



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES (ASTAXANTINAS) A PARTIR
DE EXOESQUELETOS DE JAIBAS (*Callinectes sapidus*) BAJO
DIFERENTES CONDICIONES DE ACIDEZ EMPLEANDO
TECNOLOGÍAS MÁS LIMPIAS”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JESÚS SALVADOR VÁZQUEZ MARCIAL



MÉXICO, D.F.

2015



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: IQ Miguel Ángel Hidalgo Torres
VOCAL: M. en C. Lucía Cornejo Barrera
SECRETARIO: M. en C. Rolando Salvador García Gómez
1er SUPLENTE Dra. Iliana Elvira González Hernández
2do SUPLENTE Dra. María del Carmen Durán Domínguez

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

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Duran Domínguez

SUSTENTANTE:

Jesús Salvador Vázquez Marcial

ÍNDICE

		Página
	Listado de Tablas	v
	Listado de Figuras	vi
	Glosario	x
	Resumen	1
CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	Problemática	2
1.2	Hipótesis	4
1.3	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo general	4
1.3.2	Objetivos particulares	4
1.4	Alcances de la investigación	4
CAPÍTULO 2	FUNDAMENTOS	6
2.1	Cangrejo azul o jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)	6
2.1.1	Características morfológicas del cangrejo azul ó jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)	6
2.1.2	Comparación con otros crustáceos	8
2.2	Panorama mundial de la industria de la jaiba en la actualidad	11
2.2.1	Producción de jaiba en México	12
2.3	Procesamiento de la jaiba en altamar y/o en tiraderos municipales	16
2.4	Clasificación de los pigmentos carotenoides (astaxantina)	17
2.4.1	Propiedades de los carotenoides	17
2.4.2	Características de la astaxantina	18
2.4.3	Deterioro del pigmento carotenoide (astaxantina)	20
2.4.4	Actividad biológica de la astaxantina	21
2.5	Extracción de pigmentos carotenoides mediante diversas tecnologías	21
	a) Por medio de fluidos supercríticos	22
	b) Por medio de métodos enzimáticos	22
	c) Empleando microorganismos	23
	d) Empleando la extracción asistida por microondas (EAM) y por ultrasonido	23
2.6	Extracción de los pigmentos carotenoides empleando aceites vegetales comestibles	25
2.7	Tipos de desmineralización empleando ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos	26
CAPÍTULO 3	METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
3.1	Diseño experimental	29
3.2	Preparación de la muestra	30
3.2.1	Materia prima utilizada	30
3.2.2	Proceso de despulpado, eviscerado y lavado	31
3.2.3	Secado de los cefalotórax y de las quelas	31

		Página
3.2.4	Proceso de molienda y tamizado de los cefalotórax y quelas	31
3.2.5	Desmineralización de la harina entera	32
3.3	Análisis bromatológico de las harinas enteras y desmineralizadas	32
3.4	Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando aceite de soya	32
3.5	Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)	33
3.6	Análisis estadístico de los datos experimentales	33
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Proceso de secado de los cefalotórax de jaiba y de las quelas	34
4.2	Molienda de los residuos utilizados y tamizado de las harinas	34
4.3	Desmineralización de las harinas de jaiba y evaluación del % de cenizas	35
4.4	Contenido del % de grasa en las harinas enteras (sin tratamiento) y de las harinas desmineralizadas	39
4.5	Elección del proceso a seguir de desmineralización	42
4.6	Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina)	43
4.7	Análisis bromatológico	47
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1	Conclusiones	50
5.2	Recomendaciones	52
ANEXOS		53
ANEXO 1	Descripción detallada de los análisis bromatológicos	53
A.1.1	Determinación del contenido de cenizas empleando el método de la estufa (DOF, 1978)	53
A.1.2	Método de Goldfish (Nielsen, 2003)	54
A.1.3	Determinación de humedad por secado en estufa (DOF, 1986)	56
A.1.4	Determinación del porcentaje de proteína (DOF, 1980)	57
A.1.5	Determinación de fibra dietética total (Manual Sigma, 2002)	59
ANEXO 2	Acervo fotográfico	62
ANEXO 3	Diagrama ecológico	65
	BIBLIOGRAFÍA	67

Listado de Tablas

		Página
Tabla 1	Comparación bromatológica entre las especies camarón y cangrejo (Shahidi y Botta, 1994)	9
Tabla 2	Quitina, pigmentos carotenoides y proteína contenida en cefalotórax de camarón y en diferentes partes del cangrejo de nieve (Shahidi y Synowiecki, 1991)	9
Tabla 3	Contenido de carotenoides de diversas fuentes de bío-residuos de crustáceos (Mendoza-Pérez, 2014)	10
Tabla 4	Composición bromatológica del cangrejo azul en porcentaje en masa (<i>Callinectes sapidus</i>) (Otwell y Koburger, 1985)	10
Tabla 5	Contenido de carotenoides en el alga <i>Haematococcus pluvialis</i> (Choubert y Heinrich, 1993)	23
Tabla 6	Valores obtenidos de los carotenoides extraídos de los residuos del camarón empleando diferentes aceites comestibles (Sachindra y Mahendrakar, 2005)	26
Tabla 7	Composición química de residuos desmineralizados de jaiba (Félix-Valenzuela <i>et al.</i> , 2001)	27
Tabla 8	Diseño experimental propuesto para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina)	30
Tabla 9	Diseño experimental propuesto para el análisis de los componentes de las harinas de jaiba	30
Tabla 10	Resultado del % de cenizas tras la desmineralización empleando HCl y HCOOCH ₃	36
Tabla 11	Análisis de varianza para el % de cenizas obtenidas a las diferentes relaciones de HCl manejadas como factor desmineralizante (GI, grados de libertad)	37
Tabla 12	Análisis de varianza para los % de cenizas obtenidas con HCOOCH ₃ (GI, grados de libertad)	38
Tabla 13	Resultados del % de grasa cruda obtenida tras la desmineralización empleando HCl y HCOOCH ₃	40

		Página
Tabla 14	Análisis de varianza para el % de grasa cruda obtenida con HCl (GI, grados de libertad)	40
Tabla 15	Análisis de varianza para la recuperación de grasa cruda en porcentaje obtenida con HCOOCH ₃ (GI, grados de libertad)	42
Tabla 16	Resultados de la harina entera y de las harinas demineralizadas elegidas para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)	43
Tabla 17	Contenido de pigmentos carotenoides (astaxantina) bajo las diferentes condiciones desmineralizantes manejadas	44
Tabla 18	Análisis de varianza para la astaxantina extraída	46
Tabla 19	Pruebas de múltiple rango para los tipos de harina	46
Tabla 20	Pruebas de múltiple rango para relación de harina:disolvente	47
Tabla 21	Resultados de los análisis bromatológicos	48
Tabla 22	Composición bromatológica de residuos de jaiba (m/m) (Morillo <i>et al.</i> , 2006)	49

Listado de Figuras

Figura 1	Descripción taxonómica de <i>Callinectes sapidus</i> (Millikin y Williams, 1984)	6
Figura 2	Vista dorsal del cangrejo azul o jaiba (<i>Callinectes sapidus</i>)	7
Figura 3a	Diferenciación sexual de la jaiba (a) tórax jaiba macho	8
Figura 3b	Diferenciación sexual de la jaiba (b) tórax hembra madura	8
Figura 3c	Diferenciación sexual de la jaiba (c) tórax hembra inmadura	8
Figura 4a	Estructura química de los carotenoides ,(a) licopeno (Higuera-Ciapara <i>et al.</i> , 2006)	11
Figura 4b	Estructura química de los carotenoides, (b) -caroteno	11
Figura 4c	Estructura química de los carotenoides, (c) zeaxantina	11
Figura 4d	Estructura química de los carotenoides, (d) cantaxantina	11

		Página
Figura 4e	Estructura química de los carotenoides, (e) astaxantina	11
Figura 5	Clasificación territorial de México (INEGI Marco Geoestadístico Nacional, 2010)	12
Figura 6	Aporte porcentual de las principales entidades productoras (CONAPESCA, 2013)	13
Figura 7	Producción promedio en toneladas de masa corporal viva de las principales especies 2007-2013 (CONAPESCA, 2013)	14
Figura 8a	Aporte de los estados, (a) producción pesquera (CONAPESCA, 2013)	15
Figura 8b	Aporte de los estados, (b) producción acuícola	15
Figura 9	Estructura molecular del isopreno	17
Figura 10	Gráfica de la composición de la astaxantina de diversas fuentes (Rao <i>et al.</i> , 2014)	19
Figura 11a	Estereoisómeros de la astaxantina (Higuera-Ciapara <i>et al.</i> , 2006), (a) (3S, 3'S)	20
Figura 11b	Estereoisómeros de la astaxantina, (b) (3R, 3'S)	20
Figura 11c	Estereoisómeros de la astaxantina, (c) (3R, 3'R)	20
Figura 12a	Cambios en la concentración de E-astaxantina, (a) tratamiento con microondas (Zhao <i>et al.</i> , 2006)	24
Figura 12b	Cambios en la concentración de E-astaxantina, (b) tratamiento con ultrasonido	24
Figura 13	Diagrama de flujo de la metodología empleada en la investigación	28
Figura 14a	Tratamiento térmico, (a) jaiba sin tratamiento	34
Figura 14b	Tratamiento térmico, (b) quelas después del tratamiento térmico	34
Figura 14c	Tratamiento térmico, (c) cefalotórax después del tratamiento térmico	34
Figura 15	Porcentaje de cenizas <i>versus</i> relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCl	36
Figura 16	Diagrama de Pareto estandarizado para el % de cenizas de HCl	37

	Página	
Figura 17	Gráfica del % de cenizas <i>versus</i> relación de harina:disolución para las concentraciones manejadas de HCOOCH ₃	38
Figura 18	Diagrama de Pareto estandarizado de % de cenizas obtenidas con HCOOCH ₃	39
Figura 19	Valores de los porcentajes de grasa cruda <i>versus</i> la relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCl	39
Figura 20	Diagrama de Pareto estandarizado para el % de grasa cruda de las diferentes concentraciones de HCl	41
Figura 21	Porcentaje de grasa <i>versus</i> la relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCOOCH ₃	41
Figura 22	Diagrama de Pareto estandarizado para el % de grasa cruda empleado HCOOCH ₃ para su extracción	42
Figura 23	Curva patrón de astaxantina	44
Figura 24	Gráfica referente al contenido de pigmentos carotenoides astaxantina (µg de harina) de las harinas entera y desmineralizadas	45
Figura 25	Gráfica de medias para el tipo de harina	46
Figura 26	Gráfica de medias para las relaciones de harina:disolvente	47
Figura 27	Gráfica de la composición de las harinas analizadas	49
Figura A.2.1	Muestra de quelas frescas	62
Figura A.2.2	Tratamiento térmico de los cefalotórax	62
Figura A.2.3	Tratamiento térmico de las quelas	62
Figura A.2.4	Molienda de los residuos de jaiba y quelas	62
Figura A.2.5	Harina tamizada	62
Figura A.2.6	Desmineralizado con HCl 1N	62
Figura A.2.7	Filtrado de las harina desmineralizadas	63
Figura A.2.8	Secado de las harinas desmineralizadas	63
		63

		Página
Figura A.2.9	Harinas desmineralizadas con HCl 0.5, 1.0 y 1.5 N	63
Figura A.2.10	Harinas desmineralizadas con HCOOCH ₃ 8,10 y 12% (m/v)	63
Figura A.2.11	Calcinación de las harinas	63
Figura A.2.12	Determinación del contenido de proteína por el método de Kjeldhal	63
Figura A.2.13	Determinación del % de grasa por el método de Goldfish	64
Figura A.2.14	Extracción de los pigmentos con aceite de soya	64
Figura A.2.15	Pigmentos carotenoides(astaxantina) extraídos	64
Figura A.2.16	Centrifugado de las muestras	64

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Glosario

BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
EAM	Extracción asistida por microondas
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Endox®	Es un sistema antioxidante completo diseñado para estabilizar los alimentos altos en grasa y proteger las vitaminas liposolubles en premezclas minerales concentradas
Epistoma	La región entre las antenas y la boca en crustáceos
Esternito	En artrópodos, esternito es cada una de las placas transversales en el lado ventral del mesosoma. Se trata de una placa endurecida de cutícula que forma parte del exoesqueleto. Cada uno de los esternitos se encuentra delimitado por suturas, surcos o articulaciones
Etoxiquin™	Antioxidante que actúa retrasando la formación de peróxidos que se generan por efecto de la oxidación de las grasas, y con ello, impide la destrucción oxidativa de los compuestos y grasas de los mismos.
kril	Del ingl. <i>krill</i> , y este del noruego <i>krill</i> , alevín, pez pequeño). 1. m. Conjunto de varias especies de crustáceos marinos, de alto poder nutritivo, que integran el zooplancton
PER	Relación de eficiencia proteínica o proteica, REP, por sus siglas en inglés
Quelas	Órgano en forma de pinza que tienen los apéndices de algunos artrópodos , como los cangrejos
Rotavapor	Anglicismo por la palabra correcta de roto-evaporador (evaporador rotatorio al vacío, <i>rotational vacuum evaporator</i>)
Tagma	Un tagma (plural latinizado <i>tagmata</i>) es una parte o región del cuerpo de un artrópodo que resulta de la fusión o unión embrionaria de dos o más segmentos corporales

RESUMEN

La pulpa de la jaiba (*Callinectes sapidus*) es el subproducto de la jaiba que se comercializa a nivel mundial, siendo considerado el resto de su esqueleto un residuo que contamina cuerpos de agua y tiraderos municipales. En la actualidad se están buscando alternativas tecnológicas para reaprovechar estos residuos. Entre las aplicaciones que se tienen en general de los exoesqueletos de crustáceos es en la elaboración de formulaciones alimenticias para especies acuícolas, así como suplemento alimenticio o como productos nutracéuticos entre otros. Entre las características que poseen estos residuos, son su contenido de proteínas, de quitina y de pigmentos carotenoides (astaxantinas) los cuales son el objeto de este estudio. Por ello, en la presente investigación se emplearon restos de jaibas (*Callinectes sapidus*) para extraer pigmentos carotenoides (astaxantina) utilizando tecnologías amigables con el ambiente. Debido a la poca información con que se cuenta referente a la desmineralización de las harinas sin dañar los pigmentos carotenoides, se realizó un análisis bromatológico de las harinas resultantes entre dos tratamientos desmineralizantes empleando diferentes condiciones de acidez (desmineralización con ácido clorhídrico y con ácido acético) con el objetivo de realizar una extracción con agitación constante a una temperatura de 80°C durante 15 minutos empleando aceite de soya como disolvente. Para ello, se estudiaron 5 relaciones de harina:aceite de soya 1:10: 1:25, 1:50, 1:75 y 1:90. Los resultados obtenidos demostraron que la desmineralización de las harinas de jaiba con un menor porcentaje de cenizas y un mayor contenido graso correspondieron al empleo de HCl 1 N, los cuales arrojaron valores de 1.68 y 0.86%, respectivamente, mientras que para el ácido acético a una concentración del 12% (m/v) se obtuvieron mayores porcentajes de cenizas pero mayores contenidos de grasa de 13.75 y 1.24%, respectivamente. Finalmente, la mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantina) extraídos en la fase oleosa, fue de 72.73 µg/g de harina entera en una proporción de 1:75 (harina: aceite de soya). Al realizar un análisis de varianza ($p < 0.05$), se demostró que existe diferencia significativa para el proceso de extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina) para cada uno de los tipos de harina utilizadas; es decir, harina entera (sin tratamiento) y desmineralizada con HCl y HCOOCH₃ y también para cada una de las relaciones de harina:disolución empleadas. Por medio de un análisis de varianza ($p < 0.05$) se encontró la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de cenizas medidas como porcentaje, para los tratamientos con HCl y HCOOCH₃ entre la concentración de ácido y la relación harina:disolvente. El análisis estadístico realizado con los valores de % de grasa demostraron que no hubieron diferencias estadísticamente significativa para los tratamientos de HCl y HCOOCH₃ entre las concentraciones de ácido adicionadas y la relación harina:disolvente empleadas.

