de langostilla (Bautista et al., 2001), y en conjunción con tratamientos enzimáticos para desproteínizarlo (Yang et al., 2000). En este proceso, la finalidad es estabilizar la estructura de la astaxantina para posteriormente extraerla. Esta estabilización se debe a que la acidificación por medio de bacterias acidolácticas evita en condiciones reductoras la transformación del pigmento a la forma oxidada; a la vez, el carbonato y el bicarbonato de calcio se solubilizan parcialmente y se lleva a cabo una desproteínización parcial (Torrissen et al., 1981; Chen y Meyers, 1982).

#### **2.4.3.4. Otros métodos de extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)**

A últimas fechas, una nueva técnica que está siendo cada vez más utilizada para la extracción de pigmentos naturales es la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la cual es un método eficiente aunque debe seguirse investigando ya que se generan subproductos de degradación al aplicar ultrasonido a la astaxantina (Zhao et al., 2006).

Ying y colaboradores (2013) reportan el uso de una extracción asistida por ultrasonido como un método alternativo y ambientalmente más amigable para la extracción de carotenoides. Ellos emplearon aceite de soya como solvente y como fuente de carotenoides emplearon zanahorias liofilizadas. Las condiciones óptimas de extracción que ellos hallaron fueron: una relación 2:10 zanahoria:aceite de soya, una intensidad ultrasónica de  $22.5 \text{ Wcm}^{-2}$  a  $40^\circ\text{C}$  durante 20 minutos, logrando que el extracto oleoso tuviera concentraciones de  $\beta$ -caroteno de  $334.8\text{mg/L}$ , superiores a las logradas en extracción con solventes orgánicos y calentamiento donde solamente alcanzaron una concentración de  $321\text{mg/L}$ .

Zhao y colaboradores (2006) sometieron soluciones de astaxantina de  $17.2 \mu\text{M}$  en etanol a las siguientes condiciones:  $25\text{kHz}$ ,  $600\text{W}$  durante periodos de 1, 2, 3, 3, 4, 5 y 6 minutos. Después de este tratamiento las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y los resultados mostraron que con 1 minuto de sonicación bajo esas condiciones, los contenidos de astaxantina disminuyeron en un  $6.42\%$  y a los 6 minutos disminuyeron en un  $29.4\%$ , convirtiéndose la astaxantina en derivados no coloridos.

Como último método de extracción se tiene el de la utilización de fluidos supercríticos. Félix-Valenzuela y colaboradores (2000), reportaron el uso de esta técnica para extraer astaxantina de los residuos del cangrejo azul (jaiba), empleando para ello una mezcla de  $\text{CO}_2$  supercrítico y etanol como codisolvente con la finalidad de extraer la astaxantina de los caparazones de jaiba previamente desmineralizados. Con base en esta técnica, fue posible encontrar apoyados de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) concentraciones de  $30.53\text{mg/mL}$  de astaxantina y de  $140\text{mg/mL}$  de carotenoides no identificados.

A continuación se describirá la metodología que se realizó en los Laboratorios 301, 302 y 303 del Edificio E-3, de Alimentos y Química Ambiental, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM y del Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM

### CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 16 se aprecia el diagrama general de la metodología de la presente investigación.

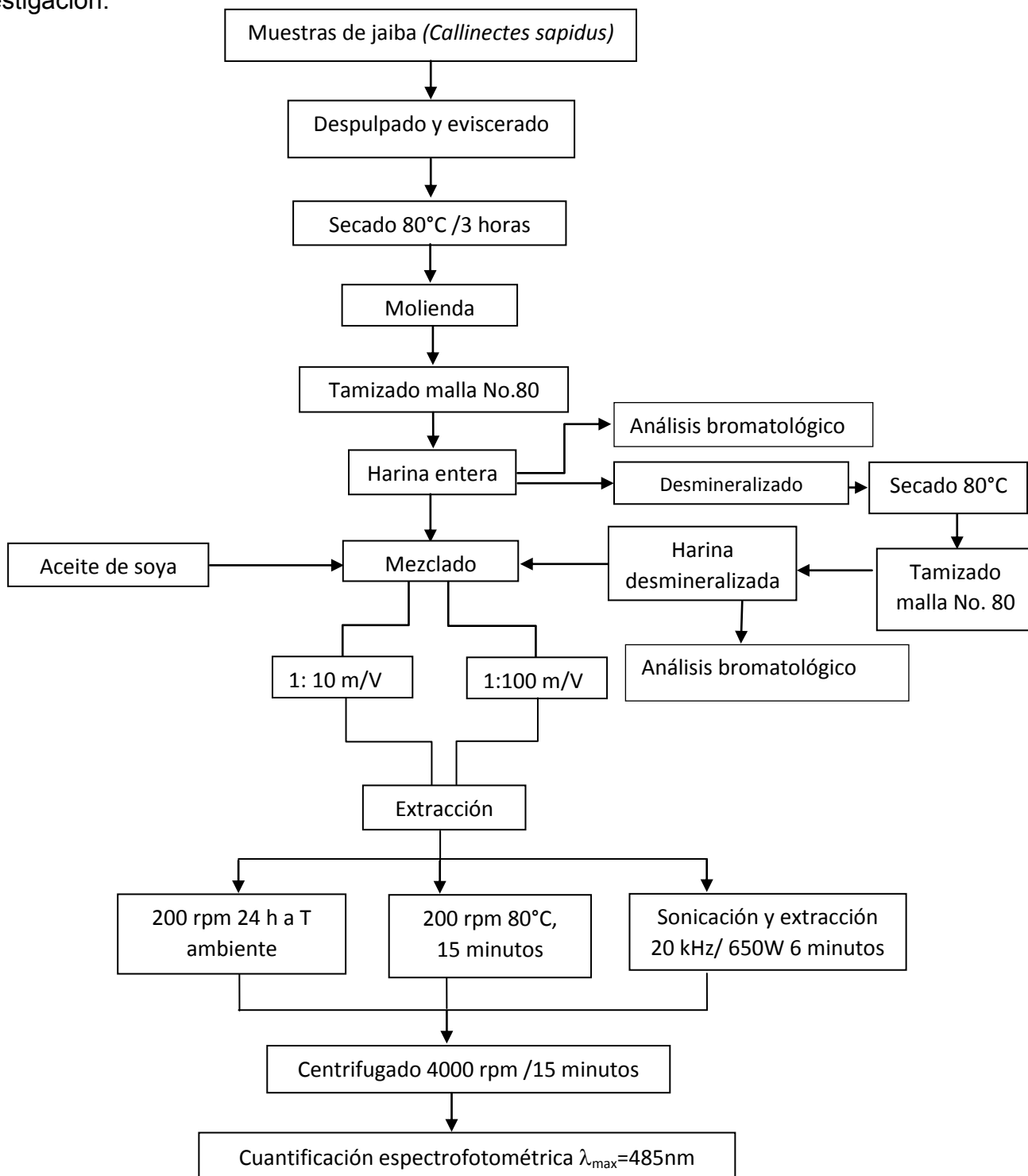


Figura 16. Diagrama de flujo de la metodología realizada

### 3.1. Diseño experimental

El diseño experimental realizado fue de tipo multifactorial involucrando tres factores: a) el tipo de harina, b) la relación harina:aceite de soya y c) el tipo de extracción, con tres réplicas por cada combinación de factores. El factor tipo de harina tuvo tres niveles: Harina entera de caparazón, harina desmineralizada con EDTA dibásico de sodio y harina desmineralizada con ácido acético; el factor relación aceite:harina tuvo dos niveles: una relación 1:10 y una relación 1:100 y, finalmente, el factor extracción contó con tres niveles: **E1** fue la extracción a 200 rpm durante 24 horas y temperatura ambiente, **E2** fue la extracción a 200rpm durante 15 minutos a 80°C y **E3** fue la sonicación a 20 kHz , 650W con pulsaciones de 30 segundos con 20 segundos de descanso entre cada pulsación con un tiempo de proceso efectivo de 6 minutos a 20°C. La variable de respuesta fue la cantidad de pigmento extraído medido como µg de pigmento extraído/mL de aceite de soya. Se realizó un análisis de varianza utilizando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un paquete estadístico (Statgraphics Centurión versión XV.1). En la Tabla 6 se aprecia el diseño experimental propuesto y descrito anteriormente.

**Tabla 6. Diseño experimental propuesto para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)**

	Tipo de harina																	
	Harina entera						Harina desmineralizada con EDTA						Harina desmineralizada con ácido acético					
	Relación harina : aceite de soya						Relación harina : aceite de soya						Relación harina : aceite de soya					
	1:10			1:100			1:10			1:100			1:10			1:100		
	Tipo de extracción			Tipo de extracción			Tipo de extracción			Tipo de extracción			Tipo de extracción			Tipo de extracción		
No. de réplica	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Donde: E1: 200 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, E2: 200 rpm durante 15 minutos a 80°C, E3: Sonicación a 20 kHz 650W durante 6 minutos a 20°C

Respecto al análisis bromatológico se realizó un diseño experimental monofactorial, el factor involucrado fue el tipo de harina y contó con tres niveles: harina entera, harina desmineralizada con EDTA 1M y harina desmineralizada con ácido acético al 8%. La variable

de respuesta fue el contenido del nutrimento analizado ya sea en % o en mg/kg, dependiendo de qué componente alimenticio se trate. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En la Tabla 7 se aprecia el diseño experimental propuesto para el análisis bromatológico.

**Tabla 7. Diseño experimental propuesto para el análisis de los componentes de las harinas de jaiba**

No. de réplica	Tipo de harina		
	Harina entera	Harina desmineralizada con EDTA	Harina desmineralizada con ácido acético
1	√	√	√
2	√	√	√
3	√	√	√

## **3.2. Preparación de la muestra**

### **3.2.1. Materia prima utilizada**

Las jaibas se adquirieron en la zona de pescados y mariscos de la Central de Abastos de la Ciudad de México y se transportaron en bolsas plásticas negras cubiertas con hielo para evitar su descomposición. Las muestras fueron llevadas a los Laboratorios 301, 302 y 303 del Edificio E-3, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM en la Ciudad de México. Una vez adquiridas las muestras se procedió a realizar las operaciones de despulpado y eviscerado, lavado, secado, molienda, tamizado, desmineralizado, almacenado para, una vez obtenidas las harinas realizar la extracción con aceite de soya y la cuantificación de los pigmentos.

### **3.2.2. Procesos de despulpado, eviscerado y lavado**

El eviscerado se realizó de manera manual empleando guantes de látex, se separó el caparazón y las tenazas del resto del cuerpo de la jaiba, eliminándose las vísceras como residuo orgánico biodegradable con la finalidad de dejar limpia la parte que contiene la pulpa, la cual es consumida. Por otro lado, se procedió a romper las tenazas para extraer la pulpa de su interior para dejar únicamente los restos del exoesqueleto.

El lavado se realizó bajo el chorro de agua de la llave para eliminar los restos de vísceras y trozos de pulpa que pudieran estar adheridos a las paredes del caparazón y los restos de las tenazas. Estas aguas residuales con componentes biodegradables van a dar a una de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de la Ciudad Universitaria de la ciudad de México. Se dejaron escurrir los exoesqueletos durante 10 minutos para eliminar el exceso de agua. Se almacenaron en bolsas negras y se mantuvieron en congelación hasta el momento del traslado al laboratorio.

### **3.2.3. Proceso de secado de los caparazones y tenazas**

Las muestras de caparazones y tenazas se distribuyeron en charolas de aluminio secándose bajo diferentes temperaturas y tiempos. La finalidad de esta actividad fue la de disminuir la actividad acuosa y, con ello, aumentar la preservación del producto, al evitarse la descomposición microbiana y enzimática. Por otro lado, al secarse las muestras se desnatura a la principal proteína de estos crustáceos (la crustacianina) dejando más disponible a la astaxantina para su extracción (Jencks y Buten, 1964).

### **3.2.4. Procesos de molienda de los caparazones y tenazas y tamizado de las harinas**

Una vez secos los caparazones y las tenazas, se procedió a su molienda en una licuadora Osterizer™ de tipo casero a su máxima potencia durante tres minutos. Se realizó el tamizado pasando la harina resultante por los tamices de mallas No. 40 y No. 80.

### **3.2.5. Desmineralización de la harina entera**

No hay suficiente información sobre la influencia de la desmineralización en la extracción de los pigmentos de los restos de jaiba, pero en restos de cefalotórax de camarón se ha encontrado que la desmineralización permite una mejor extracción de los pigmentos (Jiménez, 2003). Con la finalidad de no dañar los pigmentos carotenoides (astaxantinas), se emplearon disoluciones de EDTA dibásico de sodio probando diversas relaciones masa: volumen y concentraciones, así mismo se comparó con una desmineralización realizada con ácido acético al 8%. Posteriormente, la harina desmineralizada fue lavada con agua destilada, a temperatura ambiente, hasta que el agua saliera lo más clara posible.

Finalmente, se procedió a otro proceso de secado durante 6 horas a 80°C con la finalidad de conservar la muestra lo más seca posible y evitar su descomposición.

### **3.3. Análisis bromatológico de las harinas enteras y desmineralizadas**

Los análisis bromatológicos a los cuales se sometieron tanto las harinas enteras como las desmineralizadas fueron:

- Humedad
- Cenizas totales
- Proteína por el método Kjeldahl
- Grasa bruta por el método de Soxhlet
- Fibra dietética total por el método enzimático-gravimétrico
- Determinación de calcio por complejometría
- Determinación de fósforo total por el método del fosfomolibdato
- Determinación de hierro por reacción con ortofenantrolina
- Determinación de cloruros por el método de Mohr.

Para conocer de forma detallada cada una de las metodologías anteriormente citadas, consultar el ANEXO 1.

### **3.4. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando aceites vegetales comestibles**

Tanto para las harinas enteras como para las desmineralizadas se llevaron a cabo tres tipos de extracciones bajo las siguientes condiciones: (1) empleando agitación constante a 200 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, (2) agitación constante de 200rpm durante 20 minutos a 80°C, y (3) sonicación a 20 kHz, 650W con pulsaciones de 30 segundos y con 20 segundos de descanso entre cada pulsación con un tiempo de proceso efectivo de 6 minutos a 20°C. Para cada tipo de extracción, se emplearon dos relaciones de harina:aceite de soya. La primera de ellas fue de 1:10 m/v y la segunda 1:100 m/v adicionando, además, 500ppm de Etoxiquin<sup>MR</sup> como sustancia protectora contra la oxidación (Luna, 2003; Jiménez, 2003;



Jiménez-Pichardo, 2009; Torres-Aguirre, 2007). Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos con el objetivo de lograr la separación del aceite pigmentado y los restos de la harina. El extracto oleoso fue recuperado en una probeta. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado. Como control del proceso de extracción se adicionó un patrón empleando una solución de astaxantina comercial con una concentración inicial conocida de 0.0125 mg/mL de astaxantina las cuales se procesaron de igual manera que las muestras de harina.

### **3.5. Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)**

La caracterización del perfil de los pigmentos obtenidos y el estándar de astaxantina se llevó a cabo por medio de un barrido desde 280nm hasta 700nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-Visible marca GBC Scientific Equipment, modelo Cintra 5. De estos perfiles se obtuvo las longitudes de onda para los cuales las absorciones presentaron los máximos valores. Las mediciones se realizaron siguiendo el instructivo del uso del equipo.

La cuantificación de los pigmentos carotenoides disueltos en el aceite de soya se llevó a cabo espectrofotométricamente a través de interpolación de los valores de absorbancia de las muestras, empleando una curva patrón de astaxantina, a una longitud de onda de 485nm.

La curva patrón de astaxantina se elaboró a partir de un estándar de astaxantina, elaborándose para ello una solución madre de concentración conocida (2.46mg /mL) y, a partir de esta, con las diluciones correspondientes, se elaboraron 8 puntos en un rango de concentración de 0.504µg/mL a 6.3µg/mL.

### **3.6. Análisis estadísticos de los datos experimentales**

Los datos experimentales fueron evaluados estadísticamente usando el paquete computacional Statgraphics Centurión versión XV.1

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Proceso de secado de los caparazones y de las tenazas

Para encontrar las condiciones mas adecuadas de secado de las muestras de caparazones y tenazas de jaiba, se sometieron a diferentes temperaturas y tiempos de secado, siendo las temperaturas a probar las siguientes: 80, 100 y 120°C.

En la Figura 17 se aprecia el resultado del secado de las jaibas secadas bajo diferentes temperaturas, observándose que a las temperaturas de 100 y 120°C hubo un daño en los pigmentos carotenoides (astaxantinas) observado por la aparición de una coloración naranja-café (Figuras 16 B y C) en los caparazones y tenazas de estas especies en lugar del naranja vivo característico, el cual, únicamente fue observado cuando se secaron las muestras a una temperatura de 80°C, por lo que a partir de esta observación física se tomó la decisión de secar a 80°C durante 3 horas.