Palabras clave: Extracción de carotenoides (astaxantinas), exoesqueletos de jaibas (*Callinectes sapidus*), ácido clorhídrico, ácido acético, tecnologías más limpias

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

El aprovechamiento de recursos marinos es una de las actividades económicas más importantes para los países que cuentan, como México, con al menos una costa.

Para éstos, existen especies marinas que son de mayor valor comercial que otras, sin embargo esto no implica que exclusivamente se exploten dichas especies, por lo que constantemente se busca el aprovechamiento íntegro de cada especie independientemente de su valor comercial (Cabello *et al.*, 2005).

Las diversas industrias que se dedican a la explotación de recursos pesqueros son generadoras de residuos que no siempre son desechados adecuadamente, por lo que en muchas ocasiones representan una fuente de contaminación para el ambiente.

Las especies pertenecientes a la familia de los crustáceos como son camarones, langostas, langostilla y diversos cangrejos, presentan un alto valor comercial ya que lo valioso en ellas es su pulpa, por lo que sus patas, abdomen, y caparazón o exoesqueleto son consideradas un desecho.

En el caso específico del cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*) únicamente se aprovecha entre el 10 a 20% de su carne, lo cual deja un 80% de su masa corporal sin una aparente utilidad. En la composición de los caparazones, las patas y las vísceras, la quitina, el carbonato de calcio, las proteínas y los pigmentos pueden ser aprovechados por otras industrias pesqueras (Flores, 2008, Zakaria *et al.*, 1998).

En México, la producción pesquera de jaiba en el año del 2012 fue de 21,536 toneladas por lo que ubica a este crustáceo en el lugar 11^{vo} con respecto al volumen de pesca, pero en cuanto a su valor comercial se encuentra en el lugar

14^{vo} con una aportación de 280 millones de pesos (Comisión de Acuicultura y Pesca, 2012).

En los crustáceos los pigmentos carotenoides se encuentran como β -caroteno, α -caroteno, equinenona, cantaxantina, zeaxantina, aloxantina, diatoxantina y astaxantina, siendo esta última la contenida en una mayor proporción (Félix-Valenzuela *et al.*, 2001).

Entre las investigaciones relacionadas con el consumo de astaxantina, concuerdan en que este pigmento carotenoides ofrece múltiples beneficios a la salud humana. Entre estos beneficios se pueden mencionar el empleo que se le da como suplemento alimenticio, agente antioxidante, previene el cáncer, diabetes, problemas cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos y estimula el sistema inmune, entre otros (Mendoza-Pérez *et al.*, 2015). Los productos que contienen astaxantina son usados en forma de tabletas, cápsulas, jarabes, aceites, geles, cremas, biomasa y polvos granulares (Kidd, 2011; Rao *et al.*, 2014).

Para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) provenientes de los crustáceos, varios autores han empleado diversos métodos químicos, entre los que pueden mencionarse la extracción con 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; extracciones con aceites vegetales y animales (Chen y Meyers, 1982; Luna, 2003; Torres-Aguirre, 2007) y el empleo de CO₂ supercrítico (Félix-Valenzuela *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2007).

Dado el contexto anterior, en la presente investigación se plantea la extracción de pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de desechos de cefalotórax y quelas del cangrejo azul mejor conocido como jaiba (*Calinectes sapidus*) empleando aceite de soya. La finalidad de ello es aprovechar estos residuos para generar un producto que pueda ser utilizado por la industria alimentaria mediante el empleo de tecnologías amigables con el ambiente.

1.2 Hipótesis

Por medio de una extracción mecánica empleando aceites vegetales comestibles será posible la obtención de pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos de jaibas (*Callinectes sapidus*).

Si se lleva a cabo una desmineralización usando un ácido orgánico y uno inorgánico se tendrá una mejor extracción de pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos de jaibas (*Callinectes sapidus*).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Obtener pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de desechos de jaiba empleando tecnologías más limpias mediante una extracción líquido-sólido con aceite de soya como disolvente.

1.3.2 Objetivos particulares

- Conocer las mejores condiciones de desmineralización empleando ácido clorhídrico y ácido acético bajo diferentes concentraciones y relaciones de harina:disolvente.
- Determinar la eficiencia de extracción de los pigmentos carotenoides empleando como disolvente aceite de soya bajo diferentes proporciones de harina:aceite de soya.
- Evaluar los cambios en la composición bromatológica de las harinas debidos a los diferentes tratamientos desmineralizantes.

1.4 Alcances de la investigación

Se estudiará la eficiencia de las condiciones experimentales propuestas para la desmineralización de las harinas enteras con cada uno de los ácidos utilizados y en sus respectivas relaciones de harina:disolvente (m/v). Se estudiará la eficiencia de la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina) con aceite comestible

vegetal como disolvente bajo diferentes proporciones de harina:aceite de soya propuesta en la metodología; únicamente para las harinas enteras (sin tratamiento) y para las harinas que presenten un menor % de cenizas y una mayor cantidad de % de grasa cruda para cada uno de los ácidos utilizados. Toda la fase experimental se realizó a escala de laboratorio.

En el Orden de los Decápodos casi todas sus especies son marinas, viven en la franja tropical habitando en las zonas costeras, litorales y océanos. Las jaibas (*Callinectes sapidus*) morfológicamente presentan un cefalotórax formado por la fusión del cefalón y todas las somitas torácicas; este gran tagma se encuentra cubierto por un caparazón y se fusiona ventralmente con el epistoma y los esternitos torácicos, para formar una “caja” que protege los órganos internos (Villalobos-Hiriart, 1998). Tienen el cuerpo deprimido, de tegumento grueso y calcificado. El último esternito torácico está fusionado al precedente. Su abdomen está flexionado totalmente abajo del caparazón: Úropodos raramente presentes y raramente birrámeos, caparazón fusionado con el epistoma, sólo el primer par de apéndices torácicos quelados, último par de apéndices torácicos modificados para la natación, cavidad bucal cuadrangular, generalmente con los bordes laterales casi paralelos. Se puede observar parte de la morfología mencionada en la Figura 2.

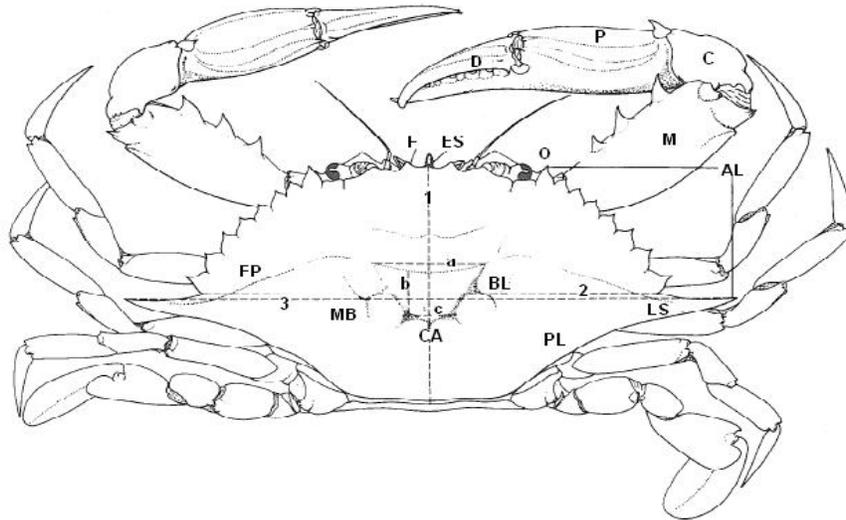


Figura 2. Vista dorsal del cangrejo azul o jaiba (*callinectes sapidus*). Partes anatómicas de una jaiba: 1- largo del cefalotórax, 2 cefalotórax sin las espinas laterales, 3 cefalotórax con las espinas laterales; dimensiones de la zona metagástrica (esta zona se encuentra en la parte dorsal del cefalotórax, las marcas y muescas son utilizadas como carácter para la clasificación o hacer biometría: a) ancho anterior, b) largo, c) ancho posterior. Otras características: F) diente frontal, O) diente de la órbita del ojo, AL) diente anterolateral, LS) espina lateral, PL) margen posterolateral, EP) línea epibranquial, ES) espina epistomal, MB) área mesobranquial, CA) área cardíaca, BL) lóbulo branquial. Partes del quelipedo, o quela M) mero, C) carpo, P) propodio, D) dactilo, “la parte móvil de la pinza” (modificado de Williams, 1974)

En la Figura 3 se aprecian las diferencias morfológicas por las que se puede distinguir la diferencia entre género del cangrejo azul o jaiba (*Callinectes sapidus*); los machos en el abdomen tiene una forma de te invertida, mientras que las hembras presentan dos tipos distintos de abdomen; las hembras inmaduras presentan un abdomen triangular con un telson al final y las hembras maduras un abdomen ovalado sin la presencia de un telson.

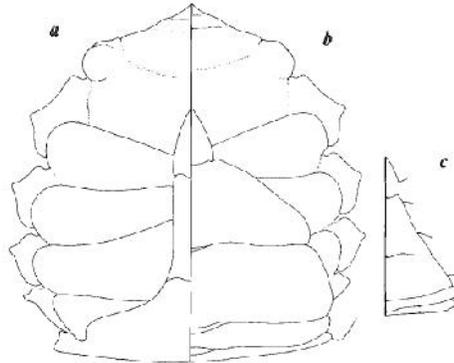


Figura 3. Diferenciación sexual de la jaiba, (a) tórax jaiba macho, (b) tórax hembra madura y (c) tórax hembra inmadura

2.1.2 Comparación con otros crustáceos

Los crustáceos contribuyen con un grupo de artrópodos que han colonizado una gran cantidad de ambientes. En él se incluyen especies popularmente identificadas como cangrejos, langostas, langostinos, jaibas, camarones, acociles, pulgas de playa, pulgas de agua, piojos de la madera, percebes, etc. A estos se les puede encontrar en agua dulce, salobre, marina o hipersalina (Villalobos-Hiriart, 1998).

En la Tabla 1 se aprecia la comparación química entre el camarón y el cangrejo, en ella se observa una diferencia considerable entre el contenido de carotenoides y de lípidos, siendo el camarón el que presenta valores mayores que el cangrejo.

En estudios como el de Shahidi y Synowiecki (1991) se realizaron comparaciones de especies de camarón (*Pandalus borealis*) con el cangrejo de nieve (*Chionoecetes opilio*). En la Tabla 2 se aprecian el contenido de carotenoides, de quitina y de proteína cruda derivados de dichas comparaciones.

Tabla 1. Comparación bromatológica entre las especies camarón y cangrejo (Shahidi y Botta, 1994)

Componentes	Camarón	Cangrejo
Humedad (%)	72.10 ^{±0.20}	42.50 ^{±0.31}
Proteína cruda (%)	44.12 ^{±0.79}	19.08 ^{±0.21}
Lípidos (% m.s. ^a)	8.39 ^{±0.80}	0.85 ^{±0.06}
Cenizas (% m.s.)	29.03 ^{±0.43}	30.68 ^{±0.31}
Quitina (% m.s)	40.40 ^{±0.48}	26.60 ^{±39.10^b}
Carotenoides (µg/g)	147.70 ^{±2.50}	139.90 ^{±2.00}
Valor PER ^c	2.79-2.88	2.30-2.42

^aMateria seca, ^bdependiendo de la parte del cangrejo, ^ctasa o relación de eficiencia proteínica

Tabla 2. Quitina, pigmentos carotenoides y proteína contenida en cefalotórax de camarón y en diferentes partes del cangrejo de nieve (Shahidi y Synowiecki, 1991)

Caparazón	Quitina cruda % base seca	Proteína, % base seca	Carotenoides totales, % base seca (masa)
Camarón	17.01±0.25	41.90±0.20	14.77±0.25
Espalda del cangrejo ^a	22.32±0.45	17.79±0.11	13.99±0.20
Espalda	18.80±0.13	18.61±0.14	11.96±0.25
Pinzas	23.70±0.33	17.21±0.18	1.64±0.01
Patas	32.25±0.11	15.68±0.11	3.43±0.02
Quelas	26.90±0.14	23.95±0.16	2.68±0.01
Puntas	27.61±0.22	18.01±0.12	1.98±0.11

a: caparazones blandos

En la Tabla 3 se pueden observar los resultados recopilados por Higuera-Ciapara *et al.* (2006) con respecto al contenido de pigmentos carotenoides (astaxantina) contenida en el camarón (*P. borealis*), en el cangrejo de río (*P. clarkii*) y en el cangrejo de nieve (*Ch. opilio*).

Algunos autores como Otwell y Koburger (1985) describen la composición química del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*). Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 4 no se reportan los contenido de carotenoides. Entre los principales carotenoides encontrados en los crustáceos se tienen los siguientes (Shahidi, 1998):

- 1.- -carteno (, -caroteno)
- 2.-Astaxantina (3,3'-dihidroxy- , -caroteno-4,4'-diona)
- 3.-Equinona (, -caroteno-4-ona)

- 4.-Cantaxantina (, -caroteno-4,4'diona)
- 5.-Phoenicoxantina (3-hidroxy- , -caroteno-4,4'diona)
- 6.-Criptoxantina (, -caroteno-3,3'-diol)
- 7.-Isocriptoxantina (, -caroteno-4,4'diol)
- 8.-Zeaxantina (, -caroteno-3,3'-diol)
- 9.-Isozeaxantina (, -caroteno-4,4'diol)
- 10.-Luteína (, -caroteno-3,3'-diol)

Tabla 3. Contenido de carotenoides de diversas fuentes de bio-residuos de crustáceos (Mendoza-Pérez, 2014)

Fuente	Astaxantina total (~g/g)	Astaxantina (%)			Referencias
		Libre	Monoéster	Diéster	
Camarón (<i>P. borealis</i>)	147.7	3.95	19.72	74.29	Shahidi y Synowiecki, 1991
Camarón (<i>P. borealis</i>)	49.7	8	22.5	69.5	Torrissen <i>et al.</i> , 1981
Camarón (<i>P. borealis</i>)	30.9	5.6	18.5	75.9	Guillou <i>et al.</i> , 1995
Cangrejo de río (<i>P. clarkii</i>)	153	40.3		49.4	Meyers y Bligh, 1981
Cangrejo de nieve (<i>Ch. Opilio</i>)	119.6	21.16	5.11	56.57	Shahidi and Synowiecki, 1991
Jaiba (<i>C. sapidus</i>)*	30.53	NR	NR	NR	Félix-Valenzuela <i>et al.</i> , 2001
Jaiba (<i>C. sapidus</i>)*	184	NR	NR	NR	Mendoza-Pérez, 2014

NR, no reportado

Tabla 4. Composición bromatológica del cangrejo azul en porcentaje en masa (*Callinectes sapidus*) (Otwell y Koburger, 1985)

Componente	Cangrejo azul (<i>Callinectes sapidus</i>)
Humedad	80.33 (77.4-86.79)
Proteína	15.9 (8.6-19.8)
Grasa	1.3 (0.4-2.2)
Cenizas	1.9 (1.3-2.7)
Total	99.43

En la Figura 4 se aprecian algunas de las estructuras químicas de los carotenoides mencionados.

2.2 Panorama mundial de la industria de la jaiba en la actualidad

El total de la producción mundial del pescado, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos alcanzaron durante 2012 los 158 millones de toneladas. Los principales países productores de animales acuáticos cultivados fueron China (41.1 millones de toneladas), India (4.2 millones de toneladas), Vietnam (3.1 millones de toneladas), Indonesia (3.1 millones de toneladas), Bangladesh, Noruega, Tailandia, Chile, Egipto y Myanmar, contribuyendo a la producción mundial con el 88% (FAO, 2014).

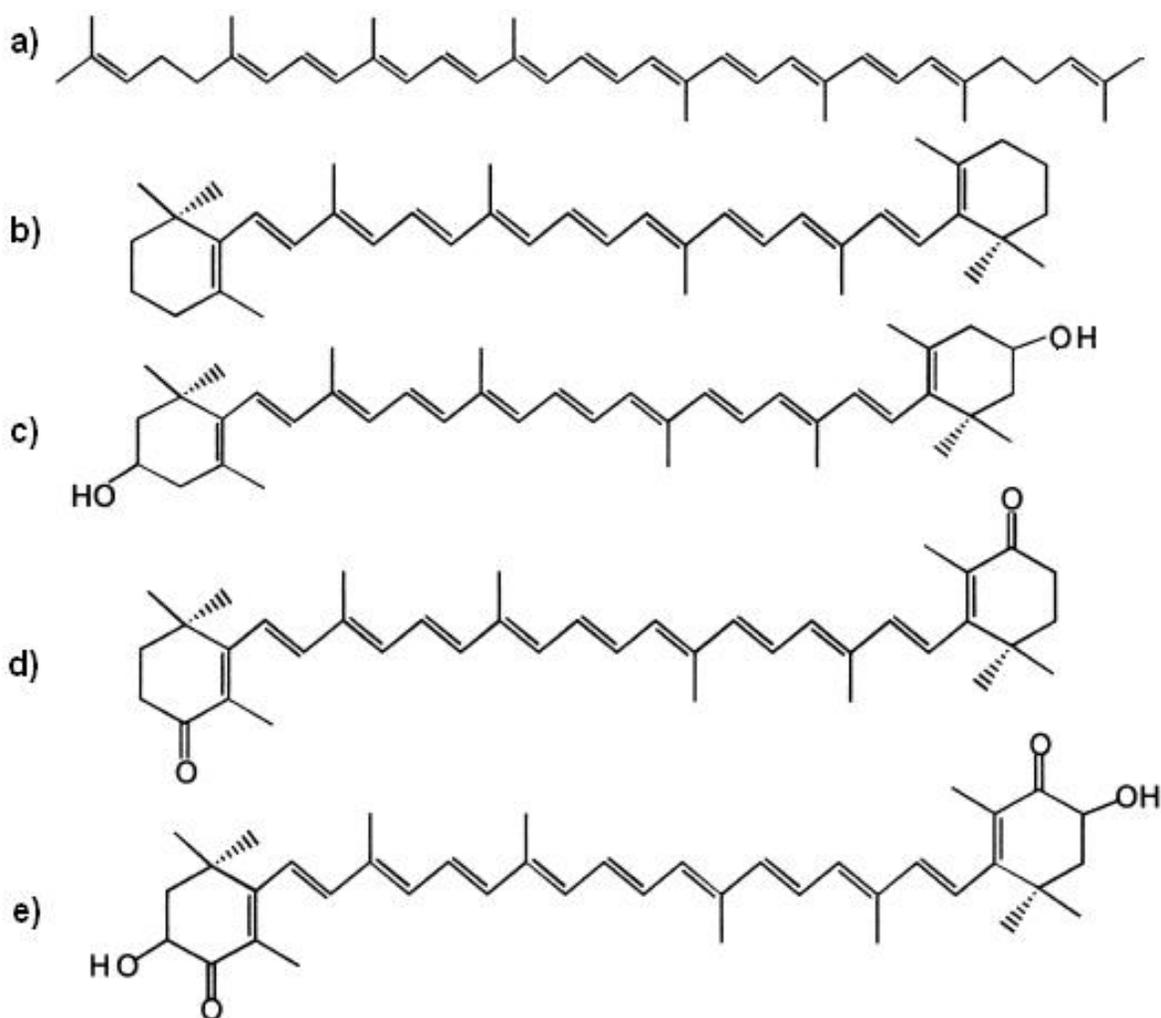


Figura 4. Estructura química de los carotenoides, licopeno (a), β -caroteno (b), zeaxantina (c), cantaxantina (d) y astaxantina (e) (Higuera-Ciapara, 2006).

El camarón sigue siendo el producto más importante comercializado en términos de valor y en el año 2012 representaba un 15% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente.

Los otros grupos de especies exportadas fueron el salmón y las truchas, con cerca del 14%, seguidos por las especies de fondo (merluza, bacalao, eglefino y colín de Alaska) y el atún (FAO, 2014).

2.2.1 Producción de jaiba en México

México es uno de los países que cuenta con una extensión territorial constituida por superficie continental, insular y marítima la cual se puede observar en la Figura 5. La superficie continental se refiere al territorio nacional articulado con el continente Americano y la insular, a la superficie de las islas del país.



Figura 5. Clasificación territorial de México (INEGI Marco Geoestadístico Nacional, 2010)

La superficie marítima está constituida por el mar territorial y la zona económica exclusiva. La superficie marítima tiene un área total de 3,149,920 km² y es conformada por el Océano Pacífico y el Golfo de México con una extensión de 2,320,380 y 829,540 km² respectivamente (INEGI, 2015).

Durante el 2012 la jaiba se encontró posicionada en el 11^{vo} lugar de la producción pesquera en México, ocupando el lugar 14 dado su valor comercial. Las principales entidades que participaron con la producción de jaiba fueron los estados de Sinaloa (38.18%), Sonora (16.65%), Veracruz (15.21%) y Campeche (10.2%) (Comisión de Acuacultura y Pesca, 2012). De este crustáceo solamente es aprovechado del 10 al 20% de su carne, dejando sin uso aproximadamente el 80% de la masa corporal que constituyen el caparazón, las patas y el abdomen. Estos desechos son ricos en quitina, carbonato de calcio y pigmentos carotenoides (Zakaria *et al.*, 1998; Flores, 2008; Escobar, 2013).

En la Figura 6 se puede apreciar el aporte de captura de cada uno de los estados productores, así como el porcentaje correspondiente del total de producción en captura (84.95%) y en acuicultura (15.95%) (CONAPESCA, 2013).



Figura 6. Aporte porcentual de las principales entidades productoras (CONAPESCA, 2013)

En la Figura 7 se observan las principales especies que se capturaron, en donde la jaiba se encontró en el 9^{no} lugar con una captura promedio entre los años 2007 y 2013 de 25,756 toneladas en masa viva (CONAPESCA, 2013).

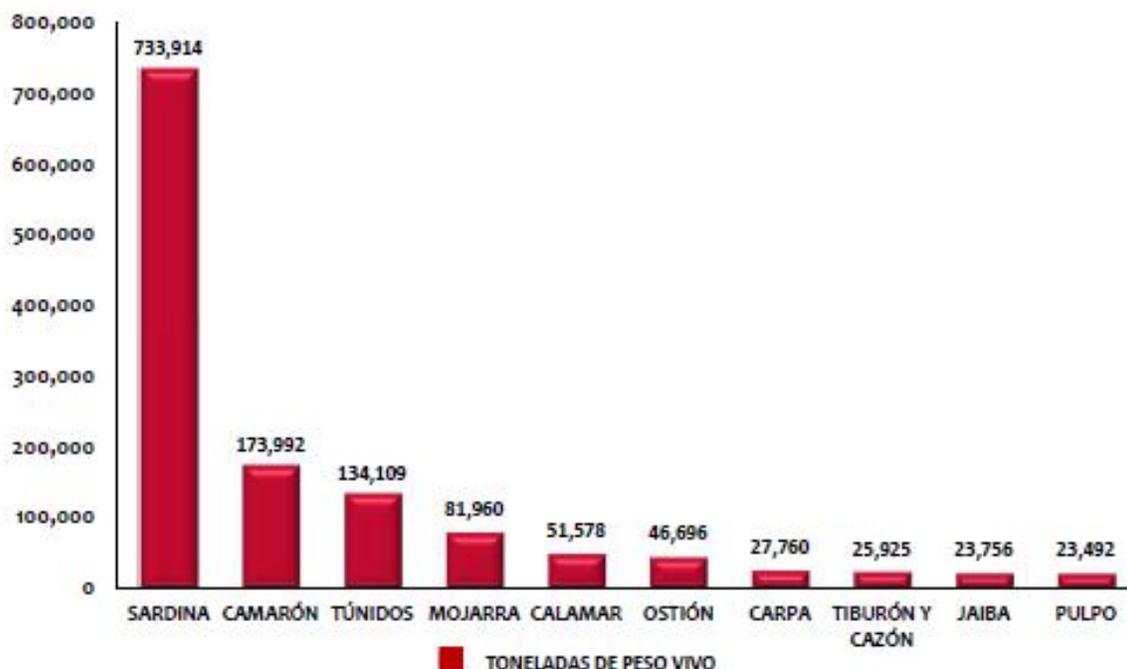


Figura 7. Producción promedio en toneladas de masa corporal viva de las principales especies 2007-2013¹ (CONAPESCA, 2013)

Durante el 2013 hubo una captura de jaiba de 26,878 toneladas en masa corporal viva mientras que para la producción en granjas acuícolas no figura entre las principales especies producidas.

En la Figura 8 se aprecia la producción aportada de cada uno de los estados en lo que respecta a la producción en captura y producción acuícola (CONAPESCA, 2013).

¹ Desafortunadamente, en las entidades gubernamentales no acaban de corregir el error de la diferencia entre masa y peso, la primera en unidades de masa justamente, kg, y la segunda en unidades de fuerza, N



Figura 8. Aporte de los estados, (a) producción pesquera y (b) producción acuícola (CONAPESCA, 2013)

2.3 Procesamiento de la jaiba en altamar y/o en tiraderos municipales

La producción anual de residuos de caparazones provenientes de cangrejos, langostas, camarones, kril y almeja, calculado en base seca durante 1991, se estimó en 1.44 millones de toneladas métricas (Knorr, 1991).

En Noruega se produjeron 16,000 toneladas métricas de camarón y sus derivados contuvieron suficiente pigmento para abastecer las granjas acuícolas durante un año (Torrissen et al., 1981) y en la India 80,000 toneladas de residuos de camarón son producidos anualmente por procesos industriales (Sachindra y Mahendrakar, 2005).

Se ha estimado que los caparazones de cangrejo y de camarón en los Estados Unidos proveen anualmente cerca de 6000 y 39,000 toneladas métricas de quitina, respectivamente (Sachindra y Mahendrakar, 2005).

Los subproductos de los crustáceos generados durante las operaciones de procesamiento de recuperación o acondicionamiento de la porción comestible de los cangrejos, camarón y langostas son altos en sales minerales (15 a 35%), proteína (25 a 50%), quitina (25 a 35%), lípidos y pigmentos (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

La quitina es un hidrato de carbono presente en el exoesqueleto de los crustáceos y representa del 15 al 30% de su masa total. Es un polímero unido por enlaces glucosídicos del tipo β -(1-4) (Flores, 2008).

La rigidez de exoesqueleto de los crustáceos se debe a la inclusión de sales de calcio entre los espacios existentes entre las fibras de quitina y en las que ocasionalmente se encuentran proteínas adheridas (Flores, 2008).

Se ha reportado que la quitina puede estar asociada a pigmentos del tipo carotenoides (cantaxantina y astaxantina) (Calvo-Carrillo *et al.*, 1995).

2.4 Clasificación de los pigmentos carotenoides (astaxantina)

2.4.1 Propiedades de los carotenoides

Los carotenoides pertenecen a la familia de los terpenos, es decir, están formados por 8 unidades de isopreno (Figura 9) y pueden ser divididos en dos clases superiores. La primer clase son carotenos altamente insaturados ($C_{40}H_{56}$) y no contienen oxígeno. Se incluyen en él a los α , β , γ -caroteno y licopeno. La segunda clase son el grupo de las xantofilas las cuales tienen derivados oxigenados de carotenos y contienen uno o más grupos oxigenados substituidos en sitios particulares en los anillos terminales. Este esqueleto de 40 carbonos puede ser modificado por una ciclación en uno o ambos extremos de la molécula para dar siete diferentes grupos funcionales; por cambios de nivel en la hidrogenación y por la adición de grupos funcionales que contiene oxígeno (Britton, 1995; Shahidi y Brown, 1998).

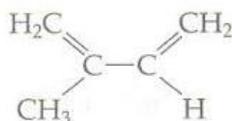


Figura 9. Estructura molecular del isopreno

Las propiedades físicas y químicas definidas por la estructura molecular dependen de su geometría molecular (tamaño, forma, presencia de grupos funcionales). El sistema conjugado de dobles enlaces determina las propiedades fotoquímicas y su reactividad química. La totalidad de las características mencionadas son de vital importancia para su correcta función biológica ya que el conjunto de dichas características determinan la colocación y la orientación en la estructura celular o subcelular. Cabe mencionar que las interacciones específicas con moléculas vecinas también son cruciales para una óptima funcionalidad (Britton, 1995).

Las carotenoproteínas son productos estables cuando se encuentran combinadas con otras moléculas, particularmente con proteínas, como se observa en los crustáceos. Se han caracterizado tres tipos de complejos, el primero es la carotenolipoproteína. El segundo son los quitinocarotenoides formados por quitina

y carotenoide enlazados por una base de Schiff o probablemente enlaces carbonil-amino. El tercero son las carotenoproteínas reales como la crustacianina (Shahidi y Synowiecki, 1991).

Los grupos más frecuentes encontrados en el grupo de las xantofilas son los substituyentes en medios ("moieties") de hidroxilo- (monodiol, diol y polyol), epoxi- (5,6- y 5,8-epóxidos), metoxi, aldehído, oxo, carboxilo y éster (Shahidi y Synowiecki, 1991).

2.4.2 Características de la astaxantina

La astaxantina es un carotenoide que se encuentra en animales, como aves, peces e inclusive en microorganismos como algas, microalgas y levaduras. Principalmente se le asocia con animales invertebrados como camarón, jaibas y langostas. La astaxantina libre puede ser usada en una variedad de productos como suplementos alimenticios para granjas acuícolas, alimentos, cosméticos y fármacos (Armenta-López, 2002).

Es posible encontrarla esterificada en uno o ambos grupos hidroxilo con ácidos grasos como el palmítico, oleico, esteárico, linoleico ó de manera libre. La astaxantina puede formar complejos químicos con proteínas y formar caroteno-proteínas ó lipoproteínas denominándose caroteno-lipoproteínas (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

El carotenoide astaxantina (3,3-dihydroxy- , -caroteno-4,4´diona) pertenece al grupo de las xantofilas. Su estructura consta de dos anillos terminales unidos a una cadena poliénica. Tiene una forma extendida, con una estructura polar en el inicio y final de la molécula y una zona no polarizada a la mitad, lo que le otorga propiedades hidrofílicas y lipofílicas (Rao *et al.*, 2014).

Esta molécula tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3, 3´ en el anillo -ionona con grupos hidroxilo (-OH) en cualquiera de los dos extremos de la molécula. En la Figura 10 se aprecia el porcentaje del contenido de ésteres de algunas fuentes de astaxantina (Rao *et al.*, 2014).