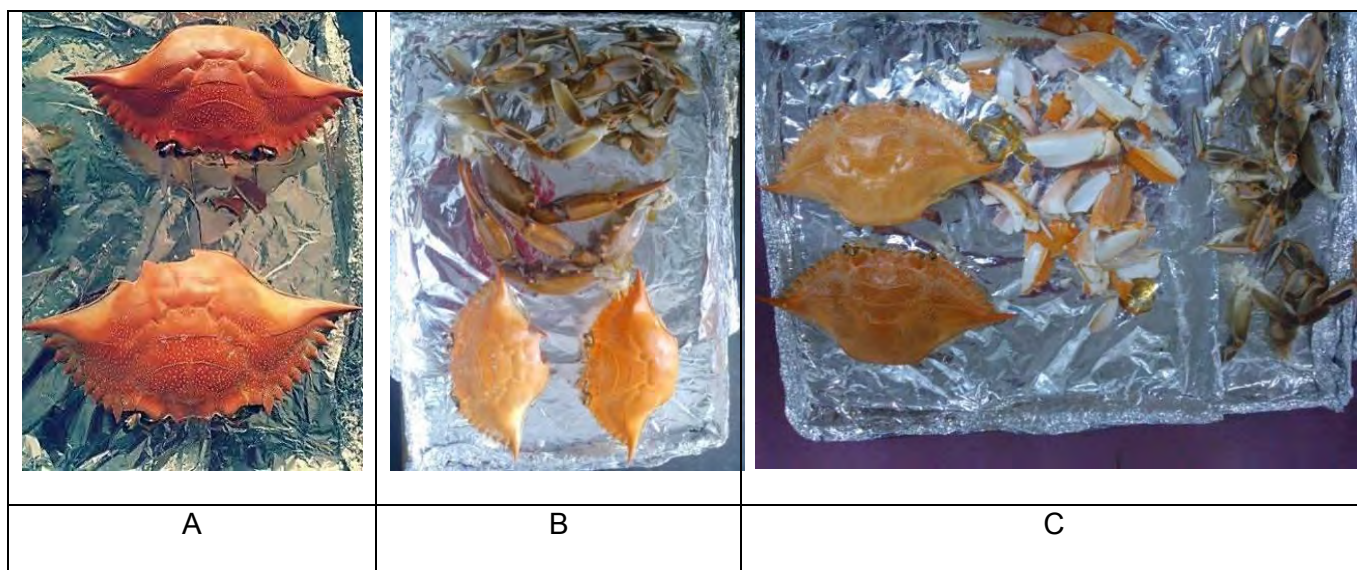
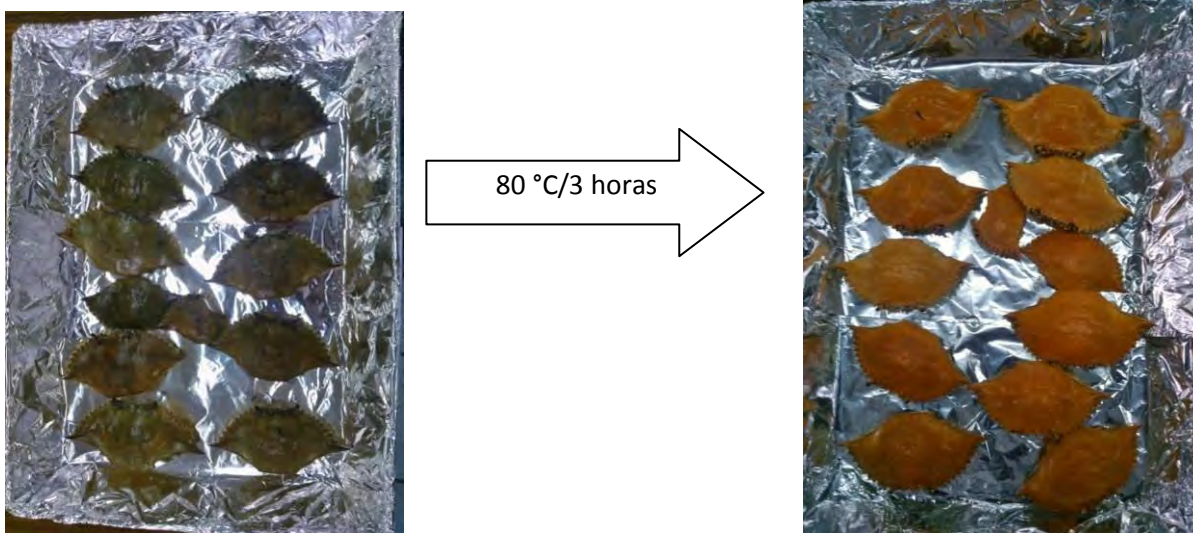


Figura 17. Resultado del secado bajo diferentes temperaturas y tiempos: A) 80°C por 3 horas, B) 100°C 2 hora y C) 110°C durante 1h

Los caparazones y las tenazas de jaiba antes del secado presentaron una humedad del 33.1% después de esta operación los restos contaron con una humedad del 4.61%, con lo cual se logró el objetivo de disminuir la actividad acuosa de las muestras con la finalidad de evitar su descomposición por actividad microbiana y enzimática.

Otra de las finalidades buscadas con el secado fue la desnaturalización de la crustacianina que es el complejo proteico al cual se encuentra unida la astaxantina en los crustáceos el cual, de acuerdo con la literatura, se desnaturaliza de forma irreversible al superar los 59.7°C (Jencks y Buten, 1964). En la Figura 18 se observan las muestras de los caparazones antes y después de ser sometidos al secado, observándose que existe un cambio significativo en la coloración de estos, pasando de ser de un color verde-grisáceo a un color naranja.



**Figura 18. Cambio en la coloración de los caparazones después del secado**

#### **4.2. Molienda de los caparazones y tenazas y tamizado de las harinas**

La molienda de las muestras de jaiba secas se realizó en una licuadora Hamilton beach modelo 50242R-MX a su máxima potencia (1500rpm) durante 3 minutos, moliendo un minuto y descansando otro para evitar el sobrecalentamiento del motor.

Las harinas resultantes de esta molienda fueron pasadas a través de los tamices de malla No. 40 y No. 80, correspondientes a una abertura de malla de 0.420mm y 0.177mm, respectivamente. En la Figura 19 se observa la granulometría resultante de la molienda en donde se aprecia que un 40.2% de la harina presentó un tamaño superior a 0.420mm, un 27% presentó un tamaño entre 0.420 y 0.177mm y solamente el 32.7% restante presentó un tamaño inferior a 0.177mm.

De acuerdo con Jiménez (2003), no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las harinas de camarón que pasan por la malla No 40 y la malla No.80 y haciendo la similitud

de las harinas de camarón con respecto a las harinas de jaiba y debido al gran porcentaje que representa la harina con un tamaño superior a los 0.420mm, para la jaiba se tomaron estos valores de tamizado, decidiéndose trabajar con la mezcla de las harinas que pasan por el tamiz No 40 así como el No 80.

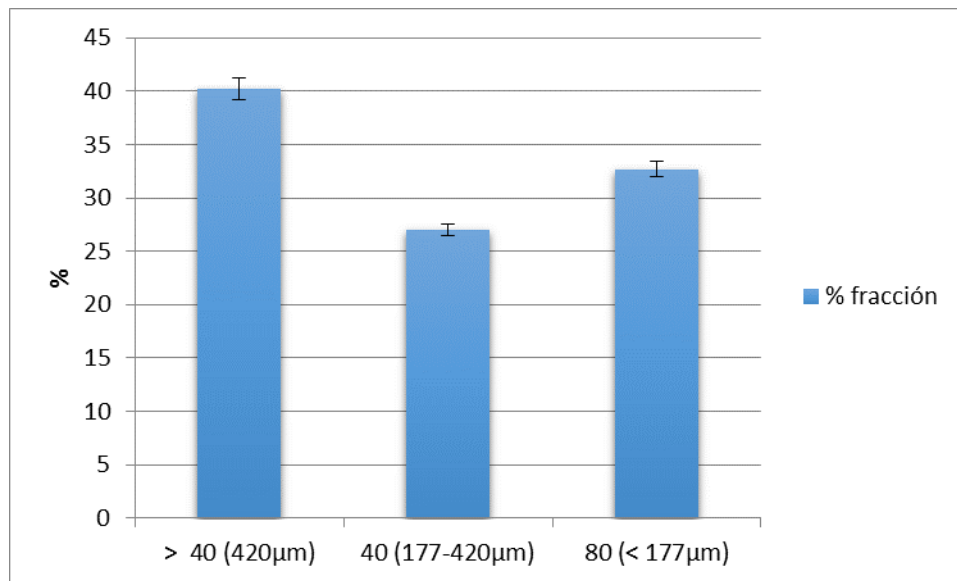


Figura 19. Granulometría resultante de la molienda de los caparzones y tenazas

#### 4.3. Desmineralización de las harinas de jaiba

El alto contenido de cenizas (sales minerales) en el cefalotórax de camarón impiden una adecuada extracción de los pigmentos (Jiménez, 2003; Muzarelli 1977) y dado a que no se conocen las condiciones adecuadas de desmineralización de restos de jaiba, se procedió a realizar pruebas variando la concentración de EDTA dibásico de sodio así como la relación harina:solución desmineralizante. Cabe destacar que las harinas enteras de jaiba contienen un elevado contenido de cenizas (42.7%, m/m), más alto que las del cefalotórax de camarón que son de entre 24-25%, las cuales se encuentra dentro del rango reportado por la literatura (37.18% para los residuos de caparazón y de 53.55% para los residuos de tenazas) (Morillo et al., 2006). En la Tabla 8 se aprecian las diferentes combinaciones de concentración, relación de harina:EDTA probados y el contenido de cenizas resultante después de 3 horas de desmineralización.

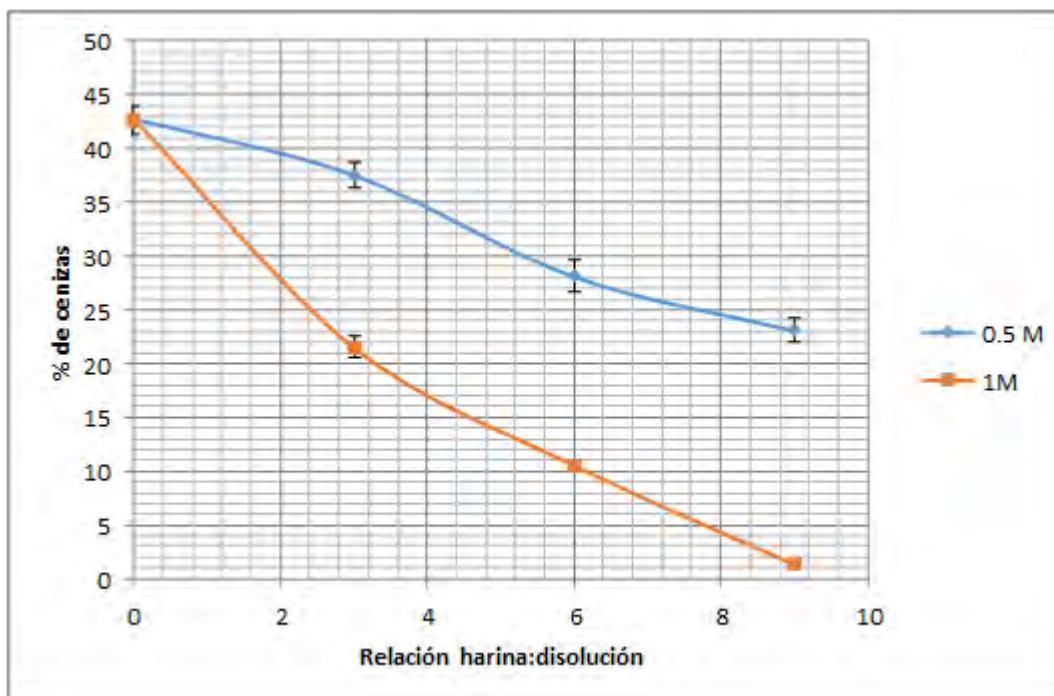
**Tabla 8. Resultados de las pruebas de desmineralización**

Contenido del % de cenizas tras desmineralizar las harinas de jaiba*					
Concentración de EDTA dibásico de sodio					
0.5 M			1.0M		
Relación Harina:Disolución de EDTA			Relación Harina:Disolución de EDTA		
1:3	1:6	1:9	1:3	1:6	1:9
37.5 $\pm$ 1.2	28.1 $\pm$ 1.5	23.1 $\pm$ 1.1	21.7 $\pm$ 1.0	10.6 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.05

\* promedio de tres determinaciones

Tal y como se aprecia en la Figura 20 y en la Tabla 8 el menor contenido de cenizas se logró al usar la mayor concentración de EDTA 1M y la mayor relación de Harina:Disolución 1:9. Cabe mencionar que estas condiciones fueron distintas a las reportadas para la demineralización del cefalotórax del camarón donde fueron empleadas disoluciones de EDTA 0.5M bajo una relación harina:disolución de 1:3 (Jiménez, 2003).

Los datos anteriores fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos vías, ANDEVA, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de cenizas tanto para el factor concentración como para el factor dilución con un nivel de confianza del 95%. Este ANDEVA se puede apreciar en la Tabla 9.

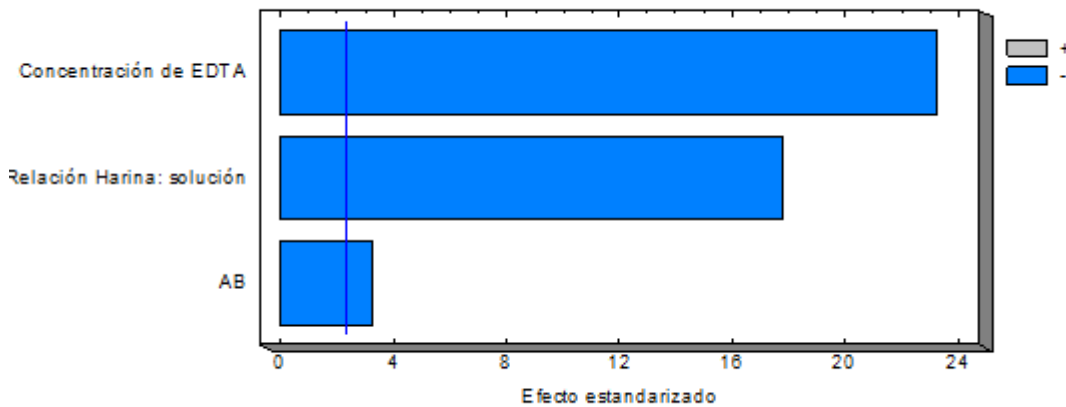


**Figura 20. Gráfica de % ceniza vs relación de harina:disolución a diversas concentraciones de EDTA**

**Tabla 9. Análisis de varianza para % cenizas**

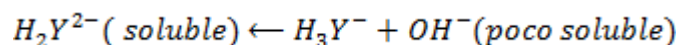
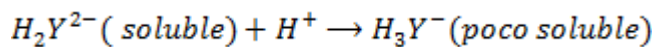
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración de EDTA	1032.31	1	1032.31	538.30	0.0000
B:Relación harina: solución	605.52	1	605.52	315.75	0.0000
AB	20.48	1	20.48	10.68	0.011
Error total	15.34	8	1.917		
Total (corr.)	1673.65	11			

En la Figura 21 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado mostrando la contribución de cada uno de los factores, donde se observa que el factor que más contribuyó a la diferencia estadística, fue la concentración, por lo que resultó más efectivo aumentar la concentración de EDTA que aumentar la relación harina:disolución.

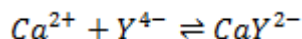


**Figura 21. Diagrama de Pareto estandarizado para el % de cenizas**

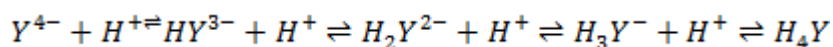
Cabe mencionar que las soluciones de EDTA a concentraciones elevadas son muy difíciles de preparar debido a su baja solubilidad en agua. Por ello, para la elaboración de la disoluciones 1M fue necesario elevar el valor del pH mediante la adición de NaOH hasta obtener un valor de pH de 10 ya que debe recordarse que, como se trata de un ácido, al agregar iones hidróxido el equilibrio se desplaza a la forma soluble como se aprecia en la siguiente ecuación:



De acuerdo con el principio de Le Châtelier, si se aumenta la acidez se favorecerá la protonación del EDTA volviéndolo menos soluble y no solamente eso, sino también con una menor capacidad quelante, ya que debe recordarse que la reacción de complejación del calcio es la siguiente:

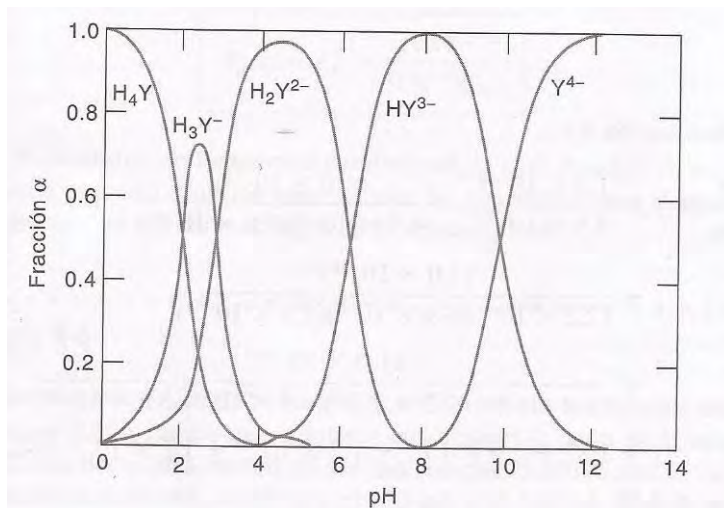


Pero, a su vez, el ligando sufre reacciones de protonación



Y recordando que la forma que reacciona con los metales para formar complejos es la  $\text{Y}^{4-}$ , para tener la mayor complejación del calcio con el EDTA se requiere de un pH alcalino.

Por su parte, las soluciones de EDTA 0.5 M tienen un valor de pH igual a 6, lo cual explica el bajo poder desmineralizante de esa solución porque, tal y como se aprecia en la Figura 22, a ese valor de pH el EDTA existe principalmente en sus formas protonadas  $\text{H}_2\text{Y}^{2-}$  y  $\text{HY}^{3-}$  y no en la forma  $\text{Y}^{4-}$ .