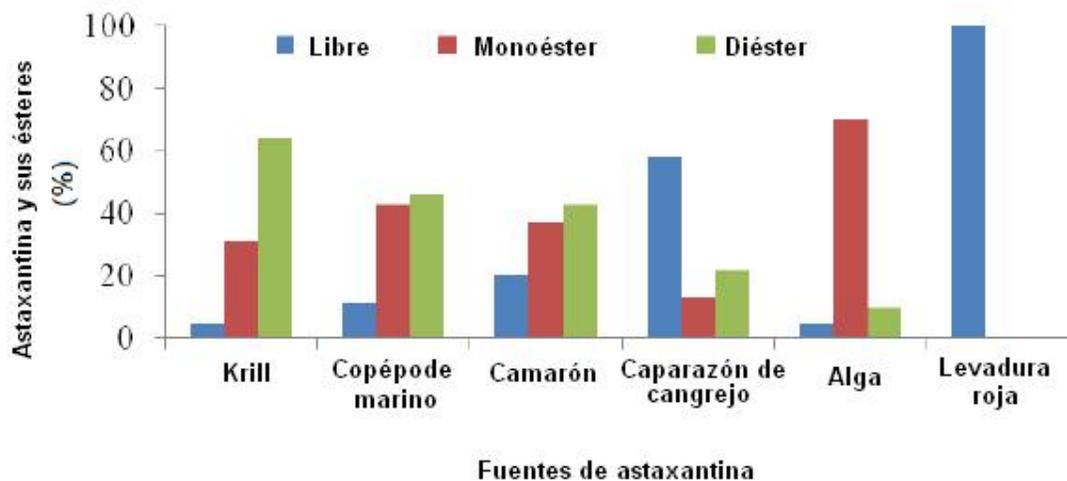


Figura 10. Gráfica de la composición de la astaxantina de diversas fuentes (Rao *et al.*, 2014)

En la Figura 11 se aprecian los estereoisómeros (3R, 3'S), (3S, 3'S) y (3R, 3'R) que son los más abundantes en la naturaleza. Estos isómeros que forman una mezcla racémica se encuentran en una proporción de 1:2:1. La coloración rojiza se debe a los enlaces dobles conjugados en el centro del compuesto (Schiedt *et al.*, 1993, Kidd, 2011; Rao *et al.*, 2014).

En el caso de los crustáceos, la proteína es llamada crustacianina, formando un complejo azul-gris (Britton *et al.*, 1997).

La coloración oscuro verde azulado que presentan las jaibas, en su estado natural, se debe a un compuesto salino constituido por la forma dienólica y esterificada de la astaxantina (anión) y una proteína (catión) (Primo-Yúfera, 2007).

La desnaturalización por calor y/o extracción con disolventes del complejo proteína-pigmento provoca un cambio en la coloración, del azul al rojo (Primo-Yúfera, 2007).

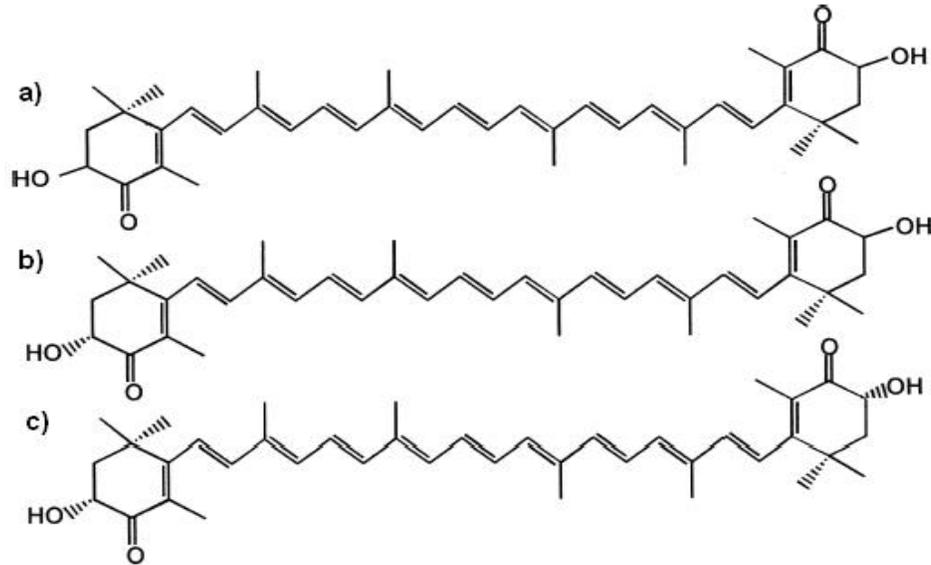


Figura 11. Estereoisómeros. (a) astaxantina (3S, 3'S), (b) astaxantina (3R, 3'S) y (c) astaxantina (3R, 3'R) (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006)

2.4.3 Deterioro del pigmento carotenoide (astaxantina)

Torrissen y colaboradores (1981), encontraron que la astaxantina es muy estable en medio ácido a un pH de 4 en un ensilado de residuos procesados de camarón por una pequeña conversión de diéster al correspondiente monoéster. La oxidación de la astaxantina es llevada a cabo por medio del oxígeno, el cual causa el rompimiento de los dobles enlaces de la cadena poliénica con su consecuente pérdida de coloración (Liaaen-Jensen y Storebakken, 1998). La oxidación se ve acelerada con el calor mediante un mecanismo similar al de la autooxidación de las grasas insaturadas; la reacción se cataliza con la presencia de los metales de transición, hierro y cobre, por la luz y por la disponibilidad de oxígeno (Ishiwari, 1980). Estas reacciones de deterioro se pueden controlar con la adición de antioxidantes como son el butilhidroxianisol y el butilhidroxitolueno conocidos como BHA y BHT por sus siglas, o de componentes secuestradores como los ácidos ascórbico, cítrico y etilendiaminotetracético, conocido como EDTA (Baduí, 2006).

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados en su estado libre, es mucho más sensible a los efectos dañinos de la luz, el calor, los ácidos y los álcalis, que

cuando se encuentra formando el complejo carotenoproteínico (Johnson y Ann, 1991; Shahidi y Brown, 1998).

2.4.4 Actividad biológica de la astaxantina

La utilización de este carotenoide (astaxantina) no es específico para el aprovechamiento en la acuicultura. Se han realizado diversos estudios en los que se han demostrado que tiene propiedades benéficas para la salud.

Entre estos múltiples beneficios se pueden encontrar su gran poder antioxidante, el cual se ha reportado que es superior al del β -caroteno y al del α -tocoferol ya que muestra una mejor actividad biológica que otros oxidantes debido a que se integra a la membrana celular de adentro hacia fuera; también se le atribuye potencial para prevenir diversos problemas cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y algunas debilidades del sistema inmunológico, también en la disminución del estrés oxidativo en sujetos con problemas de obesidad y en los fumadores, bloquea el daño oxidativo del ADN, previene la diabetes, algunos desórdenes neurodegenerativos y en algunos casos estimula el buen funcionamiento del sistema inmune (Higuera-Ciapara, 2006, Kidd, 2011, Mendoza-Pérez *et al.*, 2015; Rao, 2014).

2.5 Extracción de pigmentos carotenoides mediante diversas tecnologías

Debido al costo de la astaxantina sintética se ha optado por desarrollar tecnologías que permitan la obtención de este carotenoide con un menor costo, por ello, empresas farmacéuticas se encuentran realizando investigación para su obtención a partir de fuentes naturales empleando uno o más tipos de pretratamientos, por lo que en cada método es importante considerar la constitución química de la fuente de donde se desea realizar la extracción. Puesto que la astaxantina se encuentra asociada con proteínas, lípidos, sales minerales, etc, el desarrollo de estas tecnologías tiene como objetivo la estabilización del carotenoide, aumentar el rendimiento de astaxantina extraída, e incrementar la formación de astaxantina en diversos microorganismos. A continuación se citan los procedimientos más empleados para la obtención de astaxantina.

a) Por medio de fluidos supercríticos

La extracción con fluidos en estado supercrítico es una tecnología que favorece la aplicación de la astaxantina en procesos industriales que involucren alimentos. Es una alternativa convencional, rápida, eficiente y evita el consumo de grandes cargas de solventes orgánicos, los cuales pueden ser costosos y potencialmente peligrosos (Félix-Valenzuela *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2007).

El fundamento de este proceso consiste en la utilización de un fluido supercrítico como el CO₂ y aprovechar sus propiedades fisicoquímicas intermedias entre el estado líquido y gaseoso. Una de sus ventajas es prevenir la oxidación en la extracción. En algunos estudios se a utilizado CO₂ en estado supercrítico y un co-solvente como etanol para favorecer la extracción de astaxantina en residuos de crustáceos (*Callinectes sapidus*) lográndose obtener 30.53 ppm (Félix-Valenzuela *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2007).

b) Por medio de métodos enzimáticos

Las enzimas que se utilizan en la producción de pigmentos tienen la función de romper el enlace proteína-astaxantina para la obtención de aminoácidos y proteínas; los otros compuestos como la astaxantina son recuperados mediante la utilización de aceites comestibles y disolventes orgánicos.

Duarte-de-Holanda y Netto (2006) utilizaron en los residuos de camarón (*Xiphopenaeus kroyeri*) enzimas del tipo alcalasa, endopeptidasas (tripsina, quimotripsina) y carboxipeptidasa y, una vez obtenido el pigmento, para recuperarlo utilizaron dos sistemas de aceite de soya y una mezcla de éter de petróleo-acetona y agua en una proporción de 15:75:10 v/v/v.

Armenta-López (2002) usó residuos de *Penaeus sp* para la obtención de astaxantina extrayéndola con mezclas de solventes orgánicos como cloroformo-metanol-agua (1:2:4), éter de petróleo-acetona-agua (15:75:10) y etanol agua (40:60) para, finalmente, realizar una proteólisis con enzimas comerciales para la determinación de proteína soluble y xantofilas.

c) Empleando microorganismos

Los crustáceos y los salmónidos adquieren su coloración característica debido a su dieta en vida silvestre, es decir, por el consumo de diversas microalgas, kril y zooplancton. Por tanto, se han realizado estudios para identificar a microorganismos que son capaces de producir astaxantina y poder utilizarlos como fuentes de producción de dichos carotenoides. En la Tabla 5 se muestra el contenido de carotenoides en el alga *Haematococcus pluvialis*:

Tabla 5. Contenido de carotenoides en el alga *Haematococcus pluvialis* (Choubert y Heinrich, 1993)

Pigmentos	% total
-caroteno (, -caroteno)	2.2±0.6
Astaxantina (3,3'-dihidroxy- , -caroteno-4,4'-diona)	
Diéster	28.8±5.3
Monoéster	12.4±5.1
Libre	<1
Cantaxantina (, -caroteno-4,4'-diona)	44.2±3.7
Luteina (, -caroteno-3,3'-diol)	11.2±2.3

Entre los objetivos de estas investigaciones se tiene el de aumentar la producción de astaxantina, para lo cual se emplean condiciones experimentales que favorezcan la eficiencia de la reproducción (Harker *et al.*, 1996), la acumulación del colorante y el empleo de métodos químicos para mejorar su eficiencia.

Entre los microorganismos que se utilizan para obtener este pigmento, se cuenta con las algas *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Oocystis spp* y la levadura *Phaffia rhodozyma* (Fabregas *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002).

d) Empleando la extracción asistida por microondas (EAM) y por ultrasonido

La extracción asistida por microondas presenta una alta eficiencia de extracción, una buena reproducibilidad y un bajo consumo de solventes orgánicos, por lo que a la vez contribuye a reducir la acumulación de contaminantes. La extracción asistida por ultrasonidos utiliza ondas de alta frecuencia usualmente superiores a

los 16 kHz. En los estudios realizados por Zhao y colaboradores (2006) se probó la estabilidad del pigmento carotenoide (E-astaxantina) cuando es sometido a un tratamiento ultrasónico de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 minutos a 100, 200, 300, 400, 500 y 600 W.

También estas mismas condiciones fueron aplicadas en el tratamiento con microondas. Como se aprecia en la Figura 12 se observan los resultados de este estudio en donde se sugieren que las microondas y las ondas de ultrasonido presentan una marcada influencia en la estabilidad de la E-astaxantina, es decir, disminuyen cuando el tiempo de tratamiento y el poder de las ondas aumentan.

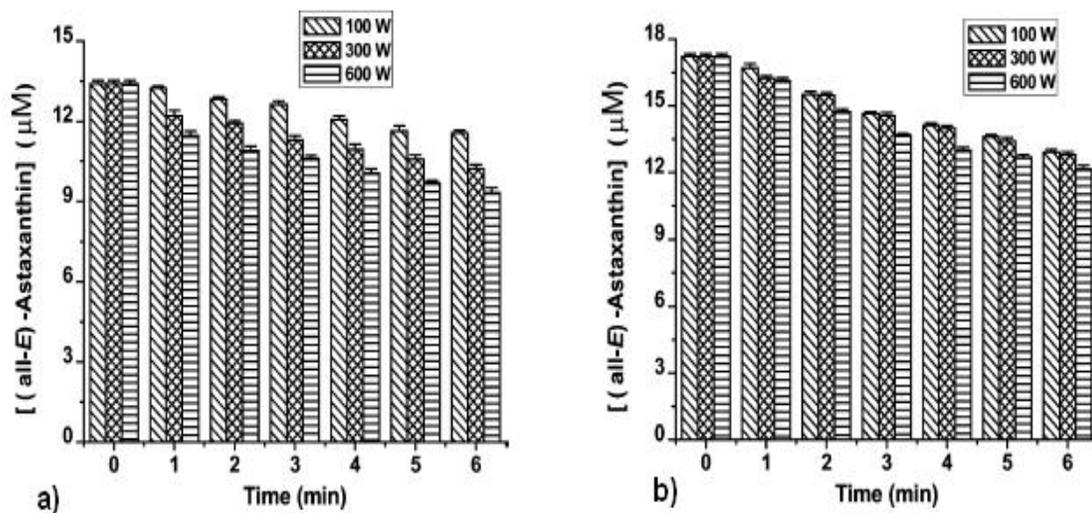


Figura 12. Cambios en la concentración de E-astaxantina. (a) Tratamiento con microondas, (b) tratamiento con ultrasonido (Zhao *et al.*, 2006)

Gogate y Nadar (2015) emplearon el ultrasonido para la extracción de astaxantina de la levadura *P. rhodozyma*. En su investigación emplearon el ultrasonido y tratamientos ácidos (ácidos láctico, cítrico y acético) para la ruptura de las células antes de realizar una extracción con etanol, éter de petróleo, acetona y metanol. Sus resultados indican que la combinación de ultrasonidos con ácido láctico favorecen los porcentajes de extracción.

2.6 Extracción de los pigmentos carotenoides empleando aceites vegetales comestibles

Las metodologías que se han empleado hasta la actualidad para obtener mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantina) a partir de crustáceos, en su mayoría han ido acompañados de tratamientos previos para aumentar la eficiencia de la extracción.

Por esta razón, el contenido de astaxantina de diversos crustáceos inclusive siendo de la misma especie varía en su cantidad global.

De manera general, en lo que coinciden estos estudios es en la utilización de solventes orgánicos y aceites comestibles para la extracción de pigmentos carotenoides (astaxantina).

Una de las ventajas que ofrece la utilización de emplear aceites comestibles para la extracción de estos pigmentos es que presentan una mejor integración al sistema digestivo de los peces y crustáceos utilizados en granjas acuícolas, además de que el aceite aporta una fuente de energía para el organismo que lo consume y para la industria de los alimentos es posible aplicarlos sobre un alimento (Omara-Alwala *et al.*, 1985; Luna-Rodríguez *et al.*, 2008).

Para realizar este tipo de extracciones se han empleado aceites grado alimenticio entre los cuales se pueden encontrar aceite de pescado como el de bacalao, arenque, sábalo atlántico y aceites vegetales provenientes de girasol, cacahuate, aceite de sésamo o ajonjolí, de mostaza, coco y aceite de soya (Sachindra, 2005).

Para las extracciones de astaxantina por medio de aceites vegetales se emplea un antioxidante como el Etoxiquin® ($C_{14}H_{19}NO$) ó etoxiquina y el Endox®, como agente protector puesto que durante las extracciones las temperaturas oscilan entre 40 a 90°C lo que puede causar la desnaturalización del pigmento.

En la Tabla 6 se aprecian las cantidades de pigmentos carotenoides (astaxantina) obtenida mediante la extracción con algunos aceites comestibles.

Tabla 6. Valores obtenidos de los carotenoides extraídos de los residuos del camarón empleando diferentes aceites comestibles (Sachindra y Mahendrakar 2005)

Aceite empleado	Carotenoides (astaxantinas) (µg/g de residuos)
Aceite de girasol	26.3±2.31
Aceite de cacahuete	23.1±1.56
Aceite de sésamo	23.9±1.32
Aceite de mostaza	16.1±1.85
Aceite de soya	24.8±1.51
Aceite de coco	24.7±2.42

2.7 Tipos de desmineralización empleando ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos

Muchos de los estudios realizados en los residuos industriales de los crustáceos se enfocan en el aprovechamiento de los componentes bioactivos contenidos en estos; la quitina, la proteína y los pigmentos carotenoides, siendo el principal objetivo de dichos estudios el aumento sobre el rendimiento en la extracción de los componentes deseados.

Otros de los componentes contenidos en los residuos de crustáceos son sales minerales y carbonato de calcio que es uno de los principales causantes de impedir la obtención de los compuestos de interés. Debido a esta razón, es que se han desarrollado metodologías en las que se emplean distintos ácidos con la finalidad de disminuir el contenido de minerales en los residuos de crustáceos y así facilitar la extracción de algunos de los componentes.

En estas investigaciones se han empleado ácido láctico (Bautista *et al.*, 2001); HCl (37%) (Gildberg y Stenberg, 2001); HCl a concentraciones de 0.6, 0.25 y 0.28 N (Belandria-Briseño y Morillo-de-Montiel, 2006); HCl de 0.5, 1.0 y 2.0 N (Escobar, 2013); un sistema de solventes de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) y de ácido acético (Meyers y Bligh, 1981) son algunos de los ejemplos de ácidos que se emplean para realizar dicha desmineralización. Sin embargo, la mayoría de ellos no reporta una disminución de minerales logrados con su tratamiento experimental.

Félix-Valenzuela y colaboradores (2001) utilizaron jaiba (*Callinectes sapidus*) para la extracción de astaxantina y realizaron una desmineralización, reportando una composición química en los residuos desmineralizados que se aprecia en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición química de residuos desmineralizados de jaiba (Félix-Valenzuela *et al.*, 2001)

Parámetro	% (\pm d.s.)
Humedad	10.95 \pm 0.04
Grasa	0.41 \pm 0.01
Ceniza	0.94 \pm 0.09
Carbohidratos	4.63 \pm 0.2 (mg%)
Astaxantina	30.53(ppm)
Proteína	33.8 \pm 2.3
Quitina	55.7 \pm 3.9

En el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida en esta investigación con base en estos fundamentos.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 13 se aprecia la metodología empleada en la realización de la presente investigación.

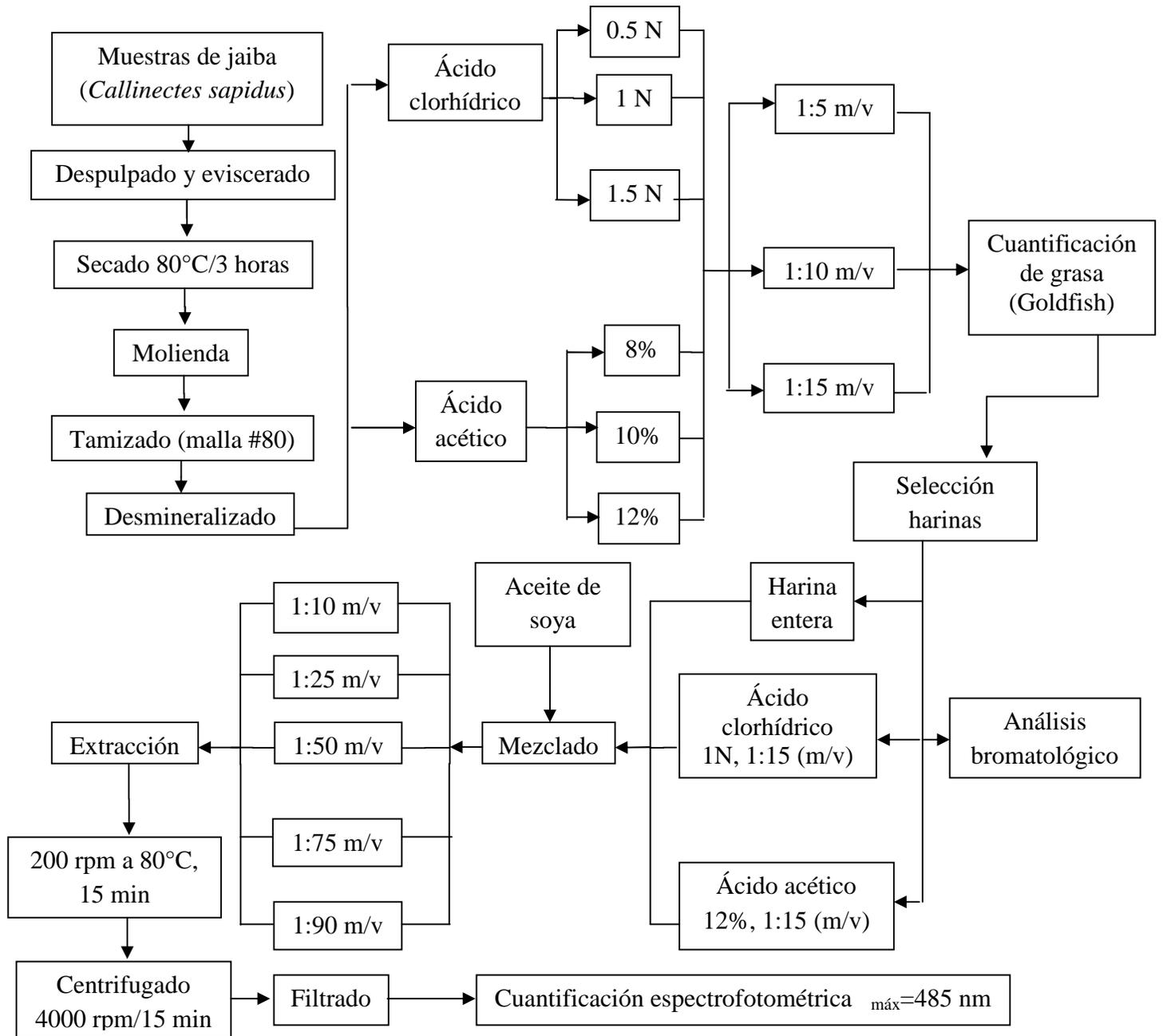


Figura 13. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la investigación

3.1 Diseño experimental

De entre las diferentes condiciones usadas de desmineralización se eligieron una de las harinas de cada agente desmineralizante que presentaran la menor cantidad de % de cenizas totales y un mayor contenido de % de grasa.

El diseño experimental seguido en esta experimentación fue de tipo multifactorial categórico involucrando tres factores: a) el tipo de harina, b) la relación de masa de harina:volumen de disolución desmineralizante y c) la relación masa de harina:volumen de aceite de soya, con tres réplicas por cada combinación de factores.

El factor de tipo de harina tuvo 3 niveles: harina entera de cefalotórax y quelas, harina desmineralizada con ácido clorhídrico a una concentración de 1.0 N y harina desmineralizada con ácido acético a una concentración del 12% (m/v); el factor relación masa de harina:volumen de disolución tuvo tres niveles: una relación 1:5, 1:10 y 1:15 (m/v) y el factor relación masa de harina:volumen de aceite de soya tuvo 5 niveles: una relación 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:90 (m/v).

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.II). En la Tabla 8 se observa el diseño experimental propuesto y descrito anteriormente.

Para el análisis bromatológico se usó un diseño experimental monofactorial. El factor fue cada tipo de harina y tuvo tres niveles: harina entera, harina desmineralizada con ácido clorhídrico 1.0 N y harina desmineralizada con ácido acético 12%. La variable de respuesta fue el contenido del nutrimento analizado expresado en % debido a las técnicas utilizadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En la Tabla 9 se observa el diseño experimental propuesto para el análisis bromatológico.

Tabla 8. Diseño experimental propuesto para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina)

Réplica	Tipo de harina														
	Harina entera					Harina desmineralizada con HCl					Harina desmineralizada con ácido acético				
	Relación harina:aceite de soya					Relación harina:aceite de soya					Relación harina:aceite de soya				
	E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Donde: E1: 1:10, E2: 1:25, E3: 1:50, E4: 1:75, E5:1:90 relación harina:aceite (m/v)

Tabla 9. 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 HCl	Harina desmineralizada con HCOOCH ₃
1	x	x	x
2	x	x	x
3	x	x	x

3.2 Preparación de la muestra

3.2.1 Materia prima utilizada

Las jaibas usadas se adquirieron en la zona de pescados y mariscos de la Central de Abastos de la Ciudad de México y se transportaron en botes grandes 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 que las muestras fueron evisceradas y lavadas fueron llevadas a dichos laboratorios para a realizar las operaciones de secado, molienda, tamizado, desmineralizado y almacenado, para que una vez obtenidas las harinas se realizará una extracción con aceite de soya y la cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantina).

3.2.2 Procesos de despulpado, eviscerado y lavado

El eviscerado se realizó de manera manual, desprendiéndose el cefalotórax y las tenazas del tórax de las jaibas.

A cada cefalotórax se les retiraron las vísceras adheridas al igual que los ojos y las quelas se trozaron para poder retirar la pulpa contenida. El tórax de las jaibas se limpió para poder ser consumido.

Las vísceras y patas fueron eliminadas como residuo orgánico biodegradable. Una vez realizado esto se lavaron los cefalotórax y las quelas bajo chorro de agua para poder retirar la suciedad, residuos de vísceras y de pulpa adherida.

Se dejaron escurrir durante un periodo de 15 minutos para colocarse en bolsas de plástico color negro y mantenerse en congelación hasta ser transportadas a los Laboratorios 301, 302 y 303 para proseguir con los siguientes procesos.

3.2.3 Secado de los cefalotórax y de las quelas

Los cefalotórax y tenazas se distribuyeron en charolas de aluminio y se sometieron a un proceso de secado a una temperatura de 80°C durante 3 horas. Este proceso favorece la disminución de la actividad acuosa y extiende la preservación del producto, ya que evita la descomposición microbiana y enzimática. En el exoesqueleto de los crustáceos se encuentra la proteína crustacianina ya mencionada en el capítulo anterior; la cual al momento de desnaturalizarse facilita la extracción de la astaxantina.

3.2.4 Proceso de molienda y tamizado de los cefalotórax y quelas

Una vez que se procedió al proceso de secado se realizó una molienda en una licuadora marca Osterizer™ a su máxima potencia por un periodo de tres minutos alternando durante un minuto de descanso para evitar el sobrecalentamiento del motor. Para el tamizado de la harina se utilizaron los tamices No. 40 y 80, que corresponden a una abertura de malla de 0.420 y 0.177 mm, respectivamente.

3.2.5 Desmineralización de la harina entera

Debido a que no existe suficiente información bibliográfica para este proceso al respecto, se analizaron diversas investigaciones en donde se favoreció la extracción de pigmentos carotenoides (astaxantinas) al realizar un proceso de desmineralización previo a la extracción de los pigmentos (Jiménez, 2003). La finalidad fue la de aumentar la remoción de los minerales presentes en las harinas enteras y disminuir el daño que pudieran sufrir los pigmentos carotenoides (astaxantina). En este estudio se utilizaron dos agentes desmineralizantes: HCl y HCOOCH₃ probando diferentes relaciones, 0.5, 1.0 y 1.5 N y 8, 10 y 12% (v/v) de concentración según corresponden y diversas proporciones de relación harina:disolvente de 1:5, 1:10 y 1:15 (m/v) para, posteriormente, filtrar las harinas y lavarlas con agua destilada a temperatura ambiente, hasta que el agua de lavado se obtuviera de un color cercano al transparente. Finalmente, se sometieron a un proceso de secado a 80°C durante 4 a 5 horas con la finalidad de conservar la muestra seca y evitar su descomposición.

3.3 Análisis bromatológico de las harinas enteras y desmineralizadas

Los análisis de criterio a los que se sometieron las harinas desmineralizadas bajo las diferentes concentraciones fueron: Cenizas totales usando una mufla y grasa bruta empleando un equipo Goldfish para que una vez obtenidos los resultados de las harinas que presentaran una menor cantidad de minerales y un mayor contenido de grasa fueran los que se sometieran al siguiente análisis bromatológico: Humedad por secado en estufa, proteína por el método de Kjeldahl y fibra dietética total por el método enzimático-gravimétrico. Las metodologías utilizadas en estas determinaciones se presentan en el ANEXO 1.

3.4 Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina) empleando aceite de soya

La extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina) se realizó únicamente a la harina entera y a una de las harinas desmineralizadas bajo cada agente desmineralizante cuyas características fueran las de presentar una menor

cantidad de cenizas y una mayor cantidad de grasa bruta. Para cada una de las harinas se realizó una extracción con agitación constante a 200 rpm durante 20 min a una temperatura de 80°C probándose cinco diferentes relaciones de gramos de harina/volumen de aceite de soya siendo 1/10, 1/25, 1/50, 1/75 y 1/90 con la adición de 500 ppm de EtoxiquinTM como agente protector de la oxidación. Posteriormente, cada una de las muestras se colocó en una centrífuga a 10°C y 4000 rpm durante 15 min para lograr la separación del extracto oleoso pigmentado y la separación de los residuos de harina. Todas las determinaciones de las muestras se realizaron por triplicado.

3.5 Cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)

Los pigmentos carotenoides (astaxantina) contenidos en el aceite fueron cuantificados con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Visible de la marca GBC Scientific Equipment, modelo Cintra, en donde se realizó una curva patrón de astaxantina con un estándar de astaxantina de la marca Sigma-Aldrich con el que se obtuvieron 8 puntos con un rango de concentración que osciló de los 0.504 µg/mL a los 6.3 µg/mL bajo una longitud de onda de 485 nm con los que se obtuvieron los valores de absorbancia de cada muestra obtenida (Mendoza-Pérez, 2014).

3.6 Análisis estadísticos de los datos experimentales

Los datos experimentales fueron evaluados estadísticamente usando un programa computacional "Statgraphics" Centurión versión XV.1

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Proceso de secado de los cefalotórax de jaiba y de las quelas

En la Figura 14 se aprecia el cambio de coloración de las jaibas que se emplearon en esta investigación. Hay una coloración café en los cefalotórax además de las tonalidades azules en las quelas. Al someterlas a un procesos de calentamiento de 80°C/3h la tonalidad cambió a una coloración rojiza intensa. En la Figura 14a se muestra una jaiba entera, mientras que en las Figuras 14b y 14c se muestran las quelas y los cefalotórax después de haber recibido el tratamiento térmico, respectivamente. Como ya se ha mencionado anteriormente, la desnaturalización por calor del complejo proteína-pigmento provoca un cambio en la coloración, del azul al rojo.