**Figura 22. Fracción de la especie EDTA en función del pH (Gary, 2009)**

Para comparar la eficiencia de la desmineralización con EDTA dibásico de sodio se realizó una desmineralización con ácido acético. Las harinas obtenidas mediante la desmineralización con ácido acético al 8% presentaron un contenido de cenizas de 36.7%,

por lo que el tratamiento con ácido acético fue mucho menos eficiente que el tratamiento que empleó EDTA 1M. Cabe mencionar que se eligió este ácido orgánico debido a que previamente fue empleado en otras investigaciones como la de Félix-Valenzuela et al, (2001); Muzarelli, (1977) y Simpson (1978); estos autores manejaron concentraciones de ácido acético entre un 4 a un 8% (m/v), aunque no reportaron el contenido de cenizas presentes en los restos de cangrejo posterior a la desmineralización.

Una característica muy distintiva entre ambas desmineralizaciones, fue el hecho de que las aguas de lavado obtenidas de la desmineralización con EDTA presentaban una coloración café más intensa en comparación con las aguas de lavado de la harina desmineralizada con ácido acético cuyo coloración era menos intensa tal y como se aprecia en la Figura 23. Esto pudo deberse a que el pH de la solución de EDTA presentó un pH alcalino (pH 10) por lo que es posible que los carotenoides hubiesen sufrido reacciones de saponificación, volviéndolos solubles, por lo cual se perdían en los lavados de las harinas.



**Figura 23. Aguas de lavado de harina desmineralizada con ácido acético al 8%(imagen izquierda) y con EDTA 1M (imagen derecha)**

Lo anterior deberá corroborarse con el análisis bromatológico en el caso de que se llegara a observar una gran disminución en el contenido de grasa de las muestras, esperándose que exista una menor concentración de pigmentos carotenoides en las harinas desmineralizadas con EDTA.

Dado que la astaxantina se encuentra de manera mono o diesterificada, la reacción de saponificación es muy similar a la que sufren los triglicéridos y los ácidos grasos tal y como se aprecia en la Figura 24 (Yuan y Chen, 1999).



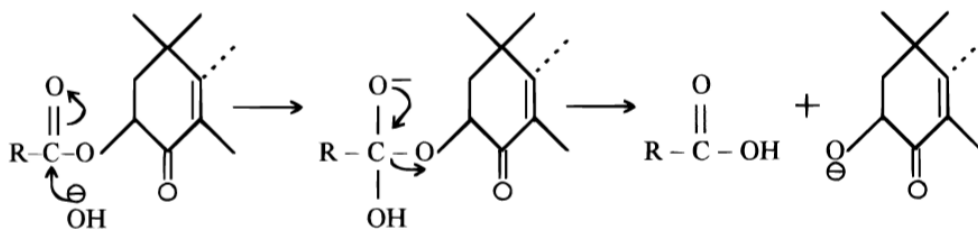


Figura 24. Reacción de hidrólisis de los esteres de astaxantina (Yuan y Chen, 1999)

#### 4.4. Caracterización de las harinas de restos de jaiba

Los resultados obtenidos del análisis bromatológico de las harinas entera así como de las harinas desmineralizadas con EDTA dibásico de sodio se presentan en la Tabla 10. Los resultados del análisis bromatológicos de los caparazones y el residuo de las tenazas obtenidos en esta investigación fueron comparados con los datos obtenidos por Morillo y colaboradores (2006).

Tabla 10. Análisis bromatológico de las harinas de caparazón y tenazas de jaiba

Componente (% m/m)	Tipo de harina de jaiba			Referencia		
	Entera	Desmineralizada con EDTA	Desmineralizada con ácido acético	Morillo et al., 2006		
				Abdomen	Caparazón	Tenaza
<b>Humedad</b>	3.6 <sup>±0.2</sup>	3.15 <sup>±0.72</sup>	3.62 <sup>±0.07</sup>	5.46 <sup>±0.32</sup>	5.73 <sup>±0.32</sup>	5.27 <sup>±0.32</sup>
<b>Cenizas</b>	42.74 <sup>±0.45</sup>	1.4 <sup>±0.11</sup>	36.7 <sup>±0.63</sup>	29.27 <sup>±1.03</sup>	37.18 <sup>±1.03</sup>	53.55 <sup>±1.07</sup>
<b>Grasa</b>	5.2 <sup>±0.89</sup>	0.38 <sup>±0.12</sup>	3.63 <sup>±0.99</sup>	4.64 <sup>±0.35</sup>	6.18 <sup>±0.35</sup>	0.04 <sup>±0.35</sup>
<b>Proteína*</b>	20.45 <sup>±1.82</sup>	7.09 <sup>±1.87</sup>	22.68 <sup>±5.92</sup>	41.76 <sup>±0.53</sup>	27.37 <sup>±0.53</sup>	22.57 <sup>±0.53</sup>
<b>Fibra**</b>	22.15 <sup>±0.27</sup>	82.5 <sup>±1.07</sup>	28.15 <sup>±1.4</sup>	NR	NR	NR
<b>Hidratos de carbono***</b>	5.86 <sup>±0.73</sup>	5.48 <sup>±0.76</sup>	5.22 <sup>±0.40</sup>	NR	NR	NR

NR: No reportado, \*Factor de conversión de nitrógeno a proteína para residuos de crustáceos utilizado fue 9.11577 (Lim y Sessa, 1995)., \*\*Incluye quitina, \*\*\* Calculado por diferencia

Como se aprecia en la Tabla 10, los resultados obtenidos para la harina entera de caparazones y tenazas sin pulpa de jaiba fueron muy similares a los reportados por Morillo y colaboradores (2006), quienes analizaron los residuos de jaiba para cada una de sus fracciones, es decir abdomen, caparazón y tenazas. Cabe mencionarse que en la presente

investigación las harinas enteras fueron obtenidas de la molienda de la mezcla de los residuos de caparazones y tenazas.

En cuanto al contenido de proteína de la harina entera el obtenido fue ligeramente menor al reportado por Morillo y colaboradores (2006) ya que ellos reportaron en promedio un contenido de proteína del 24.97%, mientras que en las muestras analizadas se determinó un 20.45%. Esta diferencia se vió atribuída a que durante la preparación de la muestra, tanto los caparazones como tenazas fueron lavados perfectamente, desprendiendo cualquier resto de tejido que pudiese quedar adherido. En el estudio de Morillo y colaboradores, emplearon residuos obtenidos directamente de una planta procesadora de crustáceos, por lo que es probable que tuviesen restos de tejido adheridos al caparazón y tenazas, lo cual podría incrementar el contenido proteínico.

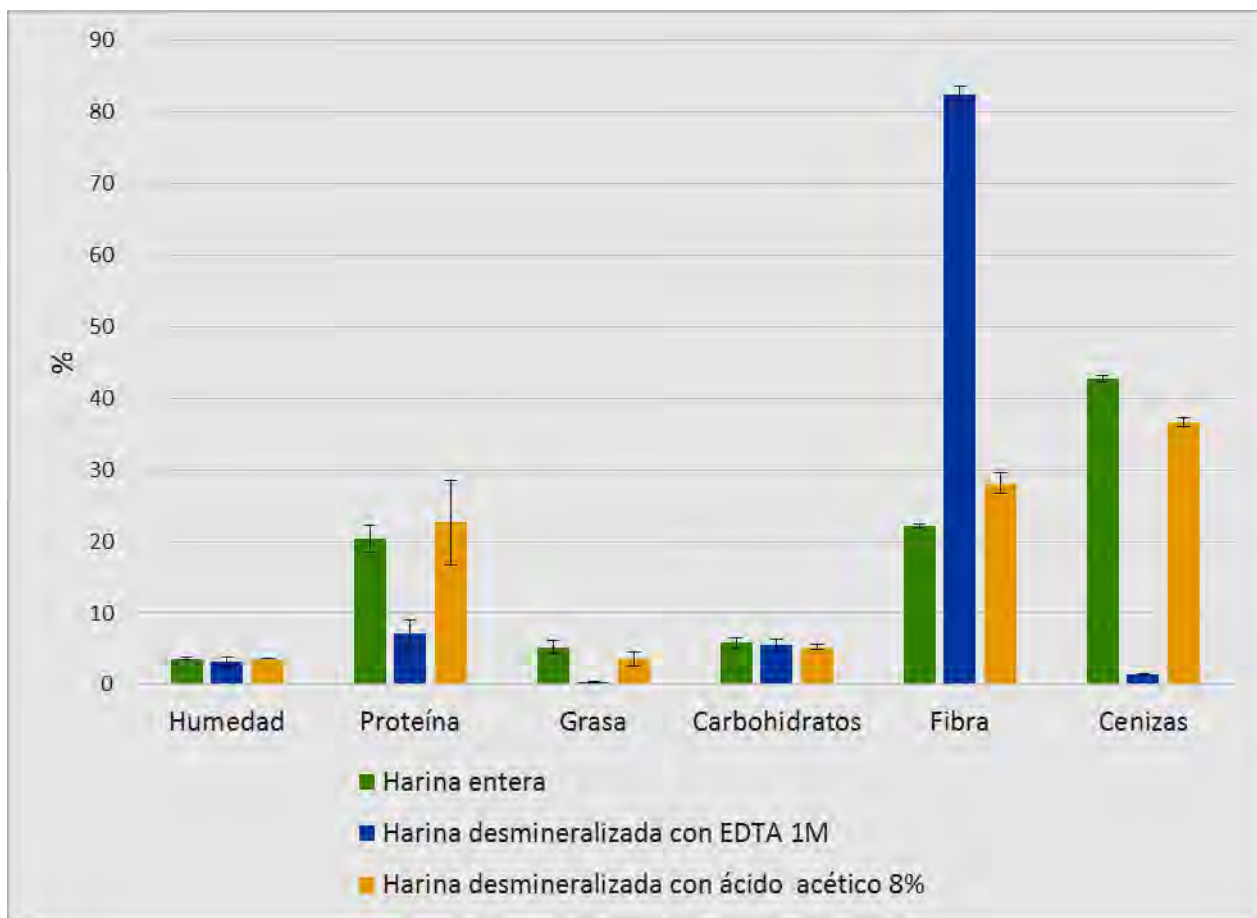
En cuanto al elevado contenido de cenizas, se procedió a realizar un análisis más detallado de los minerales principales que se encuentran en estos residuos. Los minerales analizados fueron el calcio, el fósforo, el hierro y los cloruros. Los resultados de estas determinaciones se aprecian en la Tabla 11.

**Tabla 11. Composición mineral de las harinas de jaiba**

Mineral	Tipo de harina de caparazón y residuos de tenazas			Referencia	
	Entera	Desmineralizada con EDTA	Desmineralizada con ácido acético	Montiel (2012)	
				Caparazón	Tenaza
Calcio	27.45 <sup>±1.1</sup> %	0.15 <sup>±0.0075</sup> %	22.5 <sup>±1.1</sup> %	25.52%	32.93%
Fósforo	1.22 <sup>±0.05</sup> %	0.064 <sup>±0.007</sup> %	0.971 <sup>±0.05</sup> %	1.924%	1.138%
Hierro	95 <sup>±9.9</sup> ppm	168 <sup>±20.1</sup> ppm	345.2 <sup>±36.9</sup> ppm	306ppm	108ppm
Cloruros	0.44 <sup>±0.12</sup> %	0.14 <sup>±0.03</sup> %	3.51 <sup>±0.28</sup> %	1.001%	1.065 %

De la mezcla de minerales el que se encontró en mayor abundancia fue el calcio, el cual representó el 27.45% de estos residuos. Este mineral se encuentra en forma de carbonato de calcio y es lo que brinda la rigidez al exoesqueleto de estos crustáceos. También se aprecia que este resultado coincidió con lo reportado por Montiel (2012), quien indica un porcentaje de calcio en un 25.52% para caparazón y un 32.93% para tenaza. Cabe resaltar que en esta

investigación las harinas se obtuvieron de una mezcla de caparzones y tenazas de jaiba adquiridas en la zona de pescados y mariscos de la central de abastos en la ciudad de México. Para el resto de los minerales, se observaron diferencias con lo reportado por Montiel (2012). Esto pudo deberse al empleo de metodologías diferentes. Montiel determinó estos minerales por medio de absorción atómica, mientras que en la presente investigación se determinaron por colorimetría empleando curvas de calibración (Anexos 3 y 4 para hierro y fósforo) y por el método de Mohr (para cloruros). Es evidente que el proceso de desmineralización cambió drásticamente la composición de las harinas, por lo cual, para clarificar estos resultados, en la Figura 25 se muestra la comparación de la composición de las harinas de caparzones y residuos de tenazas enteras, las desmineralizadas con EDTA dibásico y con ácido acético, respectivamente.



**Figura 25. Comparación de la composición de las harinas de jaiba**

Como se aprecia en la Figura 25, en primer lugar, se observó que la desmineralización empleando EDTA dibásico de sodio 1M en una relación 1:9 (harina:solución

desmineralizante) resultó ser muy efectiva y drástica, ya que el contenido de cenizas disminuyó de un 42.74% a solamente 1.4%, lo cual era lo esperado. Por su parte, el uso del ácido acético no disminuyó de forma considerable el contenido de cenizas, siendo de 36.7%. Al realizar el análisis de varianza (ANDEVA) correspondiente, se encontró que, puesto que el valor de P fue menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del % de cenizas entre cada uno de los tipos de harina. La Tabla ANDEVA para este análisis se encuentra en el ANEXO 6 Tabla A.6.1.

Para saber entre qué grupos existió una diferencia estadísticamente significativa se realizó la prueba de rangos múltiples encontrándose que los tres tipos de harina fueron estadísticamente diferentes en cuanto a su contenido de cenizas (los resultados estadísticos de manera detallada se pueden consultar en el ANEXO 6 Tabla A 6.2 ).

En cuanto al contenido de humedad no se presentaron diferencias estadísticamente significativas con un  $\alpha=0.05$  (ANEXO 6 Tabla A 6.3), siendo de un 3.60% para las harinas enteras, de un 3.15% para la harina desmineralizada con EDTA y de un 3.62% para las harinas desmineralizadas con ácido acético, lo cual concuerda con lo esperado, ya que todas las harinas fueron sometidas a procesos de secado similares.

Para las proteínas se esperaba que aumentase el contenido proteínico debido al efecto de concentración que se sufre al eliminar algún componente. Sin embargo, se observó una disminución pasando del 20.45% a solamente un 7.04% en las harinas desmineralizadas con EDTA. Esto pudo deberse al valor de pH alcalino de la solución desmineralizante, la cual se encontraba a un pH cercano de 10. Recordando que las proteínas a pH alcalino sufren reacciones de hidrólisis, dando como resultado la presencia de péptidos y aminoácidos, que son solubles. Los productos resultantes de la hidrólisis alcalina de las proteínas muy probablemente se perdieron en las aguas de lavado durante la operación unitaria de desmineralización. Esto concuerda con lo reportado por No y colaboradores (1989) quienes reportaron que alrededor de 2/3 partes de las proteínas son removidas al lavar los exoesqueletos con agua caliente o con una solución alcalina.

Al realizar el análisis de varianza (ANEXO 6 Tabla A 6.4) se encontró la existencia de una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en el contenido proteínico de las harinas de jaiba. Mediante una prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.5), se encontró que el contenido de proteína en las harinas enteras y en las harinas desmineralizadas con ácido resultaron estadísticamente iguales. A su vez, estos dos tipos de harinas fueron estadísticamente diferentes en cuanto a su contenido proteínico con respecto de las harinas desmineralizadas con EDTA dibásico, lo cual, posiblemente se deba a los fenómenos anteriormente descritos.

Otra de las consecuencias del pH alcalino de la solución de EDTA fue la posible reacción de saponificación de la grasa presente en los residuos de jaiba, la cual se aprecia en la Figura 25, ya que se denota un marcado descenso en cuanto al contenido de grasa, pasando del 5.2% en las harinas enteras al 0.38% en las harinas desmineralizadas con EDTA.

Los resultados de las harinas desmineralizadas con ácido acético confirmaron esta hipótesis, ya que se obtuvieron contenidos de grasa del 3.63%, valor más cercano al de las harinas enteras, con lo cual se confirmó que esta enorme pérdida fue debida al pH alcalino ( $\text{pH} \approx 10$ ) de la solución de EDTA dibásico de sodio.

El análisis estadístico ANDEVA (ANEXO 6 Tabla A 6.6) corroboró que si existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de grasa en los diversos tipos de harinas de jaiba. Al igual que con las proteínas, la prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.7) demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las harinas enteras y las harinas desmineralizadas con ácido acético, pero que estos dos grupos sí son estadísticamente diferentes con respecto a las harinas desmineralizadas con EDTA. Esto quizás se deba a las reacciones de saponificación que ocurrieron durante la desmineralización con EDTA.

En cuanto al contenido de fibra en las harinas enteras éste fue de 22.15%, lo cual concuerda con lo indicado por Garzón y colaboradores (1993), quienes reportaron que el contenido de quitina en crustáceos oscila entre un 15 a un 30%.

Generalmente, la rigidez de los exoesqueletos de los crustáceos se debe a la inclusión de sales de calcio en los espacios existentes entre las fibras de quitina, a las que ocasionalmente son adheridas las proteínas. Así mismo se ha reportado que la quitina puede estar asociada a pigmentos cetocarotenoides (cantaxantina y astaxantina) (Calvo-Carrillo et al., 1995).

Como puede apreciarse, la quitina es la base estructural del exoesqueleto de los crustáceos y, debido a esta resistencia, no sufre ningún cambio durante los tratamientos desmineralizantes.

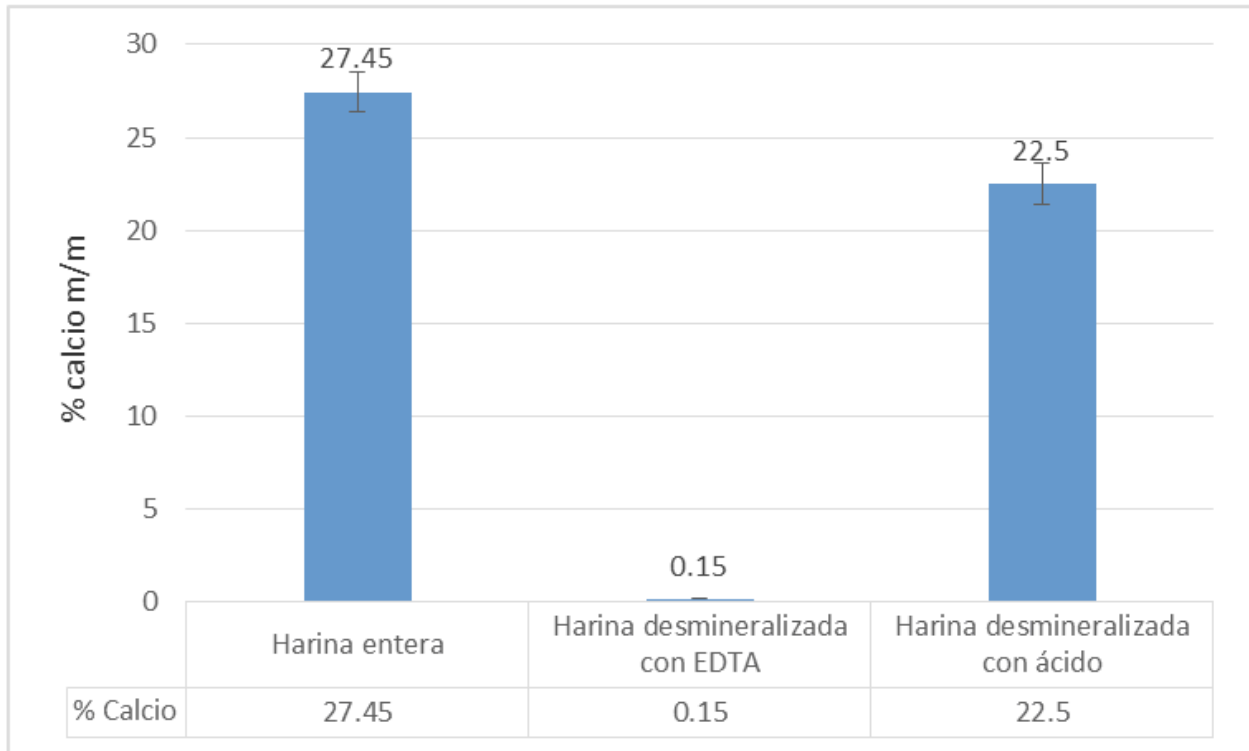
Considerando lo anterior, se apreció un notable incremento de este componente en las harinas desmineralizadas, llegando a ser de un 82.5% para las harinas desmineralizadas con EDTA con respecto del 28.15% para las harinas desmineralizadas con ácido acético. El análisis de varianza correspondiente (ANEXO 6 Tabla A 6.8) indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de fibra entre los diferentes tipos de harinas. Al realizar la prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.9), se encontró que sí existió una diferencia estadísticamente significativamente entre los tres tipos de harinas de residuos de jaiba, es decir, los contenidos de fibra fueron totalmente diferentes para los tres tipos de harinas.

Finalmente, los carbohidratos, por otra parte, no se vieron afectados por el proceso de desmineralización, lo cual se aprecia en el ANDEVA correspondiente (ANEXO 6 Tabla A 6.10), el cual indicó que no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos, por lo que el contenido de carbohidratos quedó en cantidades muy similares en los tres tipos de harinas (5.86% , 5.48% y 5.22%, para harina entera, desmineralizada con EDTA y desmineralizada con ácido acético, respectivamente).

El mineral preponderante en las harinas de jaiba fue el calcio, representando un 27.45%(m/m). Es por ello que la finalidad pretendida con la desmineralización fue la de eliminar este componente para facilitar la extracción de los pigmentos carotenoides. Como se puede apreciar en la Figura 26, la desmineralización con EDTA 1M en una relación

harina:disolución 1:9 resultó ser más efectiva en la remoción de calcio que una disolución de ácido acético al 8%(v/v) en la misma proporción harina:disolución desmineralizante (1:9).

La descalcificación en el caso del EDTA fue cercana al 99% mientras que en el caso del ácido acético fue de aproximadamente el 20%.



**Figura 26. Comparación en el contenido de calcio de las diversas harinas de jaiba**

Al realizar el análisis de varianza correspondiente ANDEVA (ANEXO 6 Tabla A 6.11) se encontró la existencia de diferencias estadísticamente significativas para el contenido de calcio en los tres tipos de harinas. Al realizar la prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.12) se encontró que ninguno de los tipos de harinas fueron estadísticamente iguales en lo que respecta al contenido de calcio.

Otro de los minerales que sufrió una importante disminución durante el proceso de desmineralización fue el fósforo. Hay que recordar que el calcio se encuentra en forma de

carbonatos o fosfatos en el exoesqueleto de los crustáceos, por lo que al perderse el calcio, se pierde el fósforo asociado a él. El análisis de varianza ANDEVA (ANEXO 6 Tabla A 6.13) mostró que, al igual que con el calcio, existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al contenido de fósforo en los diferentes tipos de harinas de jaiba. A su vez, la prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.14) mostró que los tres grupos fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Por su parte, el hierro mostró un incremento en la concentración de las harinas desmineralizadas pasando de 95mg/kg en las harinas enteras a 168mg/kg en las harinas desmineralizadas. Esto se debe al exceso de calcio que ocasiona que todo el EDTA se encuentre complejoado de la forma  $\text{CaY}^{2-}$  por lo que no queda EDTA disponible para complejar al hierro. El comportamiento del hierro en las harinas desmineralizadas con ácido fue también de un incremento, solamente que para estas harinas fue mucho más marcado, teniéndose concentraciones de hasta 345.2mg/kg.

El análisis de varianza ANDEVA (ANEXO 6 Tabla 6.15) indicó que si existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al contenido de hierro, por lo que para saber si alguno de estos grupos fueron estadísticamente similares respecto al contenido de hierro se llevó a cabo una prueba de rango múltiple (ANEXO 6 Tabla A 6.16) encontrándose que ninguno de los grupos fueron estadísticamente similares.

Finalmente, para el contenido de cloruros (determinado como NaCl), el comportamiento observado fue de un descenso para el caso de las harinas desmineralizadas pasando de un 0.44% a solo un 0.14%. Contrario a esto fue lo ocurrido con las harinas desmineralizadas con ácido acético, en donde se apreció un notable incremento, llegando estas harinas a contener una media de 3.51% de NaCl.

El análisis estadístico ANDEVA (ANEXO 6 Tabla A 6.17) mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Por su parte, la prueba de rangos múltiples (ANEXO 6 Tabla A 6.18) indicó que entre las harinas desmineralizadas con EDTA y las harinas enteras no hubieron diferencias estadísticas respecto en cuanto al contenido de NaCl. Por su



parte, las harinas desmineralizadas con ácido acético presentaron un contenido de NaCl estadísticamente diferente tanto para las harinas enteras como para las harinas desmineralizadas con EDTA.

#### 4.5. Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)

Para determinar la concentración de los pigmentos extraídos de las harinas de jaiba (entera y desmineralizadas), se utilizó una curva de calibración de astaxantina comercial (ANEXO 5). Los resultados de las extracciones se aprecian en la Tabla 12 y en la Figura 27.

De acuerdo con la Figura 27, la máxima concentración de carotenoides (astaxantina) en el extracto oleoso se obtuvo con las harinas enteras en una relación harina:aceite de 1:10 y mediante el calentamiento a 80°C durante 15 minutos.

**Tabla 12. Concentración de pigmentos carotenoides en diferentes tipos de harina de desechos de jaiba**

Tipo de harina											
Harina entera				Harina desmineralizada EDTA				Harina desmineralizada ácido			
Relación harina: aceite de soya				Relación harina: aceite de soya				Relación harina: aceite de soya			
1:10		1:100		1:10		1:100		1:10		1:100	
Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción	
E1	5.50 <sup>±0.25</sup>	E1	1.21 <sup>±0.25</sup>	E1	1.77 <sup>±0.3</sup>	E1	0.013 <sup>±0.01</sup>	E1	1.72 <sup>±0.23</sup>	E1	0.38 <sup>±0.2</sup>
E2	6.89 <sup>±0.11</sup>	E2	1.84 <sup>±0.17</sup>	E2	2.51 <sup>±0.04</sup>	E2	0.24 <sup>±0.21</sup>	E2	6.81 <sup>±0.23</sup>	E2	0.12 <sup>±0.05</sup>
E3	6.08 <sup>±0.15</sup>	E3	1.29 <sup>±0.21</sup>	E3	1.59 <sup>±0.11</sup>	E3	0.55 <sup>±0.15</sup>	E3	3.95 <sup>±0.28</sup>	E3	0.44 <sup>±0.06</sup>

Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones y se encuentran en µg de astaxantina/mL de aceite de soya. Donde: E1: 200rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, E2: 200rpm durante 20 minutos a 80°C, E3: Sonicación a 20 kHz 650W durante 6 minutos a 20°C

Al comparar la extracción entre los tres tipos de harinas analizadas: a) harina entera, b) harina desmineralizada con EDTA dibásico de sodio y c) harina desmineralizada con ácido, se observó que para los tres métodos de extracción y las dos relaciones harina:aceite, siempre se obtuvo una mayor concentración de pigmentos carotenoides (astaxantinas) en las harinas enteras. En el caso de las harinas desmineralizadas con EDTA, la astaxantina se volvió más polar y se perdió en las aguas de lavado debido al fenómeno de hidrólisis de los ésteres de astaxantina (saponificación) (ver Figuras 23 y 24).

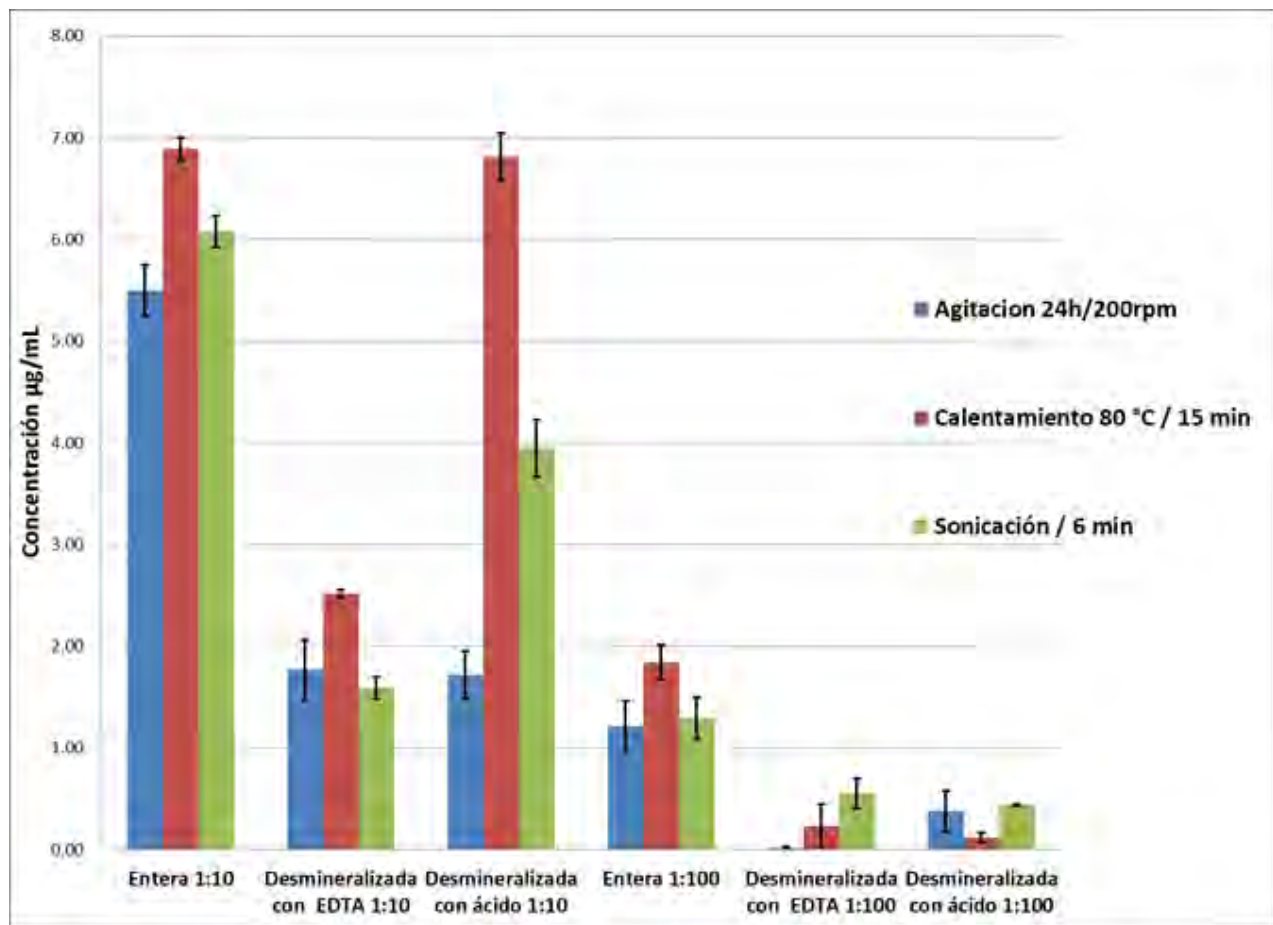


Figura 27. Concentración de pigmentos carotenoides (astaxantina)

Los datos de la concentración de pigmentos carotenoides fueron analizados mediante un análisis multivariable con un  $\alpha=0.05$ , los resultados de dicho análisis se aprecian en la Tabla 13.

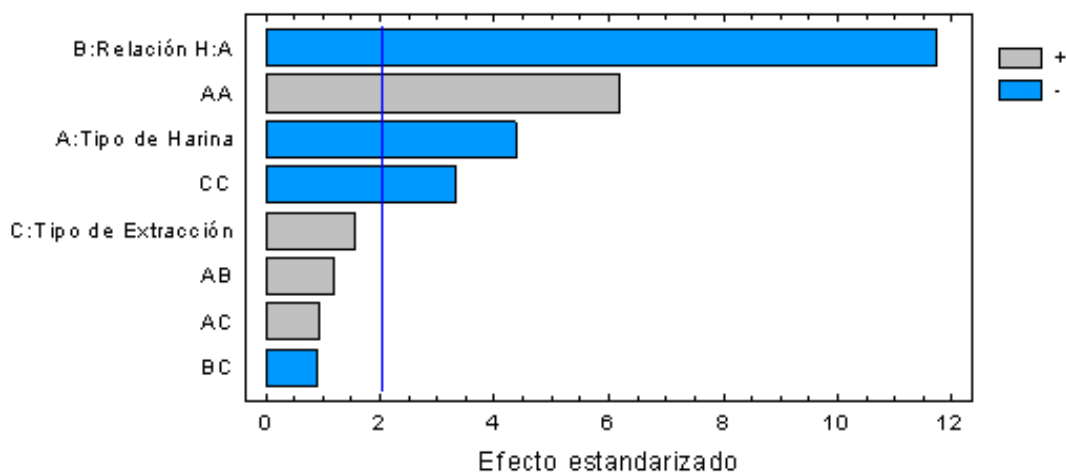
Tabla 13 Análisis de varianza realizado para la concentración de pigmentos carotenoides obtenidos de los diferentes tipos de harinas

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
<b>A:Tipo de harina</b>	21.91	1	21.91	19.18	0.0001
<b>B:Relación H:A</b>	157.63	1	157.63	138.00	0.0000
<b>C:Tipo de extracción</b>	2.74	1	2.74	2.40	0.1282
AB	1.68	1	1.68	1.47	0.2313
AC	0.96	1	0.96	0.84	0.3637
BC	0.92	1	0.93	0.81	0.3722
ABC	12.70	1	12.70	11.12	0.0017
Error total	51.40	45	1.14		
Total (corr.)	293.57	53			

Donde: Gl= grados de libertad

Dado que el valor de P de la prueba F fue menor que 0.05 para los factores: (A) tipo de harina, (B) relación harina aceite y de la interacción (ABC) entre los tres factores, se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

En la Figura 28 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado mostrando la contribución de cada uno de los factores, donde se observa que los factores que más contribuyeron a la diferencia estadística, fueron la relación harina:aceite y el tipo de harina. Por su parte el tipo de extracción no influyó en la diferencia estadística.

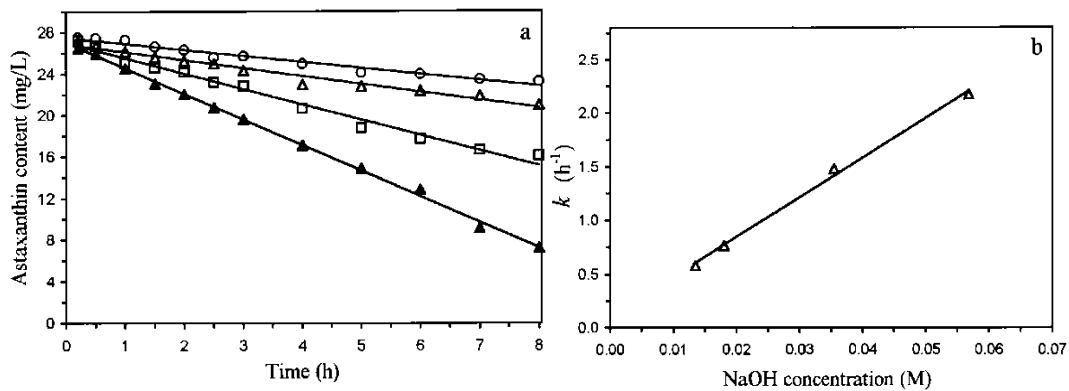


**Figura 28 Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de pigmentos carotenoides**

Al realizar una comparación entre los tres métodos de extracción se observó que al parecer el método más eficiente para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) en el aceite de soya fue el calentamiento a 80°C con una agitación de 15 minutos, seguido de la sonicación y, por último, de la agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Sin embargo, al analizar los resultados de la ANDEVA y del diagrama de Pareto se concluye que resulta indiferente el tipo de extracción que se empleó, siempre y cuando se mantenga constante la misma relación harina: aceite y el tipo de harina.