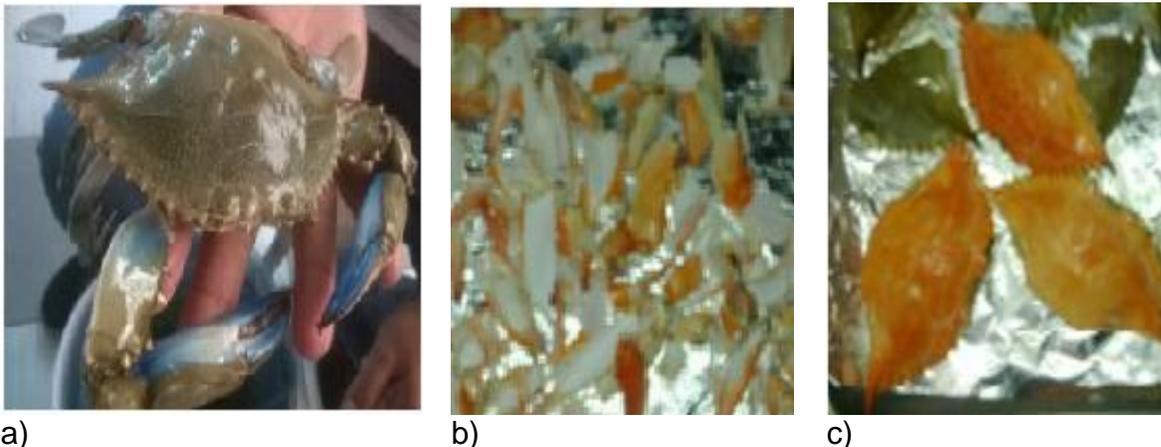


Figura 14. Tratamiento térmico: (a) jaiba sin tratamiento, (b) quelas después del tratamiento térmico y (c) cefalotórax después del tratamiento térmico

4.2 Molienda de los residuos utilizados y tamizado de las harinas

Las harinas resultantes del proceso de la molienda fueron tamizadas obteniendo en la malla No. 40 el 41.5% correspondiendo a una granulometría mayor a 0.420 mm y en la malla No. 80 el 28.4%, es decir de un tamaño entre 0.420 y 0.117 mm

y la fracción restante correspondiente al 30.1% con un tamaño menor a 0.117 mm. En investigaciones anteriores, Mendoza-Pérez (2014) utilizó la mezcla de las harinas de jaiba con una granulometría menor a 0.420 mm; por lo que en este trabajo se tomó como referencia esta granulometría para fines prácticos de la investigación.

4.3 Desmineralización de las harinas de jaiba y evaluación del % de cenizas

Los restos de jaiba contienen diversos componentes que evitan que los pigmentos carotenoides (astaxantinas) puedan ser extraídos fácilmente.

Destacan las sales minerales, el carbonato de calcio y la quitina, por lo que se someten a un proceso de desmineralización para favorecer la liberación de los pigmentos carotenoides (astaxantina) (Jiménez, 2003; Muzarelli, 1977).

Debido a que existe poca información respecto a las desmineralizaciones de restos de jaibas se realizaron pruebas con ácido clorhídrico y con ácido acético bajo tres diferentes concentraciones, así como también bajo tres diferentes proporciones de harina:disolución desmineralizante.

En este estudio las harinas enteras (sin tratamiento) contienen 65.66% de cenizas totales y en la Tabla 10 se aprecia el % de cenizas totales finales considerando las diferentes condiciones experimentales de desmineralización.

En la Tabla 10 también se puede apreciar que al desmineralizar la harina a las concentraciones manejadas de ambos ácidos y con las 3 relaciones de harina:disolvente fue posible la disminución del contenido de cenizas en todas ellas, con excepción de la concentración de HCl 0.5 N, donde no se logró un cambio con respecto del contenido de cenizas iniciales de la harina entera sin tratamiento (64.53%).

Posiblemente esto se debió a la baja concentración de ácido manejada en esta condición.

Tabla 10. Resultado del % de cenizas tras la desmineralización empleando HCl y HCOOCH₃

Relación de harina/disolvente (m/v)	HCl (N)	%cenizas*	HCOOCH ₃ %(v/v)	% cenizas*
(1:5)	0.5	64.53 ^{±0.32}	8	49.39 ^{±1.22}
(1:10)		59.36 ^{±1.37}		25.72 ^{±3.93}
(1:15)		48.48 ^{±1.09}		21.13 ^{±1.09}
(1:5)	1	53.81 ^{±0.65}	10	39.63 ^{±0.38}
(1:10)		40.71 ^{±0.83}		28.82 ^{±0.51}
(1:15)		1.68 ^{±1.05}		14.03 ^{±2.06}
(1:5)	1.5	53.78 ^{±0.70}	12	36.80 ^{±0.55}
(1:10)		2.89 ^{±0.84}		18.87 ^{±0.43}
(1:15)		1.91 ^{±0.05}		13.75 ^{±0.66}

*Promedio obtenido de tres determinaciones experimentales

En la Figura 15 se aprecia que conforme la concentración de HCl aumenta, la proporción de harina:disolución disminuye el % de cenizas a los valores de 48.48, 1.68 y 1.91%, los cuales son correspondientes a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 N, respectivamente. El análisis de varianza de la Tabla 11 indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la concentración de la disolución y la relación de harina:disolvente, mientras que en el diagrama estandarizado de Pareto (Figura 16) se aprecia que el factor que más aportó a la diferencia estadística fue la concentración del agente desmineralizante.

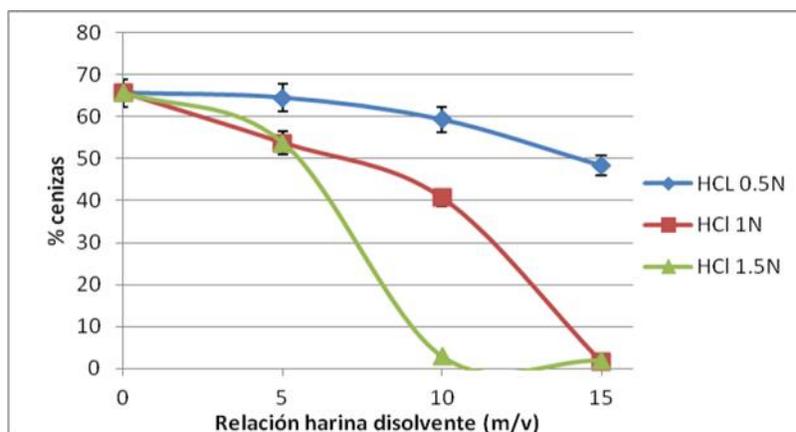


Figura 15. Porcentaje de cenizas versus relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCl

Tabla 11. Análisis de varianza para el % de cenizas obtenidas a las diferentes relaciones de HCl manejadas como factor desmineralizante (GI, grados de libertad)

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: HCl	6474.08	1	6474.08	65.23	0.0000
B: Rrelacion de harina	7206.4	1	7206.4	72.61	0.0000
AA	247.427	1	247.427	2.49	0.1309
AB	962.842	1	962.842	9.70	0.0057
BB	55.5713	1	55.5713	0.56	0.4635
Bloques	0.0500222	2	0.0250111	0.00	0.9997
Error total	1885.7	19	99.2471		
Total (corr.)	16832.1	26			

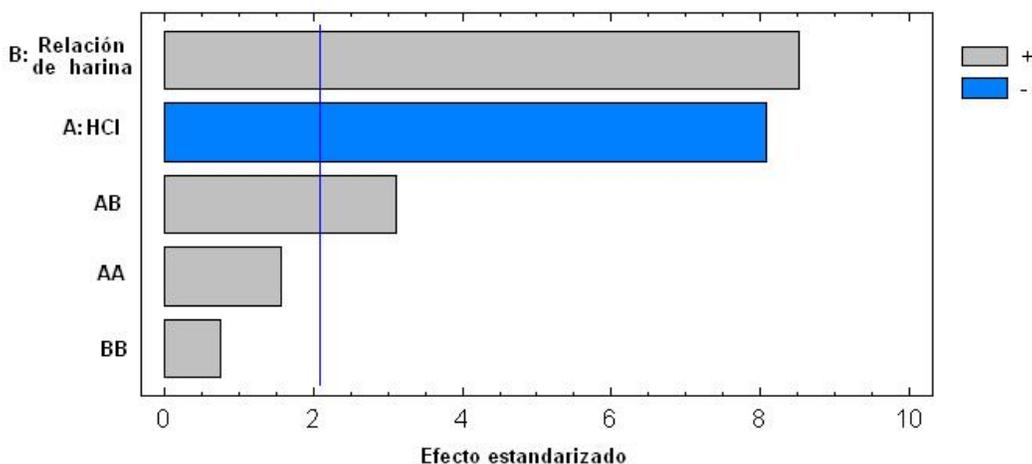


Figura 16. Diagrama de Pareto estandarizado para el % de cenizas de HCl

Al desmineralizar las harinas empleando HCOOCH_3 bajo las concentraciones establecidas y las relaciones de harina:disolvente manejadas, se logró disminuir el contenido de cenizas, como se aprecia en la Figura 17.

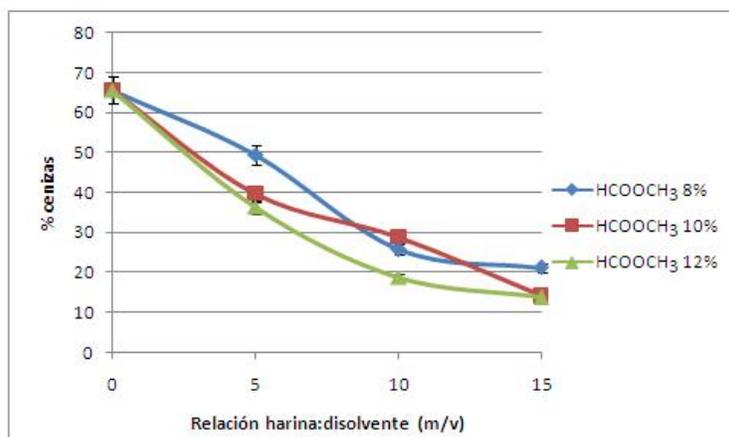


Figura 17. Gráfica del % de cenizas versus la relación de harina:disolución para las concentraciones manejadas de HCOOCH₃

En ella, se aprecia que, mientras la concentración de CHCOOCH₃ aumentó a las concentraciones de 8, 10 y 12% (v/v), el % de cenizas disminuyó a 21.12, 14.03 y 13.75%, respectivamente. El análisis de varianza de la Tabla 12 indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la concentración de la disolución y la relación harina-disolvente. Mediante el diagrama de Pareto (Figura, 18) se aprecia que el factor que más aportó a la diferencia estadística, como en el caso anterior, fue la concentración del agente desmineralizante, en este caso, el ácido acético.

Tabla 12. Análisis de varianza para los % de cenizas obtenidas con HCOOCH₃ (GI, grados de libertad)

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: HCOOCH ₃	359.477	1	359.477	27.24	0.0000
B: Relación de harina	2957.83	1	2957.83	224.14	0.0000
AA	0.0785852	1	0.0785852	0.01	0.9393
AB	20.4102	1	20.4102	1.55	0.2288
BB	129.797	1	129.797	9.84	0.0054
bloques	1.32019	2	0.660093	0.05	0.9513
Error total	250.732	19	13.1964		
Total (corr.)	3719.65	26			

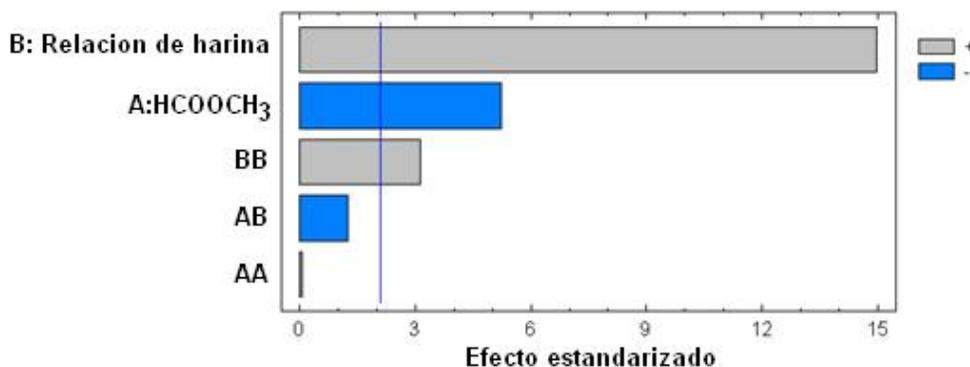


Figura 18. Diagrama de Pareto estandarizado de % de cenizas obtenidas con HCOOCH₃

4.4 Contenido del % de grasa en las harinas enteras (sin tratamiento) y de las harinas desmineralizadas

Como ya fue mencionado, la astaxantina se encuentra en la naturaleza en forma de caroteno-proteína, lipoproteínas, de manera libre, y mayoritariamente, en forma mono y diesterificada (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006), por lo que el % de grasa puede relacionarse con el contenido de pigmentos carotenoides (astaxantina) en las harinas enteras (sin tratamiento) y en las harinas desmineralizadas. En la Tabla 13 se aprecia el % de grasa obtenido bajo las diferentes condiciones experimentales de desmineralización.

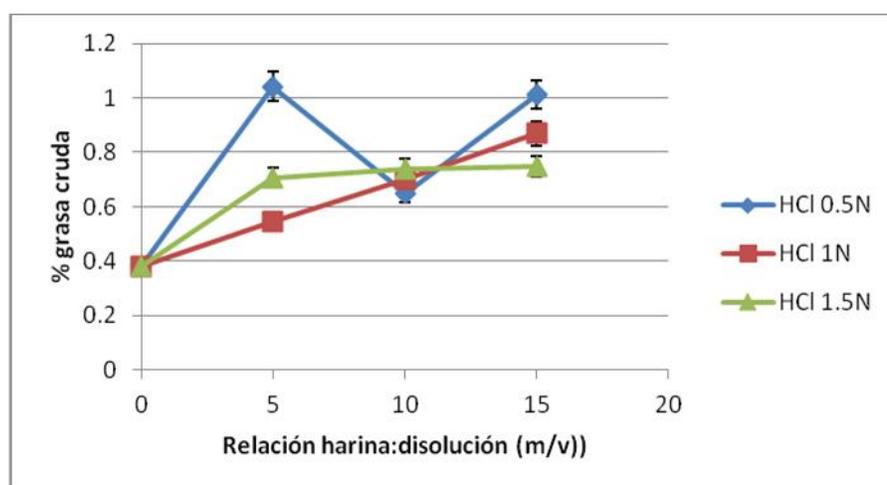


Figura 19. Valores de los porcentajes de grasa cruda versus la relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCl

Tabla 13. Resultados del % de grasa cruda obtenida tras la desmineralización empleando HCl y HCOOCH₃

Relación de harina/disolvente (m/v)	HCl (N)	*% Grasa cruda *	HCOOCH ₃ % (v/v)	*% Grasa cruda*
(1:5)	0.5	1.04 ^{±0.22}	8	0.16 ^{±0.02}
(1:10)		0.64 ^{±0.12}		0.25 ^{±0.02}
(1:15)		1.01 ^{±0.12}		0.56 ^{±0.14}
(1:5)	1	0.54 ^{±0.47}	10	0.65 ^{±0.15}
(1:10)		0.70 ^{±0.02}		0.69 ^{±0.02}
(1:15)		0.86 ^{±0.17}		0.81 ^{±0.24}
(1:5)	1.5	0.70 ^{±0.28}	12	0.95 ^{±0.12}
(1:10)		0.73 ^{±0.10}		0.73 ^{±0.10}
(1:15)		0.75 ^{±0.11}		1.24 ^{±0.02}

*Promedio obtenido de tres determinaciones experimentales

En lo que respecta al % de grasa cruda de las harinas enteras (Tabla 16), su valor fue de 0.38%. El % de grasa cruda extraída de cada condición experimental bajo las diferentes condiciones desmineralizantes con HCl fueron mayores a las obtenidas para las harinas enteras. Los valores más altos de la desmineralización se alcanzaron con el HCl en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 N, las cuales fueron de 1.04, 0.86 y 0.75%, respectivamente, como se aprecia en la Figura 19, no existiendo ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los factores evaluados para las 3 concentraciones de ácido manejadas. El factor más influyente en esta etapa fue la concentración de ácido clorhídrico empleado y la interacción existente entre cada una de las concentraciones de HCl con sus respectivas relaciones de harina:disolución (m/v) (Tabla 14, Figura 20).