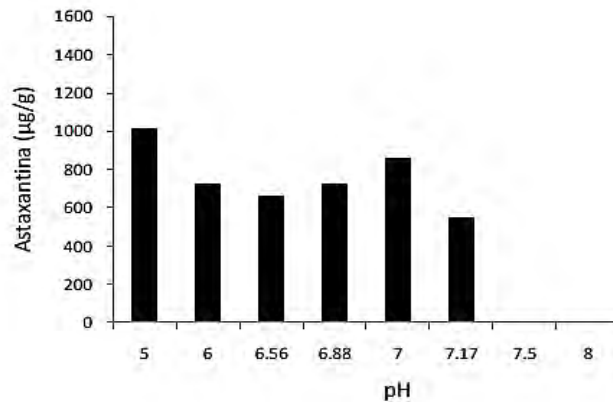
Yuan y Chen (1999) reportaron que el NaOH puede degradar en gran medida a la astaxantina. Ya que a elevadas concentraciones de NaOH (>0.05M) se presentan una gran cantidad de reacciones de degradación que, si bien aún no se tiene claro cuáles son los

mecanismos de degradación, sí se sabe que a partir de un pH  $\geq 8$  se sigue una cinética de orden cero, tal y como se aprecia en la Figura 29.



**Figuras 29. a) Disminución de la concentración de astaxantina a diversas concentraciones de NaOH 0.01M (O), 0.02M (Δ), 0.04M (□) y 0.06M (▲). b) Incremento de la constante de degradación conforme se aumentó la concentración de NaOH (Yuan y Chen, 1999)**

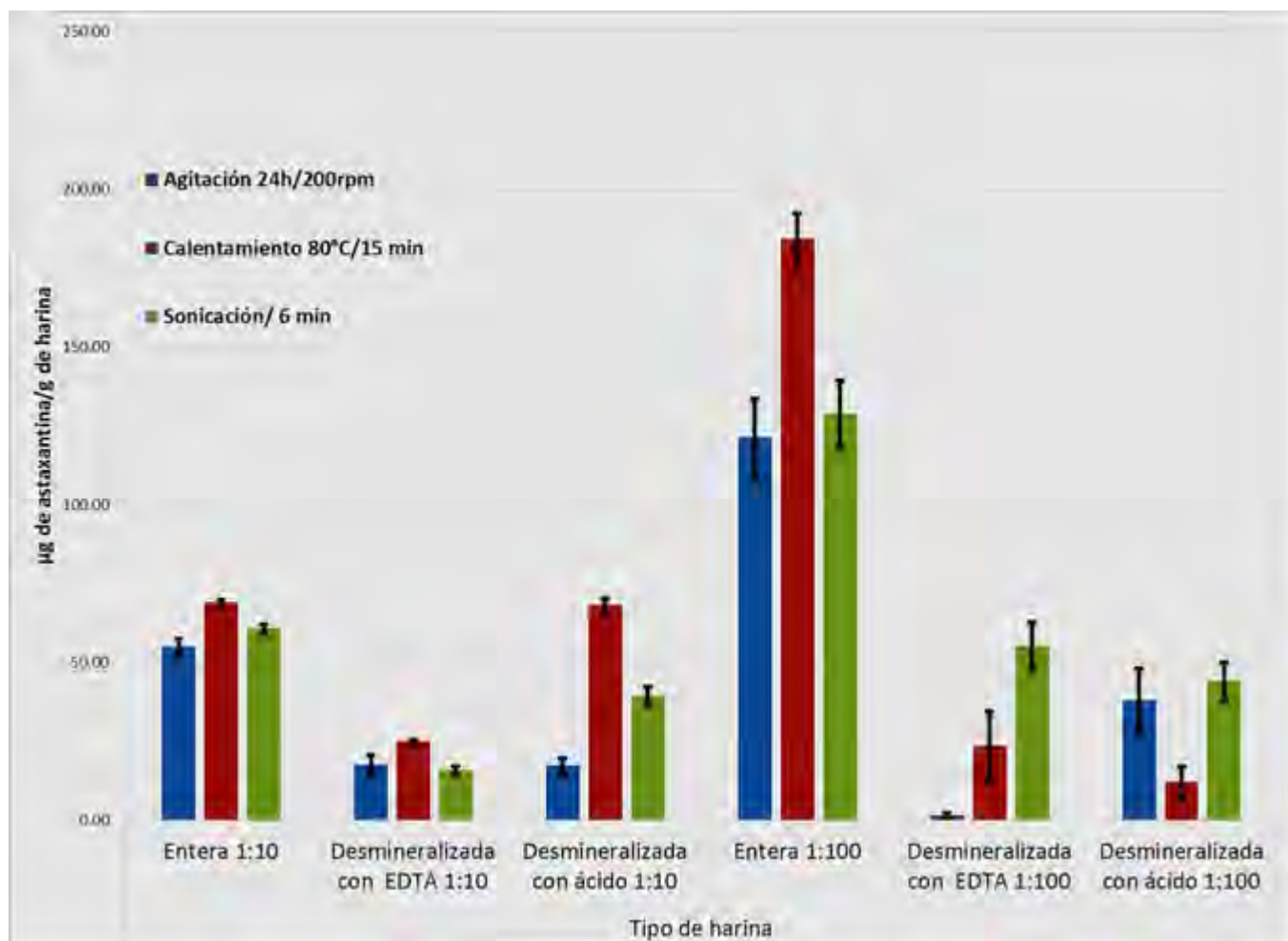
Por su parte, Herrera-Andrade y colaboradores (2011), estudiaron la estabilidad de la astaxantina después de la saponificación, encontrando que el pH óptimo obtenido fue de 5 (ver Figura 30) y que, a partir de un pH=8, las reacciones de degradación afectan severamente el contenido de astaxantina, por lo cual, es recomendable tener la astaxantina en medios ácidos para de esta manera evitar su degradación.



**Figura 30 .Concentración de astaxantina (μg/g) en función del ajuste de pH (Herrera-Andrade et al., 2011)**

En el caso de saber cuál de las dos relaciones de harina:aceite empleadas fue la más eficiente, fue necesario hacer una transformación de los datos y presentarlos como μg de astaxantina/g de harina, es decir, determinar cuánto pigmento se obtuvo por cada gramo empleado. Para ello, se construyó la Figura 31 en donde se aprecia que la mayor cantidad de

pigmentos por gramo de harina fue obtenida al emplearse una relación 1:100 de harina:aceite de soya. De igual manera, se obtuvieron mayores concentraciones de pigmentos carotenoides en la harina entera al ser extraída mediante calentamiento a 80°C/15 min que en las harinas desmineralizadas.



**Figura 31. Cantidad de pigmentos (astaxantina) obtenidos por cada gramo de harina**

Por ello, si bien es verdad que se obtuvo un mayor rendimiento al emplear una relación 1:100 (Figura 31), la mayor concentración (pigmentación) del extracto oleoso (Figura 27) se logró obtener bajo una relación 1:10, por lo que en futuras investigaciones sería necesario experimentar con más relaciones de harina:aceite de soya, para encontrar las condiciones óptimas donde se gaste la menor cantidad posible de harina y se logre obtener una pigmentación adecuada del extracto oleoso.

En la Tabla 14 se muestra una comparación del contenido de astaxantinas presentes en las harinas de jaiba con respecto a lo reportado en la literatura, cabe mencionar que el contenido de pigmentos carotenoides (astaxantinas) fueron comparados con otras especies de crustáceos y con otros métodos de extracción debido al limitado número de investigaciones que han trabajado con jaiba.

También se aprecia que el máximo contenido de pigmentos carotenoides (astaxantinas) en la presente investigación fue superior a lo reportado por De-Dios (2002) y por Félix-Valenzuela y colaboradores (2001), mostrando que fue más eficiente la extracción de pigmentos carotenoides con aceite de soya respecto a la extracción con una mezcla de solventes orgánicos e incluso mayor a la extracción mediante fluidos supercríticos.

En lo que respecta a la especie, se observa que para la jaiba (*C. sapidus*) la concentración de pigmentos carotenoides (184µg/g) fue mayor a la obtenida por algunos investigadores empleando otras especies como lo fueron el camarón, el cangrejo de la nieve o la langosta.

**Tabla 14. Comparación del contenido de astaxantinas obtenidas en la presente investigación contra lo reportado por la literatura**

Contenido de pigmentos (µg/g)	Fuente	Método de extracción	Referencia
184	<i>C. sapidus</i>	Calentamiento en aceite de soya	Presente investigación
30.5	<i>C. sapidus</i>	Extracción con fluidos supercríticos CO <sub>2</sub> / Metanol	Félix-Valenzuela et al., 2001
62.2	<i>C. sapidus</i>	Extracción con mezcla de éter de petróleo:acetona:agua	De-Dios, C., 2002
147.7	<i>P. borealis</i> (Camarón)	Calentamiento en aceite de hígado de bacalao	Shahidi y Synowiecki, 1991
97.69	(Camarón café)	Calentamiento en aceite de girasol	Tenorio, E., 2013
119.6	<i>Ch. opilio</i> (cangrejo de la nieve)	Calentamiento en aceite de hígado de bacalao	Shahidi y Synowiecki, 1991
153	<i>P. clarkii</i> (Langosta)	Extracción con mezcla de éter de petróleo:acetona:agua	Meyers y Bligh, 1981

#### 4.6. Porcentaje de recuperación de los pigmentos carotenoides para cada tipo de extracción

Como control del proceso de extracción se adicionó un patrón empleando una solución de astaxantina comercial con una concentración inicial conocida de 0.0125 mg/mL de astaxantina las cuales se procesaron de igual manera que las muestras de harina. Los resultados del % de recuperación obtenido de cada uno de los tres métodos de extracción empleados (agitación a 200 rpm a temperatura ambiente por 24 horas, calentamiento a 80°C durante 15 minutos y sonicación a 20kHz por 6 minutos) se aprecian en la Figura 32, siendo el porcentaje de recuperación de 96% para la agitación a temperatura ambiente, de 94% para el calentamiento a 80°C y de 90% para la sonicación a 20kHz por 6 minutos.

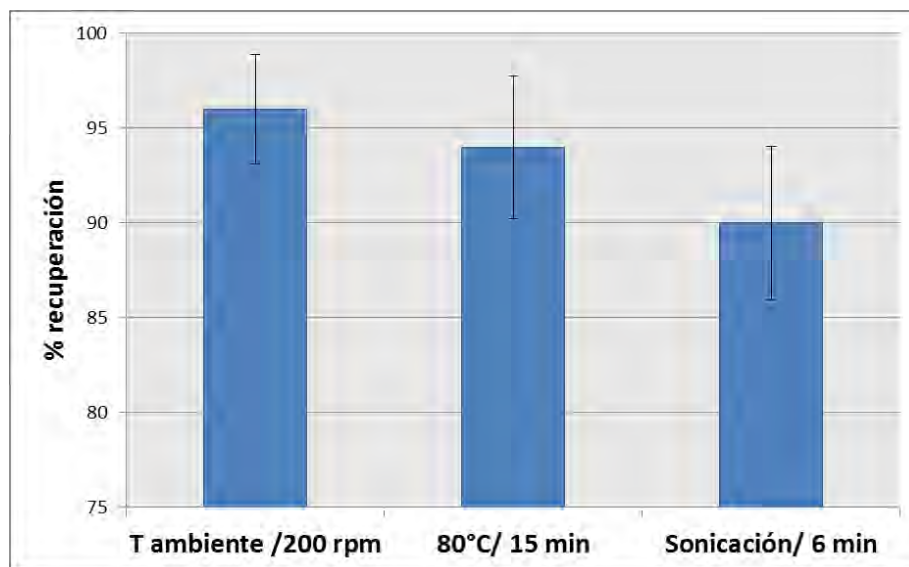


Figura 32. Porcentaje de recuperación de astaxantina para cada tipo de extracción

La pérdida de pigmentos en el proceso de agitación es probable que se deba al constante contacto del oxígeno con el pigmento, por su parte la pérdida durante la extracción a 80°C se debe a las altas temperaturas, ya que éste es uno de los principales factores que aceleran las reacciones de degradación de lípidos. La extracción asistida por ultrasonido fue la que mayor daño ocasionó a los pigmentos carotenoides, lo cual concuerda con lo reportado con Zhao y col. (2006), quienes encontraron en su investigación que el someter durante 6 minutos a la astaxantina a 600W se ocasionaba una pérdida del 14% de este pigmento degradándose en compuestos no coloridos. Esto puede deberse al fenómeno de cavitación, que involucra la formación, crecimiento y rápido colapso de burbujas microscópicas. La

cavitación genera elevadas temperaturas en puntos locales de la solución, así como a la acción mecánica entre las interfaces sólido-líquido, lo cual ocasiona la degradación de la astaxantina. Por ello se debe ser muy cuidadoso con las condiciones de ultrasonido empleadas al realizar cualquier tipo de extracción para evitar dañar la molécula de interés (Zhao, et al., 2006).

**Tabla 15. Análisis de varianza para el porcentaje de recuperación de cada uno de los métodos de extracción**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	447.077	2	223.54	20.52	0.0021
Intra grupos	65.3645	6	10.89		
Total (Corr.)	512.442	8			

Donde: Gl= grados de libertad

El análisis de varianza se aprecia en la Tabla 15, donde se observa que a pesar de lo descrito previamente, no existió diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de recuperación entre los tres tipos de extracciones estudiados en la presente investigación.



## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Con base en el objetivo general que fue: Obtener pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de residuos de jaiba empleando una extracción sólido-líquido con aceite de soya como disolvente, se tienen las siguientes conclusiones:

- La mayor pigmentación del extracto oleoso se obtuvo con la harina entera, empleando una relación harina: aceite 1:10 y calentando a 80°C con una agitación durante 15 minutos, alcanzando concentraciones de 6.89µg/mL
- La mayor cantidad de astaxantina obtenida por gramo de harina, se obtuvo con la harina entera, en una relación harina:aceite 1:100 y un calentamiento de 80°C durante 15 minutos, lográndose obtener 184.3µg/g harina

Las conclusiones derivadas de los objetivos específicos fueron las siguientes:

- Las condiciones adecuadas para el secado de los desechos de jaiba sin dañar al pigmento y lograr una disminución de la humedad y la desnaturalización de la crustacianina fueron de 80°C durante 3 horas
- El 60% de las harinas obtenidas presentaron un tamaño de partícula menor a los 420µm
- La humedad de los desechos de jaiba fueron de 33.1% y después del secado fue de 4.61%
- La cantidad de cenizas inicial en los desechos de jaiba fue de 42.7% coincidiendo con lo reportado por Morillo y colaboradores (2006)
- El mayor porcentaje de desmineralización se logró al usar una solución de EDTA 1M con una relación 1:9 de harina:disolución desmineralizante, lográndose obtener harinas desmineralizadas con solamente 1.41% de cenizas
- Resultó más efectivo aumentar la concentración de EDTA que aumentar la relación harina:disolución para llevar a cabo la desmineralización de la misma

- Los análisis bromatológicos de los restos de jaiba concuerdan con lo reportado en la literatura, a excepción de algunos minerales como son el fósforo, el hierro y los cloruros, debido a las diferencias en las técnicas analíticas empleadas para su determinación
- La desmineralización con EDTA dibásico 1M, afectó severamente la composición de las harinas, por lo que si bien fue posible demineralizar en un 99%, se daña severamente a las proteínas y los lípidos ocasionando una disminución de éstos
- Respecto del contenido de humedad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de harinas
- Se encontró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto al contenido de proteína en las harinas enteras y desmineralizadas
- La prueba de rangos múltiples indicó que el contenido proteínico fue igual para las harinas enteras y las desmineralizadas con ácido acético, no así con las harinas desmineralizadas con EDTA
- El pH alcalino ocasionó que las harinas enteras y desmineralizadas presentaran diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de grasa, siendo menores en las harinas desmineralizadas con EDTA
- Se encontró diferencia estadísticamente significativa una  $P(<0.05)$  respecto del contenido de fibra (quitina). No se encontró la existencia de grupos homogéneos, respecto del contenido de fibra
- En cuanto al contenido de carbohidratos no se encontró diferencia estadísticamente significativa, lo cual concuerda con lo esperado ya que ninguna de las reacciones de desmineralización debería afectarlos
- La composición mineral resultó ser diferente en cada una de los tipos de harina de jaiba, encontrándose diferencia estadísticamente significativa en cada uno de los minerales analizados: calcio, fósforo, hierro y cloruros
- El pH alcalino de la solución desmineralizadora ocasionó pérdida de los carotenoides (astaxantinas) además de su degradación
- Mediante el análisis de varianza multifactorial realizado con un nivel de significancia del 0.05 se encontró la existencia de diferencias estadísticamente significativas para dos de los factores analizados (tipo de harina y relación harina:aceite), así como la

interacción de los tres factores: tipo de harina, relación harina: aceite y tipo de extracción

- El pH jugó un papel primordial en la estabilidad de la astaxantina

## **5.2. Recomendaciones**

- De acuerdo con la última conclusión, sería recomendable para investigaciones futuras realizar estudios acerca de la degradación de astaxantina a diversos valores de pH por ejemplo, de 5, 7 y 10
- En futuras investigaciones se deberán probar otros agentes desmineralizantes como lo son el ácido láctico, el ácido propiónico y el ácido clorhídrico diluido
- Se deberán encontrar las condiciones óptimas del tiempo de proceso para cada tipo de extracción
- Se sugiere emplear otros aceites comestibles, para la extracción de los pigmentos, como el de girasol , canola o pescado para verificar su eficiencia en la extracción de pigmentos carotenoides (astaxantinas) así como realizar un estudio de la cinética de degradación de la astaxantina tomando en consideración el pH
- Por último, se propone estudiar la extracción de los pigmentos carotenoides empleando nuevas relaciones de aceite harina de jaiba

## ANEXO 1

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

#### A.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR SECADO EN ESTUFA (DOF, 1986)

##### Fundamento

Este método se basa en las mediciones de la pérdida de masa debida a la evaporación de agua a una temperatura cercana a la de ebullición. La porción de agua libre perdida aumenta al elevar la temperatura, por lo que es importante comparar únicamente los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de secado.

##### Procedimiento

1. Pesar de 2 a 3 gramos de muestra en un pesafiltros con tapa (previamente colocado a masa constante 2h a 130°C)
2. Secar las muestras 2 horas en estufa a 100-110°C
3. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en el desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente
4. Repetir hasta masa constante
5. Calcular el porcentaje de humedad

##### Cálculos

$$\%humedad = \frac{A - B}{m} \times 100$$

##### donde

A: Masa del pesafiltros + muestra húmeda

B: Masa del pesafiltros + muestra seca

m: Masa de la muestra en gramos

## A.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS (DOF, 1978)

### Fundamento

Las cenizas son el producto que permanece después de la calcinación del material orgánico o inorgánico a altas temperaturas (500-600°C). Este residuo contiene óxidos y sales.

### Procedimiento

En un crisol a masa constante, poner de 3 a 5 g de muestra por analizar; colocar el crisol con muestra en una parrilla y quemar lentamente el material hasta que ya no desprenda humos, evitando que se proyecte fuera del crisol.

Llevar el crisol a una mufla y efectuar la calcinación completa a 550-600°C.

Dejar enfriar en la mufla, transferirlo al desecador para su completo enfriamiento y determinar la masa del crisol con cenizas.

### Cálculos

$$\% \text{ cenizas} = \frac{A - B}{m} \times 100$$

donde:

A: Masa del crisol + cenizas

B: Masa del crisol vacío

m: Masa de la muestra en gramos

### **A.1.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (DOF, 1980)**

#### **Fundamento**

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbono de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en  $\text{SO}_2$ , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniaco con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método, de Kjeldahl-Gunning, se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

#### **Procedimiento**

1. Determinar la masa, en la balanza analítica, de aproximadamente un gramo de muestra y pasarla cuantitativamente a un matraz Kjeldahl, añadirle 2g de sulfato de cobre, 10g de sulfato de sodio anhidro, 25mL de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio.
2. Colocar el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y dejar por 30 minutos más a esa temperatura.
3. Enfriar y añadir de 400 a 450cm<sup>3</sup> de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 ó 4 gránulos de zinc, un poco de parafina cuando sea necesario y 50mL de hidróxido de sodio 6N.
4. Inmediatamente conectar el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500mL que contenga 50mL de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.
5. Destilar hasta que haya pasado todo el amoniaco, que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente 300mL.

6. Retirar el matraz receptor y titular el destilado con HCl 0.1N.

### Cálculos

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m}$$

**donde:**

V: Volumen de ácido empleado en la titulación, en mL

N: Normalidad del HCl

m: Masa de la muestra en gramos

El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente.

#### **A.1.4. DETERMINACIÓN DE GRASA BRUTA POR EL MÉTODO SOXHLET (Nielsen, 2003)**

##### **Fundamento**

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente, éste es retornado al matraz de calentamiento por efecto sifón para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de masa entre el matraz con el extracto lipídico y el matraz a masa constante.

##### **Procedimiento**

1. Colocar a masa constante un matraz bola de fondo plano con perlas de ebullición
2. Pesar 4 a 5 gramos de muestra sobre papel filtro, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con algodón u colocar el cartucho en el extractor
3. Conectar el matraz al extractor y posteriormente este al refrigerante. Agregar dos cargas del disolvente (éter etílico) por el refrigerante y calentar el matraz con parrilla a ebullición suave
4. Verificar que se ha extraído toda la grasa dejando caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa
5. Una vez extraída toda la grasa, quitar el cartucho con la muestra desengrasada, seguir calentando hasta casi la total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargue
6. Quitar el matraz y secar el extracto en la estufa a 100°C por una hora, enfriar y pesar

##### **Cálculos**

$$\%grasa = \frac{A - B}{m} \times 100$$

##### **Donde:**

A: Masa del matraz con grasa

B: Masa del matraz a masa constante

m: Masa de la muestra



## A.1.5. DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL (Manual Sigma, 2002)

### Fundamento

La fibra dietética es una mezcla de sustancias orgánicas complejas e inicialmente fue definida como los polisacáridos presentes en las paredes celulares de las plantas y que resisten la hidrólisis causada por las enzimas del hombre. Actualmente se considera que es la suma de los componentes no digeribles de un comestible o producto alimentario. (Nielsen, 2003). Esta definición ahora incluye a las hemicelulosas, celulosas, ligninas, pectinas, gomas, oligosacáridos no digeribles y ceras.

Este método está basado en el que está publicado en la 16ª edición de los métodos oficiales de análisis de la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* de los EEUU.

Este método determina el contenido de fibra dietética total en alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras secas y libres de grasa son gelatinizadas con una  $\alpha$ -amilasa estable al calor y luego son enzimáticamente digeridas con proteasa y amiloglucosidasa para remover las proteínas y el almidón de las muestras. Se añade etanol para precipitar la fibra dietética soluble. El residuo es filtrado después y lavado con etanol y acetona. El residuo se pesa después de ser secado. La mitad de las muestras se analiza para proteínas y la otra mitad para cenizas. La fibra dietética total es la masa del residuo menos la masa de las proteínas y cenizas.

### Procedimiento

1. Lavar los crisoles y secar a 525°C durante 1 hora.
2. Añadir 0.5g de celita a cada uno de los crisoles y secar a 130°C hasta obtener masa constante. Registrar esta masa como "Celita+Masa de crisol" o W1. Almacenar en el desecador hasta su uso
3. Pesar 1 gramo de muestra en vasos de precipitados de 250mL Las muestras no deben diferir en sus masas más de 20mg. Registrar la masa de cada una de las muestras
4. Añadir 50mL de solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de fosfatos a pH de 6 a cada vaso de precipitados
5. Adicionar 0.1mL de  $\alpha$ -amilasa a cada vaso y mezclar

6. Cubrir cada vaso de precipitados con aluminio y colocarlo en un baño de agua hirviendo. Agitar los vasos suavemente cada 5 minutos. Incubar por 15 minutos después de que la temperatura en los vasos alcance los 95°C
  7. Retirar los vasos del baño de agua y esperar a que alcancen la temperatura ambiente
  8. Ajustar el pH de las soluciones a  $7.5 \pm 0.2$  añadiendo 10mL de NaOH 0.275N. Verificar el pH y, de ser necesario, ajustar con NaOH o HCl
  9. Inmediatamente antes de su uso, preparar una solución de proteasa cuya concentración sea 50mg/mL, empleando solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de fosfatos como disolvente. Añadir 0.1mL de esta solución a cada uno de los vasos de precipitados
  10. Cubrir cada vaso de precipitados con papel aluminio y colocar en un baño de agua a 65°C. Incubar con agitación continua durante 30 minutos después que la temperatura interna haya alcanzado los 60°C
  11. Retirar los vasos del baño de agua y esperar a que alcancen la temperatura ambiente
  12. Ajustar el pH de la solución a un valor de pH 4.0-4.6, para esto añadir 10mL de HCl 0.375 a cada vaso. Verificar el pH, de ser necesario ajustar con NaOH o HCl.
  13. A cada uno de los vasos añadir 0.1mL de amilogucosidasa
  14. Cubrir cada vaso de precipitados con papel de aluminio y colocar en un baño de agua a 65°C. Incubar con agitación continua durante 30 minutos después que la temperatura interna haya alcanzado los 60°C
  15. Añadir 100mL de etanol al 95% a cada uno de los vasos de precipitado
  16. Humedecer y redistribuir la cama de celita en cada uno de los crisoles usando etanol al 78%. Aplicar suavemente succión para secar la celita. Mantener la succión suave y cuantitativamente transferir el precipitado y la suspensión de cada vaso de precipitados a su respectivo crisol
  17. Lavar el residuo con tres porciones de 20mL de etanol al 78%, dos porciones de 10mL de etanol al 95% y dos porciones de 10mL de acetona
- Una goma puede formarse en algunas muestras atrapando el líquido. De presentarse esta situación romper la superficie de la película con una espátula, asegurar que ninguna partícula de material quede adherido a la espátula o el crisol.

El tiempo de filtración y lavados es muy variable de muestra a muestra, siendo de 0.1 hasta 6 horas

18. Secar los crisoles que contienen el residuo durante 12 horas a 105°C en una estufa convencional o a 70°C en una estufa de vacío

19. Enfriar los crisoles en un desecador y registrar esta masa como “Residuo+Celita+Masa de crisol” o W2

20. Analizar el residuo de dos muestras y dos blancos para proteínas usando el método Kjeldahl

21. Calcinar el residuo de dos muestras y dos de los blancos por 5 horas a 525°C. Enfriar en un desecador hasta masa constante, registrar esta masa como “cenizas+ Celita+ Masa de crisol” o W3

### **Cálculos:**

Masa del residuo = W2-W1

Masa de cenizas= W3-W1

B= R<sub>blanco</sub>-P<sub>blanco</sub> - A<sub>blanco</sub>

$$\%FDT = \left( \frac{R_{muestra} - P_{muestra} - A_{muestra} - B}{SW} \right) \times 100$$

### **donde:**

FDT: Fibra dietética total

R: promedio de la masa del residuo (mg)

P: Promedio de la masa de proteínas (mg)

A: Promedio de la masa de las cenizas (mg)

SW: Promedio de la masa de las muestras

## A.1.6. DETERMINACIÓN DE CALCIO POR VALORACIÓN CON EDTA (Nielsen, 2003)

### Fundamento

El ligando hexadentado etilenodiaminotetracetato (EDTA) forma complejos muy estables 1:1 con numerosos iones inorgánicos. Los complejos son fuertemente dependientes del pH ya que a valores de pH bajos, las posiciones quelantes se protonan, disminuyendo de esta forma su concentración efectiva. Los puntos finales se detectan utilizando quelantes que presenten colores diferentes en cada uno de sus estados, acomplexado y libre. En el caso del calcio se emplea la calmagita o la murexida, ver Glosario (Nielsen, 2003).

### Procedimiento

#### Reactivos

- Ácido clorhídrico 6N
- EDTANa<sub>2</sub> 0.01M
- Indicador murexida
- NaOH 4N
- Solución estándar de CaCl<sub>2</sub> o CaCO<sub>3</sub> 0.1N
- Trietanolamina 30% V/V

#### Preparación de reactivos:

**Indicador murexida:** Mezclar 0.25g de murexida (purpurato de amonio) con 25g de NaCl. Almacenar en un recipiente.

**Solución estándar de carbonato de calcio:** Secar 0.1g de carbonato de calcio a 100°C por 3 horas. Pesar 0.04g de este carbonato y transferir a un matraz aforado de 50mL usando no más de 10mL de agua desionizada. Agregar gota a gota ácido clorhídrico 1M hasta que la solución sea clara y no se observe efervescencia a. Aforar el matraz.

**Solución de CaCl<sub>2</sub> 0.01N:** Disolver 0.11g de CaCl<sub>2</sub> secado a 100°C. Durante 2 horas y disolverlo en 10mL de HCl 3N. Aforarlo a 100mL con agua destilada.

**Solución de EDTA 0.01M:** Pesar en un vidrio de reloj la cantidad necesaria de la sal dibásica de sodio del EDTA para preparar 250mL de la solución 0.01M. En un matraz aforado de 250mL, colocar 50mL de agua destilada, transferir el EDTA al balón con la ayuda de un embudo y de un frasco lavador, agitar hasta que el EDTA se haya disuelto (el EDTA se disuelve lentamente), una vez disuelto completar el volumen con agua destilada.

### **Normalización**

Colocar 5mL de muestra de la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01N en un matraz Erlenmeyer de 125mL, añadirle 5 gotas de NaOH 4N, enseguida agregarle 50 mg de murexida y finalmente titular con EDTA (sal dibásica de sodio) hasta un cambio de vire de rosa a púrpura.

### **Determinación**

- a) Pesar 2 g de muestra en un crisol y calcinar a  $600^\circ\text{C}$  por 2 h
- b) Enfriar y pasar las cenizas a un vaso de precipitados de  $100\text{ cm}^3$
- c) Agregar  $25\text{ cm}^3$  de ácido clorhídrico 6 N
- d) Digerir hasta mitad del volumen aproximadamente
- e) Dejar enfriar y transferir al matraz volumétrico de  $100\text{ cm}^3$  con ayuda de un embudo y papel filtro
- f) Aforar al volumen con agua destilada y agitar
- g) Tomar una alícuota de  $20\text{ cm}^3$  y llevar a un matraz o vaso de precipitados
- h) Agregar 4 mL de NaOH 4N o el volumen suficiente para obtener pH 12-13
- i) Agregar 2-3 gotas de la solución de trietanolamina al 30%
- j) Adicionar aproximadamente 0.1g del indicador murexida
- k) Titular gota a gota con la solución de EDTA hasta que el color de la solución cambie de rojo a violeta

•Repetir la operación por triplicado.

## Cálculos

$$\%Ca = \frac{xmL(N)}{V_A} \times \frac{V_a}{m} \times \frac{40g}{1mol Ca} \times 100$$

### donde:

X : mililitros gastados en la titulación

N : normalidad de la solución de EDTA

m: Masa de la muestra

V<sub>A</sub>: Volumen de la alícuota

V<sub>a</sub>: Volumen del aforo

## **A.1.7. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL (Nielsen, 2003)**

### **Fundamento**

El método se basa en la formación de fosfomolibdato que en presencia de ácido ascórbico se reduce a azul de molibdeno y cuya absorbancia se lee a 660 nm.

### **Reactivos**

Solución 1: Solución amortiguadora de pH=4: Pesar 34g de acetato de sodio trihidratado, disolver en agua y mezclar con 57mL de ácido acético glacial, aforar a 1L con agua destilada

Solución 2: Ácido ascórbico: preparar al 1% en solución de ácido oxálico al 0.5% recién preparado

Solución 3: Molibdato de amonio sulfúrico: Preparar diluyendo 75mL de ácido sulfúrico con 200mL de agua destilada, que son agregados a una disolución que contiene 25g de molibdato de amonio disueltos en 300mL de agua destilada.

### **Procedimiento**

1. Pesar 1g de muestra previamente homogeneizada
2. Precalcinar y luego calcinar a 550°C por 8 horas hasta cenizas blancas
3. Tratar las cenizas en el crisol a temperatura ambiente con 5mL de agua y 5mL de ácido clorhídrico. Cubrir con vidrio de reloj y hervir cuidadosamente 5 min en placa calefactora, evitando que se seque. Transferir cuantitativamente a matraz aforado de 100mL con agua destilada y aforar
4. Medir 5mL de la solución muestra, agregar 10mL de la solución 1, luego 1mL de la solución 2 y finalmente 5mL de la solución 3. Mezclar después de cada adición y aforar a 100mL con agua
5. Leer la absorbancia a 660nm durante 30 minutos exactos desde que se adiciona la solución 3
6. Realizar una curva patrón de fósforo con fosfato monobásico de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , de 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
7. Interpolar las absorbancias obtenidas con los valores de la curva patrón.

## **A.1.8. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO (DOF, 2011)**

### **Fundamento**

La ortofenantrolina reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$ , originando un complejo de color rojo característico (ferroína) que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible de alrededor de 505nm. El  $\text{Fe}^{3+}$  no presenta absorción a esa longitud de onda y debe ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante un agente reductor apropiado, como la hidroxilamina o el ácido ascórbico para su determinación.

### **Procedimiento**

1. Incinerar 5 g de producto en una cápsula o crisol a  $600^{\circ}\text{C}$  en una mufla por 1 hora a 2 horas. Disolver las cenizas con 2mL de ácido clorhídrico concentrado. Añadir 10 mL de agua y colocar la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Transferir la solución a un matraz aforado a 50mL y aforar con agua. Mezclar cuidadosamente
2. Reducción de iones férricos a iones ferrosos. Valorar 25mL de la solución de la muestra con acetato de sodio 2 M para llevar el pH a 1.5. Añadir 1mL de la solución de ácido ascórbico y 1mL de solución de 1,10-fenantrolina. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos.
3. Desarrollo del color. Valorar la solución de la muestra con acetato de sodio 0.2 M para llevar el pH a 3.5. Transferir la muestra a un matraz aforado de 50mL aforar y mezclar. Dejar reposar la muestra por 20 minutos. Leer la absorbancia a 490nm en celdas de 1 cm de ancho junto con un blanco de reactivos.
4. Calcular el contenido de hierro en la muestra, interpolando las absorbancias con los valores obtenidos en la curva patrón.

### **Elaboración de la curva patrón:**

De la disolución estándar de hierro (bisulfato de amonio férrico  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  diluida, tomar alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10mL (correspondientes a 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 $\mu\text{g}$  de hierro, respectivamente), transferirlas a matraces aforados de 50mL; agregar a cada matraz 20mL de agua y 1mL de solución 1.0N de ácido clorhídrico. Valorar con solución de acetato de sodio 2M, para llevar el pH a 1.5. Añadir 1mL de la solución de ácido ascórbico y 1mL de solución de 1,10-fenantrolina. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos. Luego

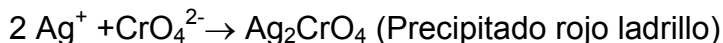
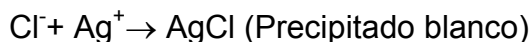


valorar con la solución de acetato de sodio 0.2M para llevar el pH a 3.5; aforar y mezclar. Dejar las soluciones en reposo por 20 minutos. Colocar las soluciones en celdas de 1cm de ancho y medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 490nm. Registrar los resultados en un gráfico y emplearlo para determinar la cantidad de hierro en las muestras.