Tabla 14. Análisis de varianza para el % de grasa cruda obtenidas con HCl (GI, grados de libertad)

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:HCl	0.230091	1	0.230091	4.38	0.0500
B:Relación harina	0.0258781	1	0.0258781	0.49	0.4913
AA	0.000136009	1	0.000136009	0.00	0.9600
AB	0.0413248	1	0.0413248	0.79	0.3862
BB	0.12003	1	0.12003	2.28	0.1471
Bloques	0.0981973	2	0.0490987	0.93	0.4101
Error total	0.99826	19	0.05254		
Total (corr.)	1.51392	26			

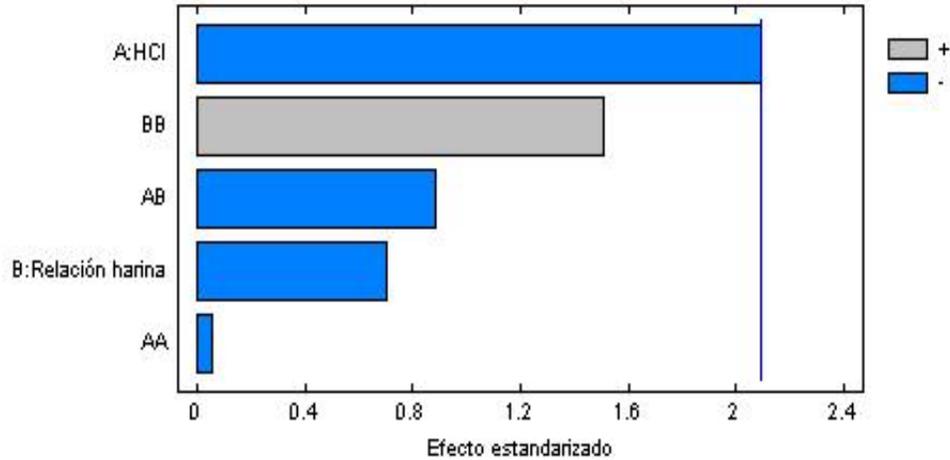


Figura 20. Diagrama de Pareto estandarizado para el % de grasa cruda de las diferentes concentraciones de HCl

En lo que respecta al % de grasa cruda de los tratamientos desmineralizantes con HCOOCH_3 solamente las concentraciones del 10 y del 12% (v/v) fueron mayores que la obtenida para las harinas enteras (0.38%) como se aprecia en la Figura 21.

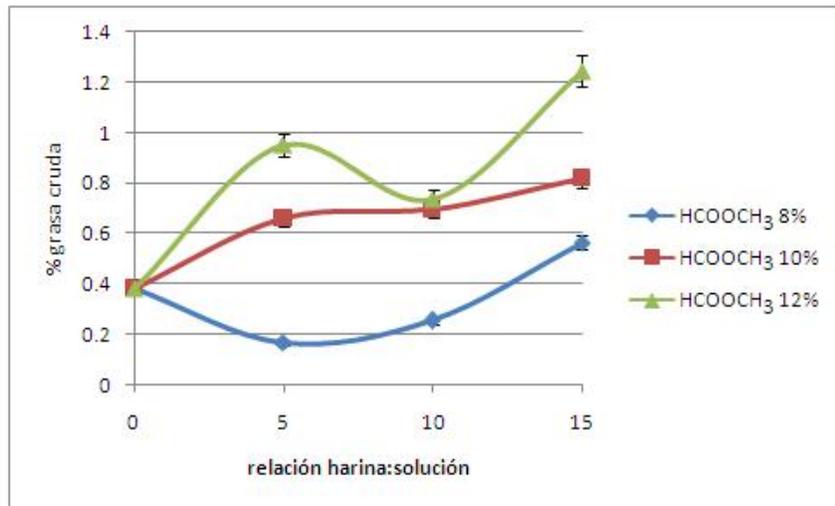


Figura 21. Porcentaje de grasa versus la relación de harina:disolución empleando diferentes concentraciones de HCOOCH_3

Los valores más altos obtenidos en la desmineralización con HCOOCH_3 al emplearse las concentraciones del 10 y 12% (v/v), fueron de 0.81 y de 1.24%, respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza (Tabla 15) se nota que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones del agente desmineralizante. Al realizar el diagrama estandarizado de Pareto (Figura 22) se aprecia que el factor de la relación harina:disolvente fue el que aportó una mayor diferencia significativa.

Tabla 15. Análisis de varianza para la recuperación de grasa cruda en porcentaje obtenida con HCOOCH_3 (GI, grados de libertad)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: HCOOCH_3	1.89437	1	1.89437	87.25	0.0000
B:Relación de harina	0.360599	1	0.360599	16.61	0.0006
AA	0.0313637	1	0.0313637	1.44	0.2442
AB	0.00812761	1	0.00812761	0.37	0.5479
BB	0.176165	1	0.176165	8.11	0.0103
Bloques	0.0072307	2	0.00361535	0.17	0.8478
Error total	0.412536	19	0.0217124		
Total (corr.)	2.89039	26			

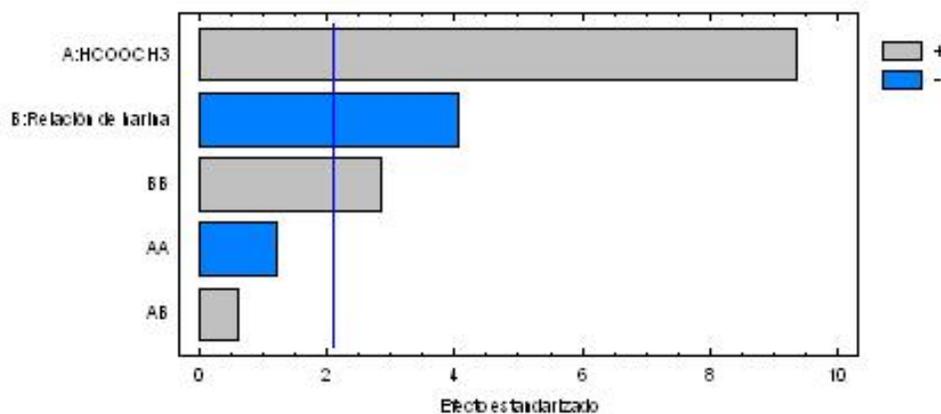


Figura 22. Diagrama de Pareto estandarizado para el % de grasa cruda empleando HCOOCH_3 para su extracción

4.5 Elección del proceso a seguir de desmineralización

En las Tablas 10 y 13 se aprecia que, empleando ambos agentes desmineralizantes, se logró disminuir el % de cenizas y aumentar el % de grasa cruda, respectivamente, en comparación con los valores encontrados en las harinas enteras (sin tratamiento), por lo que estos parámetros fueron tomados como criterio para elegir la concentración y/o proporción de ácido a emplearse con su respectiva relación harina/aceite. Esto se realizó con la finalidad de obtener una

mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) ya que se ha visto que el contenido de minerales en los crustáceos evita que los aceites puedan efectivamente extraer los pigmentos carotenoides y, a su vez, éstos se encuentran en el extracto etéreo de manera esterificada (Mendoza-Pérez, 2014). Por ello se eligieron las harinas que tuviesen el menor contenido de cenizas pero, al mismo tiempo, una mayor cantidad de grasa cruda. Estas relaciones se obtuvieron empleando HCl a una concentración de 1N en una relación de harina:disolvente de 1:15 (m/v). Para el HCOOCH₃ al 12% (v/v) se tuvo una relación de harina:disolvente de 1:15 (m/v).

Tabla 16. Resultados de la harina entera y harinas desmineralizadas elegidas para la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas)

Parámetro	Harina entera (sin tratamiento)	HCl 1N, 1:15 (m/v)	HCOOCH ₃ 12% (v/v), 1:15 (m/v)
% cenizas	65.66 ^{±1.80}	1.68 ^{±1.05}	13.75 ^{±0.66}
% grasa cruda	0.38 ^{±0.05}	0.86 ^{±0.17}	1.24 ^{±0.02}

4.6 Extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantina)

Para la cuantificación de los pigmentos carotenoides (astaxantina) se empleó un estándar de astaxantina de la marca Sigma-Aldrich como se estableció en el inciso 3.5.

En la Figura 23 se observa la curva patrón empleada. A continuación se muestra en la Tabla 17 la cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) extraídos de la harina entera y desmineralizadas con cada una de las extracciones líquido-sólido correspondientes.

En la Figura 24 se aprecia que las harinas enteras (sin tratamiento) presentaron el mayor contenido de astaxantina, seguidos de las desmineralizadas con HCl y con HCOOCH₃. Esto se dió en las 3 condiciones elegidas (harina entera, desmineralizada con HCl y desmineralizada con HCOOCH₃), y con la relación de extracción de 1:75 masa:aceite de soja (m/v).

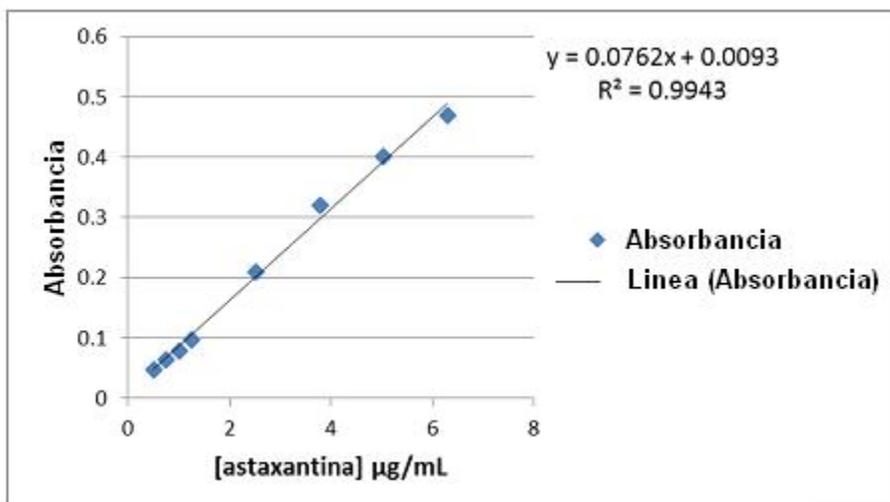


Figura 23. Curva patrón de astaxantina

Tabla 17. Contenido de pigmentos carotenoides (astaxantina) bajo las diferentes condiciones desmineralizantes manejadas

harina/aceite (m/v)	Astaxantina (µg/g de harina)		
	Harina entera	HCl 1 N 1:15 (m/v)	HCOOCH ₃ 12% (v/v)
1:10	24.55 ^{±2.24}	24.52 ^{±3.11}	22.97 ^{±0.79}
1:25	31.27 ^{±3.29}	28.28 ^{±2.84}	21.34 ^{±2.54}
1:50	21.21 ^{±5.08}	15.93 ^{±1.2}	14.27 ^{±2.57}
1:75	72.73 ^{±2.44}	48.18 ^{±5.69}	33.58 ^{±1.54}
1:90	38.36 ^{±0.16}	24.53 ^{±0.08}	19.77 ^{±5.97}

*Cada uno de los valores expuestos son el promedio de tres determinaciones

La mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas), 72.73 µg/g de harina, correspondió a la harina entera (sin tratamiento) siendo aproximadamente del doble de la obtenida de la harina desmineralizada con HCOOCH₃ (33.58 µg/g de harina) y, aproximadamente, un poco más de un tercio de la harina desmineralizada con HCl (24.53 µg/g de harina) con respecto de la harina sin tratamiento. Comparando estos datos con los de la Tabla 3 del Capítulo 2 puede verse lo siguiente: Félix-Valenzuela y colaboradores (2001) usando la misma especie obtuvo 30.53 µg/g de harina; Meyers y Bligh (1981) alcanzaron

rendimientos de 153 $\mu\text{g/g}$ de harina; por su parte, Shahidi y Synowiecki (1991) tuvieron un rendimiento de 119.6 $\mu\text{g/g}$ de harina y, finalmente, Mendoza-Pérez (2014) alcanzó un rendimiento de 184 $\mu\text{g/g}$ de harina. Esto indica que, aunque el rendimiento obtenido no es tan alto como el de Mendoza-Pérez (2014), está en órdenes de magnitud razonables.

En las demás relaciones harina/aceite de soja en donde se realizaron las extracciones no fue evidente la diferencia entre los contenidos de astaxantina por lo que no se discutieron.

Se realizó un análisis de varianza (Tabla 18) que demostró que existe diferencia significativa tanto para el tipo de harina, es decir, harina entera (sin tratamiento), desmineralizada con HCl y HCOOCH_3 , como para las diferentes relaciones de g de harina:mL de aceite de soja utilizadas en esta investigación (1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:90 g/mL).

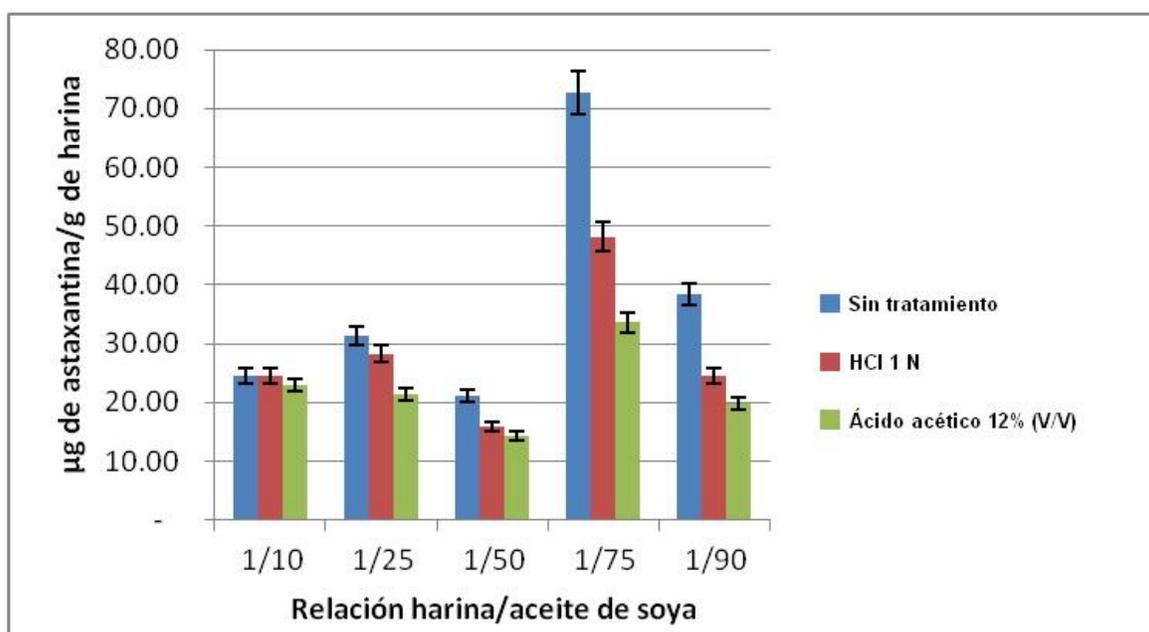


Figura 24. Gráfica referente al contenido de pigmentos carotenoides astaxantina (μg de harina) de las harinas entera y desmineralizadas

Tabla 18. Análisis de varianza para la astaxantina extraída

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de Harina	5317.84	2	2658.92	37.24	0.0000
B: Relación H:A	18019.1	4	4504.77	63.10	0.0000
Interacciones					
AB	41.83.84	8	522.98	7.33	0.0000
RESIDUOS	85.66.99	120	71.9916		
TOTAL (CORREGIDOS)	36087.7	134			

En la Tabla 19 se muestra el análisis de pruebas múltiples de rangos donde se aprecia que no son homogéneos los resultados de las harinas desmineralizadas y en la Figura 25 se puede observar que no existe una relación alguna desde el punto de vista de significancia estadística para este factor.