### A.1.9. CUANTIFICACIÓN DE CLORUROS (MÉTODO DE MOHR) (Nielsen, 2003)

#### Fundamento

El método se basa en la formación de un precipitado color rojo ladrillo proveniente del cromato de plata formado a partir del precipitado de cloruro de plata, una vez que todo el Cl<sup>-</sup> haya reaccionado con el nitrato de plata, como se muestra en las siguientes reacciones:



La solución debe tener un pH neutro o cercano a la neutralidad. Un pH de 8.3 es adecuado para la determinación.

#### Procedimiento

Obtener por calcinación a 500-550°C las cenizas. Transferir cuantitativamente las cenizas a un matraz Erlenmeyer de 250mL y agregar 100mL de agua destilada. Lavar las cenizas que queden adheridas en el crisol con un mínimo de agua y transferirlas al matraz Erlenmeyer. Agregar 1mL de solución de cromato de potasio al 5% y titular con solución 0.1M de nitrato de plata hasta que aparezca un color naranja.

#### Cálculos

$$\%NaCl = \frac{V \times \frac{N}{1000} \times 58.5}{m} \times 100$$

**Donde:**

V: mL de AgNO<sub>3</sub> empleados en la titulación

N: Normalidad de la solución de AgNO<sub>3</sub>

m: Masa de la muestra

## ANEXO 2

### ACERVO FOTOGRÁFICO



Figura A.2.1. Muestra de jaiba fresca



Figura A.2.2. Eviscerado de la jaiba



Figura A.2.3. Acomodamiento de los restos de jaiba



Figura A.2.4. Molienda de los restos de jaiba secos



Figura A.2.5. Tamizado de las harinas de jaiba malla 40 y 80 ( $420\mu\text{m}$  y  $177\mu\text{m}$  respectivamente)



Figura A.2.6. Harina tamizada de jaiba



Figura A.2.7. Desmineralizado de las harinas con EDTA dibásico de sodio



Figura A.2.8. Filtrado de la harina desmineralizada empleando tela de poro pequeño y que no suelta pelusa



Figura A.2.9. Secado de harinas desmineralizadas



Figura A.2.10. Comparación de harinas de jaiiba



Figura A.2.11. Calcinado de las harinas para determinación de cenizas



Figura A.2.12. Determinación de calcio mediante titulación con EDTA

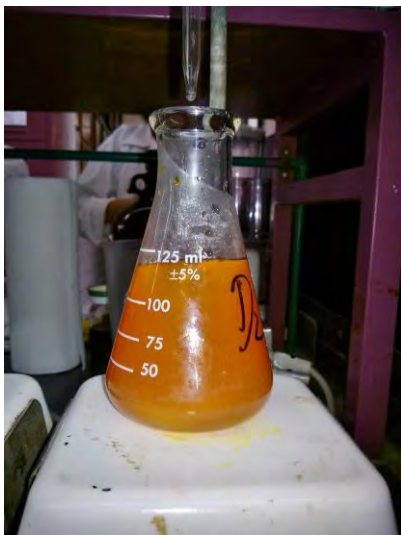


Figura A.2.13. Determinación de cloruros por el método de Mohr



Figura A.2.14. Determinación de proteína por el método de Kjeldahl



Figura A.2.15. Cuantificación de grasa mediante el método de Soxhlet



Figura A.2.16. Determinación de fibra dietética total mediante el método gravimétrico enzimático



Figura A.2.17. Elaboración de solución patrón de astaxantina para la curva estándar



Figura A.2.18. Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) mediante calentamiento a 80°C



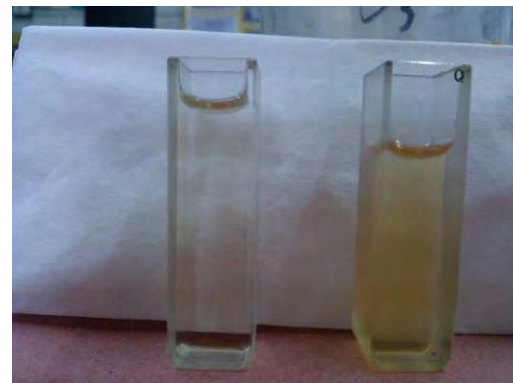
**Figura A.2.19. Extracción de los pigmentos mediante agitación/24 horas**



**Figura A.2.20. Extracción de los pigmentos mediante sonicación**



**Figura A.2.21. Centrifugado de las muestras**



**Figura A.2.22. Cuantificación de los pigmentos carotenoides**

## ANEXO 3

### CURVA PATRÓN DE FÓSFORO

Curva de calibración utilizada en el cálculo de la concentración de fósforo total en las muestras de harinas de jaiba.

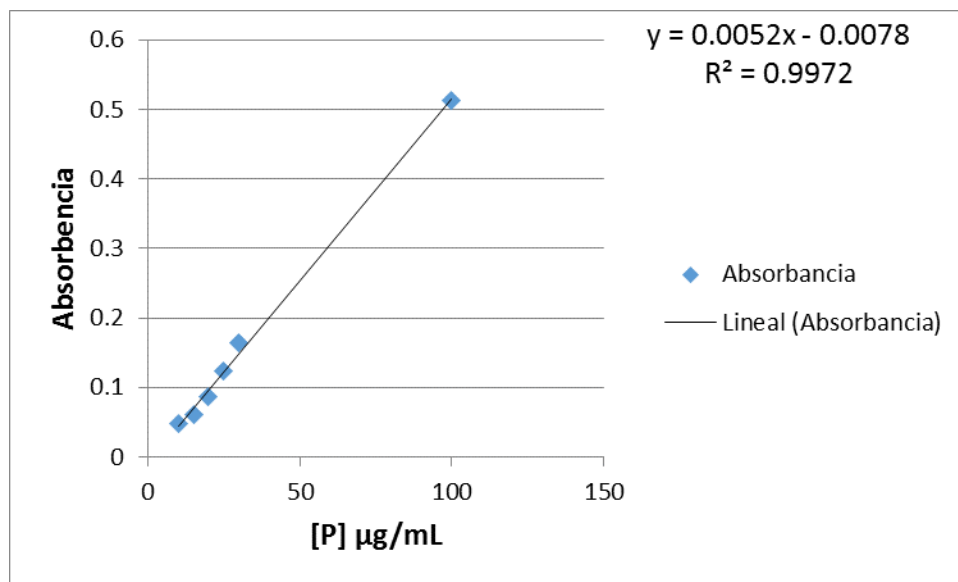


Figura A3 Curva patrón de fósforo total a 660nm

## ANEXO 4

### CURVA PATRÓN DE HIERRO

Curva de calibración utilizada en el cálculo de la concentración de hierro en las muestras de harina de jaiba.

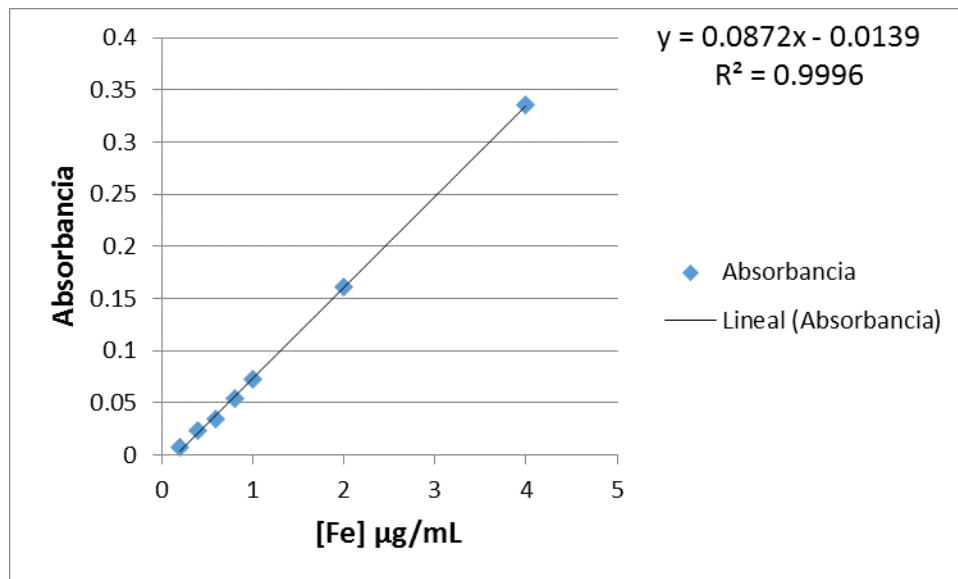


Figura A4. Curva patrón de hierro



## ANEXO 5

### CURVA PATRÓN DE ASTAXANTINA

Curva de calibración utilizada en el cálculo de la concentración de astaxantina en las muestras de harinas de jaiba utilizando aceite de soya.

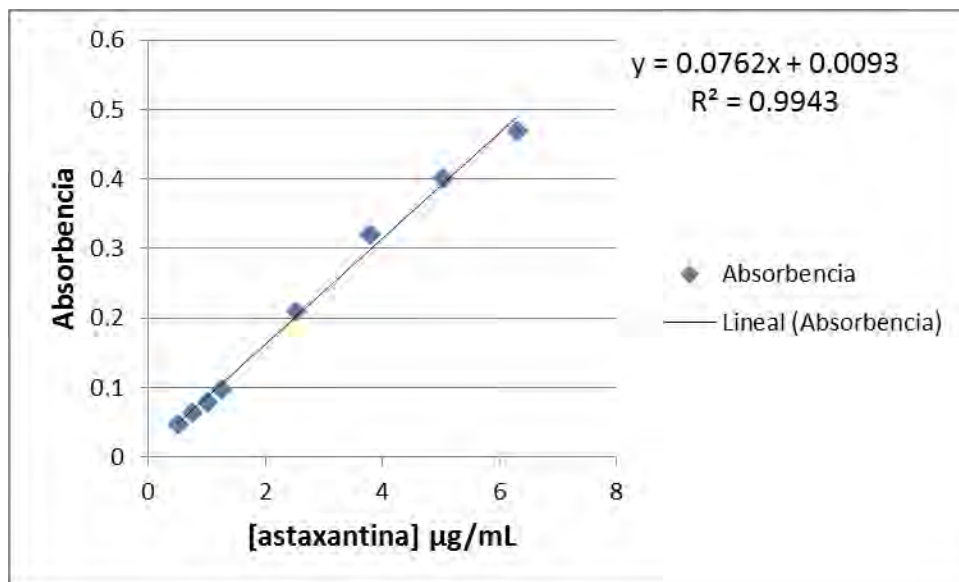


Figura A5. Curva patrón de astaxantina

## ANEXO 6

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS BROMATOLÓGICOS

**Tabla A 6.1. ANDEVA para % cenizas por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2990.08	2	1495.04	7250.05	0.0000
Intra grupos	1.24	6	0.27		
Total (Corr.)	2991.32	8			

**Tabla A 6.2. Pruebas de múltiple rangos para % cenizas por tipo de harina**

<i>Tipo de Harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Desmineralización con EDTA	3	1.4	X
Desmineralizada con ácido acético	3	36.68	X
Entera	3	42.74	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.3. ANDEVA para humedad por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.777689	2	0.39	1.78	0.2465
Intra grupos	1.30747	6	0.22		
Total (Corr.)	2.08516	8			

**Tabla A 6.4. ANDEVA para % proteína por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	447.077	2	223.54	20.52	0.0021
Intra grupos	65.3645	6	10.89		
Total (Corr.)	512.442	8			

**Tabla A 6.5. Pruebas de múltiple rangos para % proteína por tipo de harina**

<i>Tipo de harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina desmineralizada con EDTA	3	7.1	X
Harina entera	3	21.05	X
Harina desmineralizada con ácido	3	22.8833	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.6. ANDEVA para % grasa por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	31.6068	2	15.8034	19.11	0.0025
Intra grupos	4.96078	6	0.826796		
Total (Corr.)	36.5676	8			

**Tabla A 6.7. Pruebas de múltiple rangos para % grasa por tipo de harina**

<i>Tipo de Harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina desmineralizada con EDTA	3	0.384667	X
Harina desmineralizada con ácido	3	3.62667	X
Harina entera	3	4.82	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.8. ANDEVA para % fibra por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5934.83	2	2967.41	4662.89	0.0000
Intra grupos	3.81833	6	0.636389		
Total (Corr.)	5938.65	8			

**Tabla A 6.9. Pruebas de múltiple rangos para % fibra por tipo de harina**

<i>Tipo de harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina entera	3	22.1667	X
Harina desmineralizada con ácido	3	36.7	X
Harina desmineralizada con EDTA	3	82.4333	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.10. ANDEVA para % carbohidratos por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.751072	2	0.375536	2.24	0.1880
Intra grupos	1.00712	6	0.167853		
Total (Corr.)	1.75819	8			

**Tabla A 6.11. ANDEVA para % calcio por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1248.82	2	624.41	1488.33	0.0000
Intra grupos	2.51722	6	0.419537		
Total (Corr.)	1251.34	8			

**Tabla A 6.12 Pruebas de múltiple rangos para % calcio por tipo de harina**

<i>Tipo de harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina desmineralizada con EDTA	3	0.1506	X
Harina desmineralizada con ácido	3	22.5	X
Harina entera	3	27.13	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.13. ANDEVA para % fósforo por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado MEDIO</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.21678	2	1.10839	120.04	0.0000
Intra grupos	0.0554032	6	0.00923387		
Total (Corr.)	2.27218	8			

**Tabla A 6.14. Pruebas de múltiple rangos para % fósforo por tipo de harina**

<i>Tipo de harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina desmineralizada con EDTA	3	0.0627533	X
Harina desmineralizada con ácido	3	0.971	X
Harina entera	3	1.21667	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A 6.15. ADEVA para contenido de Fe por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	99145.7	2	49572.9	79.67	0.0000
Intra grupos	3733.35	6	622.225		
Total (Corr.)	102879.	8			

**Tabla A 6.16. Pruebas de múltiple rangos para contenido de Fe por tipo de harina**

<i>Tipo de harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Harina entera	3	95.26	X
Harina desmineralizada con EDTA	3	167.937	X
Harina desmineralizada con ácido	3	345.167	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

**Tabla A. 6.17. ANDEVA para % NaCl por tipo de harina**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	19.999	2	9.99949	306.51	0.0000
Intra grupos	0.19574	6	0.0326233		
Total (Corr.)	20.1947	8			

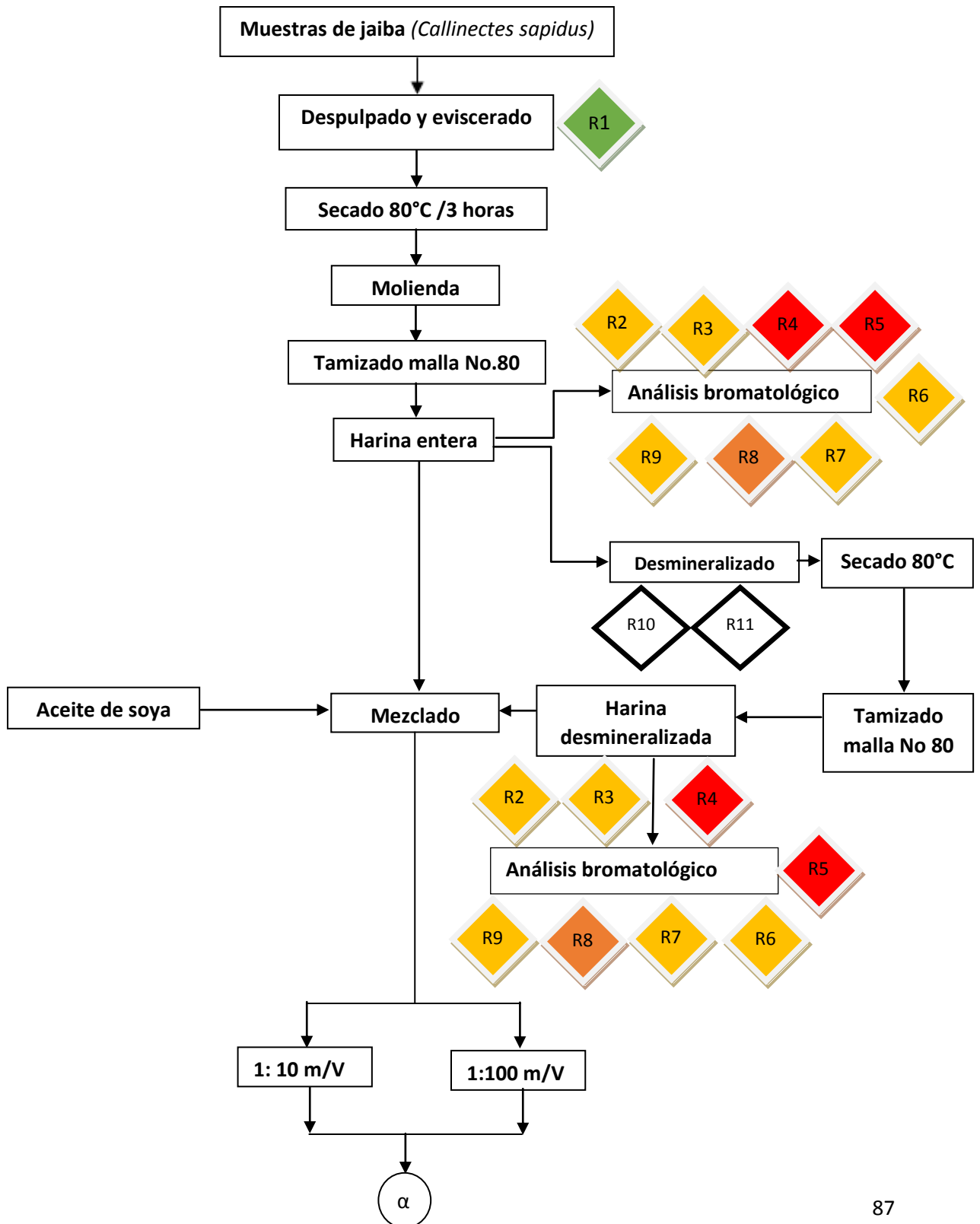
**Tabla A. 6.18. Pruebas de múltiple rangos para % NaCl por tipo de harina**

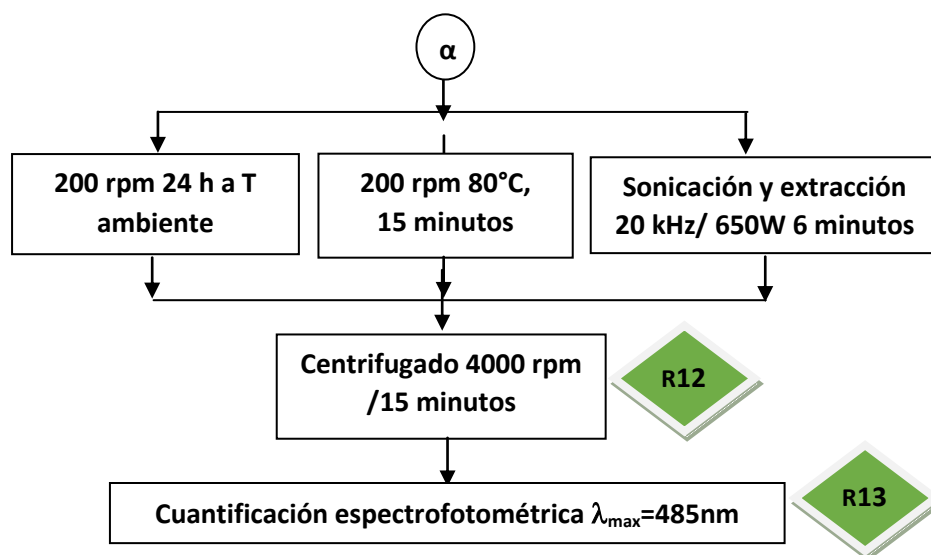
<i>Tipo de Harina</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
H desmineralizada con EDTA	3	0.137367	X
Harina entera	3	0.44	X
Harina desmineralizada con ácido	3	3.44	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

# ANEXO 7

## DIAGRAMA ECOLÓGICO





**R1, R12 y R13:** Residuos orgánicos no peligrosos. Se envían a disposición para producir composta o se desechan de forma adecuada en la basura orgánica.

**R2:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, muestra de jaiba. Se almacena en un recipiente adecuado se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R3:** H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, HCl, rojo de metilo, azul de metileno y muestras de jaiba. Se almacena en un recipiente adecuado , se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R4:** Éter de petróleo, grasa. Se recupera el éter de petróleo a través de un rotoevaporador.

**R5:** Solución amortiguadora de fosfatos, NaOH, HCl, etanol, acetona. Se almacena en un recipiente adecuado, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R6:** NaOH, trietanolamina, murexida y restos de jaiba. Se almacena en un recipiente adecuado , se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R7:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, ácido oxálico, ácido ascórbico, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>COOH. Se almacena en un recipiente adecuado, se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R8:** Ácido ascórbico, 1,10-fenantrolina y NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O. Se almacena en un recipiente adecuado , se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R9:** Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> y muestra de jaiba. Se almacena en un recipiente adecuado , se etiqueta con todos los datos requeridos y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

**R10 y R11:** EDTA, NaOH y residuos orgánicos, ácido acético y residuos. Se neutraliza la disolución y se desecha en la tarja con otros residuos no peligrosos.

## Bibliografía

Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, K., Matsushita, K., Komiyama, H., Tsunekawa, H., Nagao, H. (2001). Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *Journal of Applied Poultry Research*, 10:154-161.

Armenta, R., Guerrero, I., Huerta, S. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*, 67(2):1002-1006.

Badu, S. (2006). Química de los alimentos. Pearson Addison Wesley, Cuarta Edición, México , pp. 401-440.

Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F., Vega, J. (2001). Preparation of crayfish chitin by *in situ* lactic acid production. *Process Biochemistry*, 37:229-234.

Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Food Chemistry, Springer, Fourth edition, Berln, Alemania, pp. 425-435.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9:1551-1558.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfinder, P. (1999). En Carotenoids. Biosynthesis and metabolism. Editorial Birkhauser. Basel, Suiza, pp. 132-147

Cabello, A. M., Martínez, Z., Villegas, L. V., Figuera, B.E., Marcano, L. A., Gómez, A., Vallenilla, O. (2005). Fauna acompañante del camarón como materia prima para la elaboración de productos pesqueros. *Zootecnia tropical*. 23(3):217-230.

Calvo-Carrillo, M. C., Castro-González, Sánchez-González, M.I., Sánchezarmas-Luna, R., Pérez-Gil-Romo, F. (1995). Fibra cruda y quitina en el crustáceo langostilla (*Pleuroncodes planipes* Stimpson): Similitudes y diferencias. *Ciencias marinas*, 24(2):176-186.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A. (1999). Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of b-carotene and xanthophylls validation of the analytical method. *Journal of Chromatography*, A(854):233-244.

Carpenter, K.L.H., Van Der Veen, C., Hird, R., Dennis, I.F., Ding, T., Mitchinson, M.J. (1997). The carotenoids  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophage mediated LDL oxidation. *FEBS Letters*, 401(2-3):262-266.

Chen, H.M., Meyers, S.P. (1982). Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, 47:892-900.

Chew, B.P., Park, J.S., Wong, M.W., Wong, T.S. (1999). A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Research*, 19(3A):1849-1853.

Choi, Y.E., Yun, Y.S., Park, J. M. (2002). Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnology Progress*, 18:1170-1175.

CONAPESCA. (2011). Anuario estadístico de acuacultura y pesca. SAGARPA. México D.F. México.

CONAPESCA.(2012).[http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta\\_especifica\\_por\\_produccion](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion)



Coral, G., Huberman, A., De-la-Lanza, G., Monroy-Ruiz, J. (1998). Muscle pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on oil extracted pigment from langostilla (*Pleuroncodes planipes*) compared with two comercial sources of astaxanthin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 7:31-45.

Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. (1999). Effect of astaxanthin on growth and survival of *Penaeus monodon* larvae. In: Proceedings of the 37th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Tailandia, pp. 36-41.

Deán, J. C., Nielsen, L.A., Helfrich, L.A., Garling D.L. (1992). Replacing fishmeal with seafood processing wastes in channes catfish diets. *Progressive Fish-Culturist*, 54(1):7-13.

De-Dios, C. (2002). Extracción de pigmentos de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) fermentados y no fermentados. Tesis de maestría en biotecnología. UAM, Unidad Iztapalapa, México D.F., México.

DOF. (1978). Determinación de cenizas en alimentos. NMX-F-066-1978. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México D.F., México.

DOF. (1980). Alimentos. Determinación de proteínas. NMX-F-068-1980. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México D.F. México.

DOF. (1986). Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. NMX-F-083-1986. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México D.F. México.

DOF. (2009). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Secretaría de Economía. Jueves 24 de septiembre de 2009 DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México D.F., México.

DOF. (2011). Industria azucarera y alcoholera. Determinación de fierro en muestras de azúcares NMX-F-503-SCFI-2011. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México D.F., México.

DOF. (2012). Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias, [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5259470&fecha=16/07/2012](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5259470&fecha=16/07/2012) consultado el 4 de diciembre del 2013.

Duarte-de-Holanda, H., Netto, F. M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 71(5):298-303.

Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M. (2000). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:530-535.

FAO. (2013), <http://www.fao.org/fishery/species/2632/en> consultado el 2 de Diciembre del 2013.

Félix-Valenzuela, L., Higuera-Ciapara, I., Goycoolea-Valencia, F. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> /etanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste. *Journal of Food Process Engineering*, 24:101-112.

Flores, R.A. (2008). Obtención y caracterización de esponjas de quitina a partir de cefalotórax de camarón. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química. México, D.F. México.

Francis, F.J. (1999). Colorants. Eagan Press Handbook Series. American Association of Color Chemist. St. Paul, EEUU, pp. 102-103.

Gary, C. D., (2009), *Química Analítica*. McGraw-Hill.México D.F.,México, pp 294-308.

Garzón S.M.L., Romero, M.A., James, M.G. (1993). Quitina y quitosana para uso farmacéutico.*Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 24(4):75.

Gates, K.W., Parker, A. H. (1992). Characterization of minced meat extracted from blue crab picking plant by-products. *Journal of Food Science*, 57(2):267-292.

Gilchrist, B.M., Lee, W. L. (1972). Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga*. *Compendium of Biochemical Physiology*, 42B:263-294.

Gildberg, A., Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36:809-812.

Golstein, J.L., Brown, M.S. (1977). Low DL pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46:897-930.

Gouveina, L., Nobre, B.P., Marcelo, F. M., Mrejen, S., Cardoso, M. T., Palabra, A. F., Mendes, R.L. (2007). Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, 101:717-723.

Guerin, M., Hosokawa, H. (2001). Pigmentation of red seabream with natural astaxanthin derived from the alga *Haematococcus pluvialis* comparison with synthetic astaxanthin. *Conference Aquaculture 2001*. Book of Abstracts. Lake Buena Vista, EEUU, p. 263.

Guillou, A., Choubert, G., De la Noue, J. (1993). Separation and determination of carotenoids, retinol, retinal and their dehydro forms by isocratic reversedphase HPLC. *Food Chemistry*, 476:93-99.

Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 55:207-214.

Hata, N., Ogbonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, 13:395-402.

Herrera-Andrade, M.H., Sánchez-Manchado, D.I., López-Cervantes, J., Nuñez-Gastelum, J.A., Moreno-Ramos, O.H. (2011). Extracción de la astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 7(1):21-27.

Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:185-196.

Horst, M. N. (1990). Concurrent protein synthesis is required for *in vivo* chitin synthesis in postmolt blue crabs. *The Journal of Experimental Zoology*, 256:242-254.

Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H, Matsumoto, A, Miki, W. (2000). Inhibition of low-densitylipoprotein oxidation by astaxanthin. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*,7:216–222.

Jencks, W.P., Buten B. (1964). The denaturation of crustayanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 107:511-520.

Jiménez, M. S. (2003). Comparación de dos métodos de extracción sólido-líquido para la obtención de pigmentos carotenoides a partir de cefalotórax de camarón. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.

Jiménez-Pichardo, R. (2009). Extracción y estabilización de astaxantina extraída a partir de residuos ensilados de camarón. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México

Jyonouchi, H., Sun, S., Gross, M. (1996). Effect of carotenoids on *in vitro* immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances *in vitro* immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. *Nutrition and cancer*, 23:171-183.

Jyonouchi, H., Zhang, L., Gross, M., Tomita, Y. (1994). Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. *Nutrition and Cancer*, 21:47-58.

Kakizono, T., Kobayashi, M., Nagai, S. (1992). Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74:403-405.

Kang, J.O., Kim, S.J., Kim, H. (2001). Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl<sub>4</sub> treated rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 23:79-84.

Kidd, P. (2011). Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review*, 16(4):355-364.

Kirk, R. S., Sawyer, H., Egan H. (2009). Composición y análisis de los alimentos. Grupo Editorial Patria, 2a edición, México, pp. 755-760.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S. (1992). Effects of light intensity, light quality and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74:61-63.

Krantz, G.E. (1983). Report of the acting administrator. Fisheries Administration, Maryland. Department of Natural Resources. Annapolis, Maryland, EEUU.

Lalov, G.I., Guerginov, I.I., Krysteva, M.A. y Fartsov, K. (2000). Treatment of waste water from distilleries with chitosan. *Water Research*, 34(5):1503-1506.

Lee, J.E., Peniston, Q. (1982). Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production., In: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, Martin, R., Flick, G., Hebard, C. Eds. Avi Wesport, CT, EEUU. p. 415

Lignell, A., Bottiger, P. (2001). Use of xanthophylls, astaxanthin e.g. for treatment of autoimmune diseases, chronic viral and intracellular bacterial infections. Patent WO01/24787 A1. Washington, D.C, EEUU

Lim, C., Sessa, D.J. (1995). Nutrition and utilization en Aquaculture. Capítulo 21. Further utilization of seafood discards. Editorial AOCS. Champaigne, Illinois, EEUU, p. 105

Luna, A. (2003). Extracción con lípidos de los pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su evaluación como ingrediente de dietas en larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.

Manual Sigma. (2002). Total dietary fiber assay kit. Product Information. Product codes TDF-100A y TDF-C10. CMH/MAM 4/02. Saint Louis, Missouri, EE.UU.

Mayer, J., Wiley, B., Henderson, K., Kaplan, D. (1989). Physical properties of film produced from the biopolymer pullulan and chitosan produced by *Aureobasidium pullulans* and *Mucor rouzzii*: Oxygen permeability, tensile strength, etc. *Annual Meeting of the American Society for Microbiology*: Washington, D.C. EEUU.

Meglitsch, P.A. (1985). Invertebrate zoology. Oxford University Press. Tercera Edición. Nueva York, NY, EEUU, p. 454.

Meyers, P.S., Bligh, D. (1981). Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 79:505-508.

Meyers, S.P., Chen, H. M. (1985). Process for the utilization of shellfish waste. Patent US 4505936. Washington, D.C., EE.UU.

Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Applied Chemistry*, 63:141-146. Tokio, Japon.

Miki, W., Hosoda, K., Kondo, K., Itakura, H. (1998). Astaxanthin containing drink. Patent abstract JP10155459.

Millikan, M. R., Williams, A.B. (1984). Synopsis of biological data on the blue crab. *Callinectes sapidus* Rathbun. FAO Fisheries Synopsis No. 138, NOAA Technical Report 51:1-38.

Montiel, Y. (2012). Elaboración de un suplemento mineral para búfalas lecheras a partir de los residuos provenientes de la industria procesadora de cangrejo. Tesis profesional. Universidad Rafael Urdaneta, Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Venezuela.

Morillo, N. (2006). Manual de procesamiento industrial del cangrejo. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 1a edición, Maracaibo, Venezuela, Pp. 50-82.

Morillo, N., Montiel, N., Belandria, J., Mújica, F. (2006). Caracterización de los desechos del procesamiento de los crustáceos (cangrejo y camarón) en el estado de Zulia. *Veterinaria tropical*, 31(1-2):71-83.

Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutiérrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L. y Mínguez-Mosquera, M.I. (1993). A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*, 114(2):223-229.

Muzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Pergamon Press. Nueva York, NY, EEUU, pp. 23-31.

Nielsen, S. (2003). Análisis de los alimentos. Editorial Acribia. Tercera edición, Zaragoza, España, pp. 97-223.

No, H., Meyers, S., Lee, K. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37:575-579.



Omara-Alwala, T.R., Chen, H.M., Ito, Y., Simpson, K.L., Meyers, S.P. 1985. Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2):260-263.

Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C., Abalde, J. (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters*, 23:1079-1085

Otwell, W. S., Koburger, J. A. (1985). Microbial and nutritional attributes of soft crabs. Technical Paper No. 5. Project No. SGEF-8. Department of Food Science and Human Nutrition. Universidad de Florida. Gainesville, Florida, EEUU, pp. 1-20.

Ramírez, M. (2003). Empleo de una enzima quinolítica de *Serratia marscesens* para la obtención de carotenoproteínas a partir de cefalotórax del camarón. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.

Raz-Guzmán, A., Sánchez, A., Soto L., (1992). Catálogo ilustrado de Cangrejos Braquiurosny Hombros (Crustácea) de la Laguna de Alvarado, Veracruz, México, México D.F. Instituto de Biología, UNAM. Cuaderno 14, 51 págs.

Rodríguez-Amaya, D.B. (1999). A guide to carotenoid analysis in foods. OMNI Research , Washington, DC, EEUU, pp. 51-53.

Shahidi, F., Brown, J. (1998). Carotenoids pigments in seafood and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science*. 38(1):1-67

Shahidi, F., Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 39:1527-1532.

Simpson, K. L. (1978). The recovery of protein, and pigments from shrimp and crab meals and their use in salmonid pigmentation. *Proceeding of the First International Conference on Chitin and Chitosan*. R.A.A. Muzzarelli, E.R. Poniaux, Eds. Brest, Francia, pp. 253-262.

Storebakken, T., No, H.K. (1992). Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 100:209-229.

Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A., Mori., H. (1994). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, 15:15-19.

Tenorio, E., (2013). Obtención, aplicación y evaluación de la vida de anaquel en un alimento adicionado con pigmentos caroteoides (astaxantina) obtenidos del cefalotórax del camarón. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.

Torres-Aguirre, L. (2007). Extracción de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón con aceites comestibles. Trabajo escrito vía Cursos de Educación Continua para obtener el título de Química de Alimentos. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.

Torrissen, O., Tideman, E., Hansen, F., Raa, J. (1981). Ensiling in 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.

Velázquez, G., Ramírez, J. (2008). Aprovechamiento de la jaiba azul (*Callinectes sapidus*) en la Laguna Madre de Tamaulipas, Plaza y Valdés Editores, 1a edición, México, p. 6.

Wang, X., Willen, R., Wadstrom, T. (2000). Astaxanthin rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44:2452-457.

Weiner, M.L. (1991). An overview of the regulatory status and the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. En *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science. Princeton, EEUU, pp. 663-672.

Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 88B(26):406-413.

Ying, L., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concep using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonic Sonochemistry*, 20:12-18.

Yuan, J., Chen, F. (1999). Hydrolysis kinetic of astaxanthin and stability of astaxanthin of *Hadmatococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:31-35.

Zakaria, Z., Hall, G.M., Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 3(1):1-6.

Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound of the stability of (all-E)-Astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21):8346-8351.

Zollinger, H. (1991). Color chemistry. Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. Editorial VCH. Munich, Alemania, pp. 52-56.