Tabla 19. Pruebas de múltiple rango para los tipos de harina

Tipo de harina	Casos (total de réplicas)	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Uso de ácido acético	45	22.5117	1.25956	X
Uso de HCl	45	28.5117	1.25956	X
Sin tratamiento	45	37.727	1.25956	X

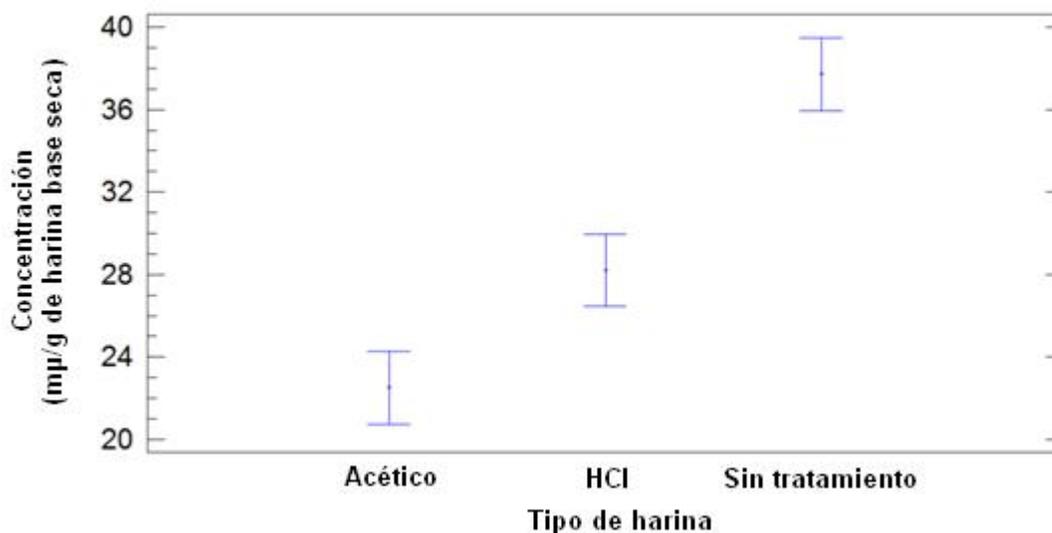


Figura 25. Gráfica de medias para el tipo de harina

Como se puede observar en la Tabla 20 y Figura 26, en lo que respecta a las relaciones de harina:disolvente empleadas sí existen diferencias significativas y en el análisis de prueba múltiple de rangos se muestra que existen 3 relaciones que presentan resultados homogéneos, los cuales corresponden 1:10, 1:25 y 1:90 (m/v) para este factor.

Tabla 20. Pruebas de múltiple rango para relación de harina:disolvente

Relación harina aceite	Casos (total de réplicas)	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
1:50	27	17.2478	1.59121	X
1:10	27	24.1345	1.59121	X
1:25	27	26.9898	1.59121	X
1:90	27	27.7946	1.59121	X
1:75	27	51.6868	1.59121	X

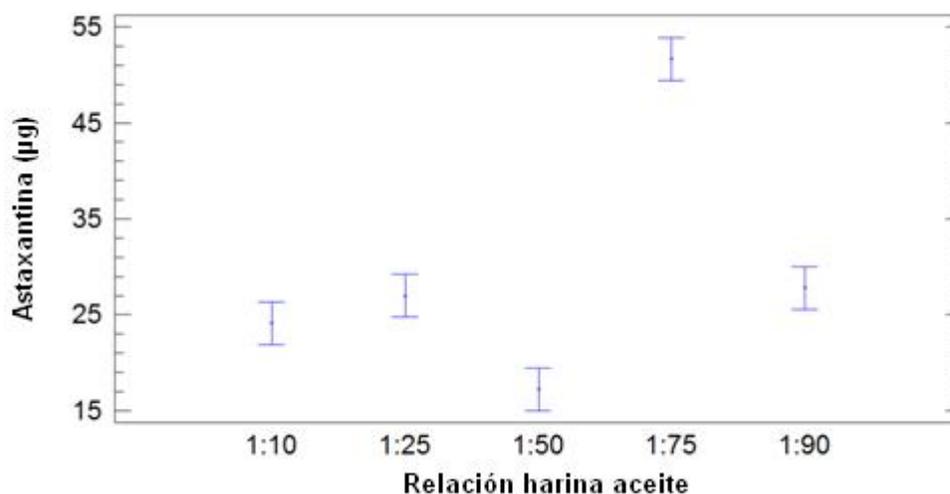


Figura 26. Gráfica de medias para las relaciones de harina:disolvente

4.7 Análisis bromatológico

En la Tabla 21 se aprecian los resultados del análisis bromatológico. En cuanto al contenido de humedad se aprecia que en la harina entera el valor de este porcentaje fue mayor con respecto al de las harinas desmineralizadas, debido a que en la harina entera se realizó un secado y en las demás hubo varios secados adicionales al transformarse en harinas, desmineralizarse y secarse.

En cuanto al % de cenizas, las harinas desmineralizadas con HCl (1.68%) resultaron ser menores que los de las harinas entera y desmineralizada con ácido acético, por lo que este tipo de ácido sí parece ser idóneo para este proceso como ya ha demostrado desde hace muchos años (Muzzarelli, 1977) y que no hay mucha pérdida de pigmento, como cuando se emplea el ácido acético.

En cuanto al contenido de grasa, proteína y fibra resultaron mayores los porcentajes obtenidos en las harinas desmineralizadas con ambos ácidos que con las harinas enteras debido que al momento de retirar un microcomponente como son los minerales, se evita el impedimento estérico de los otros macrocomponentes como son la grasa, la proteína, la fibra (quitina), etc., favoreciendo la extracción de los pigmentos carotenoides (astaxantinas).

Adicionalmente, se aprecian en la Tabla 21 y en la Figura 27 que los resultados obtenidos para las harinas enteras de caparzones y tenazas sin pulpa de jaiba fueron similares a los restos reportados por Morillo y colaboradores (2006) (ver Tabla 22), a pesar de que para esta investigación solamente se utilizaron la mezcla de los fragmentos correspondientes a las tenazas y al cefalotórax.

Tabla 21. Resultados de los análisis bromatológicos

Parámetro (% m/m)	Tipo de harina		
	Entera	Desmineralizada con HCl	Desmineralizada con HCOOCH ₃
Humedad	8.97 ^{±0.34}	2.89 ^{±0.69}	4.90 ^{±1.19}
Cenizas	65.66 ^{±1.80}	1.68 ^{±1.05}	13.75 ^{±0.66}
Grasa	0.38 ^{±0.05}	0.86 ^{±0.17}	1.24 ^{±0.02}
Proteína	2.08 ^{±0.36}	30.11 ^{±0.66}	6.67 ^{±0.22}
Fibra	21.13 ^{±0.27}	53.14 ^{±1.4}	27.14 ^{±1.4}
Hidratos de carbono*	1.78 ^{±0.15}	11.32 ^{±0.05}	46.3 ^{±0.16}

**Tabla 22. Composición bromatológica de residuos de jaiba (m/m)
(Morillo et al., 2006)**

Parámetro (% m/m)	Abdomen	Caparazón	Tenazas
Humedad	5.46 \pm 0.32	5.73 \pm 0.32	5.27 \pm 0.32
Cenizas	29.27 \pm 1.03	37.18 \pm 1.03	53.55 \pm 1.07
Grasa	4.64 \pm 0.35	6.18 \pm 0.35	22.57 \pm 0.53
Proteína	41.76 \pm 0.53	27.37 \pm 0.53	22.57 \pm 0.53
Fibra	NR	NR	NR
Hidratos de carbono*	NR	NR	NR

NR: no reportado

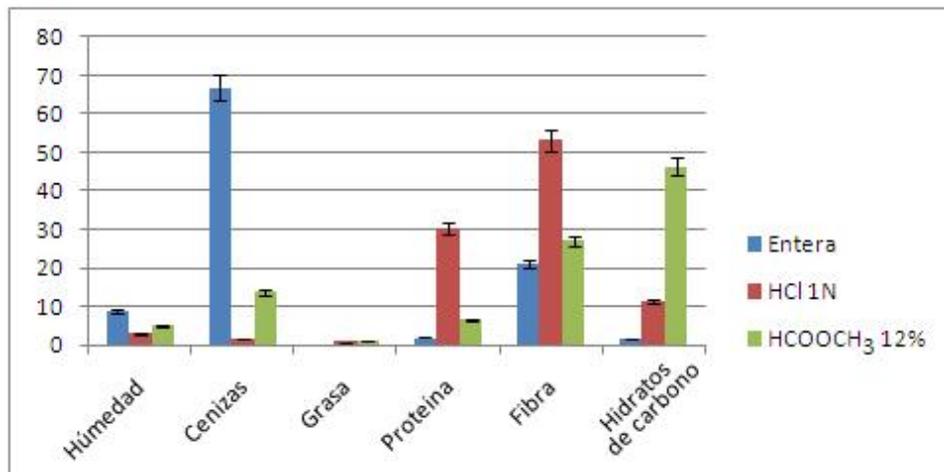


Figura 27. Gráfica de la composición de las harinas analizadas

En lo que respecta al contenido de proteína de la muestra, el valor obtenido por Morillo y colaboradores (2006) del caparazón fue de 27.37% y de las tenazas de 22.57%. Para esta investigación, el % de proteína entera de 2.08% se ve reflejado en el hecho de que la investigación de Morillo y colaboradores fue realizada con restos de crustáceos obtenidos de una planta procesadora, por lo que pudo haber restos de tejidos adheridos y en esta investigación cada fragmento utilizado fue lavado con agua y se le desprendieron todos los residuos de tejido y de membranas adheridas al cefalotórax y a las tenazas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Con base en las dos hipótesis experimentales planteadas al inicio de esta investigación, las cuales fueron: Por medio de una extracción mecánica empleando aceites vegetales comestibles será posible la obtención de pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos de jaibas (*Callinectes sapidus*) y si se lleva a cabo una desmineralización usando un ácido orgánico y uno inorgánico se tendrá una mejor extracción de pigmentos carotenoides (astaxantinas) de los residuos de jaibas (*Callinectes sapidus*), así como en los objetivos general y particulares señalados: Obtener pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de desechos de jaiba empleando tecnologías más limpias mediante una extracción líquido-sólido con aceite de soya como disolvente, conocer las mejores condiciones de desmineralización empleando ácido clorhídrico y ácido acético bajo diferentes concentraciones y relaciones de harina:disolvente, determinar la eficiencia de extracción de los pigmentos carotenoides empleando como disolvente aceite de soya bajo diferentes proporciones de harina:aceite de soya y evaluar los cambios en la composición bromatológica de las harinas debidos a los diferentes tratamientos desmineralizantes, puede concluirse lo siguiente:

- * Para la primera hipótesis, aunque se obtuvo un contenido de pigmentos a partir de las harinas enteras de cefalotórax y de quelas o tenazas de jaibas de 72.73 $\mu\text{g/g}$ de harina, cuando este valor se compara con los rendimientos obtenidos en otras investigaciones (Tabla 3), que fueron de 184, 153 y 119.6 $\mu\text{g/g}$, puede verse que se recuperó una cantidad razonable con respecto a los valores correspondientes a las mismas jaibas, al cangrejo de río y al cangrejo de nieve, respectivamente. Esto es alentador ya que puede continuarse con la investigación para mejorar los rendimientos modificando las condiciones de operación.

- * Para la segunda hipótesis, el uso del ácido inorgánico (HCl) fue mejor que el del ácido orgánico (ácido acético), corroborando lo señalado en la literatura (Muzzarelli, 1977, No et al., 1989), aunque los rendimientos de astaxantina extraídos fueron menores que los obtenidos sin la desmineralización, son ligeramente mejores que los obtenidos por Félix-Valenzuela y colaboradores (2001), que era de 30.53 $\mu\text{g/g}$, quienes usaron HCl 1 N para la desmineralización, ya que en esta investigación se obtuvieron 48.18 $\mu\text{g/g}$ usando HCl y 33.58 $\mu\text{g/g}$ usando el ácido acético al 12% en volumen.
- * Respecto del objetivo general de esta investigación sí se cumplió ya que los extractos oleosos sí tenían una buena proporción de astaxantina como se señaló en la primera conclusión.
- * La concentración de HCl 1 N en una relación de 1:15 (m/v) fue la condición experimental que logró una mayor reducción del porcentaje de cenizas (1.68%). Asimismo, la concentración de HCOOCH_3 al 12% (v/v) en una relación de 1:15 (m/v) fue la condición experimental que logró tener el mayor porcentaje de grasa cruda extraída (1.24%) aunque solamente se pudo desmineralizar para que quedaran 13.75% de cenizas residuales.
- * Dado que la mayor cantidad de astaxantina que se logró extraer de las harinas desmineralizadas con HCl y HCOOCH_3 fue de 48.18 y 33.58 $\mu\text{g/g}$ de harina, respectivamente, que resulta poco favorable si se compara con el contenido de pigmentos obtenidos a partir de las harinas enteras (sin tratamiento), 72.73 $\mu\text{g/g}$ de harina, será recomendable emplear la combinación de ambos ácidos (orgánico e inorgánico) en un estudio posterior con diferentes concentraciones para evaluar si la cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) extraídos se incrementa.
- * La proporción harina:aceite de soya de 1:75 m/v fue la mejor de las cinco estudiadas. A pesar de que las relaciones de harinas a aceite utilizadas también presentan diferencias significativas entre ellas, sí se tienen datos

homogéneos para las relaciones de harina:disolvente correspondientes a 1:10, 1:25 y 1:90.

- * Finalmente, en cuanto al análisis bromatológico, los resultados obtenidos para las harinas enteras de caparazones y tenazas sin pulpa de jaiba fueron relativamente similares a los datos reportados por Morillo y colaboradores (2006), a pesar de que para esta investigación solamente se utilizaron mezclas de los fragmentos correspondientes a las tenazas y al cefalotórax.

5.2. Recomendaciones

Con base en esta investigación se dan las siguientes recomendaciones para continuar con este estudio:

- Se sugiere emplear extracciones con diversos aceites comestibles, como el de girasol, de canola o pescado para la extracción de los pigmentos carotenoides dependiendo del uso final que se le dé a los aceites pigmentados (Tenorio, 2013, Tenorio et al., 2012).
- Para futuras investigaciones se recomienda utilizar otros agentes desmineralizantes como ácido láctico, málico, HCl, en diversas concentraciones para encontrar condiciones óptimas de proceso, especialmente a la luz de su posible uso en dietas para nauplios u otras etapas de crecimiento de camarones (Luna-Rodríguez et al., 2008). Estas mezclas de ácidos orgánicos e inorgánicos deben ser miscibles entre si.
- Es conveniente optimizar las relaciones de harina:disolvente para favorecer las extracciones de los pigmentos carotenoides (astaxantina)
- Finalmente, se recomienda minimizar el tiempo de almacenaje y proceso para la extracción de los pigmentos, ya que la luz y el oxígeno son algunos de los principales factores que deterioran a los carotenoides (astaxantina).

ANEXOS

ANEXO 1

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

A.1.1 Determinación del contenido de cenizas empleando el método de la estufa (DOF, 1978)

Fundamento

Las cenizas son el producto que permanece después de la calcinación e incineración del material orgánico o inorgánico a altas temperaturas (500 a 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 a 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

A.1.2. Método de Goldfish (Nielsen, 2003)

Fundamento

Es una extracción continua con un disolvente orgánico. Éste se calienta, volatiliza para posteriormente condensarse sobre la muestra. El disolvente gotea continuamente a través de la muestra para extraer la grasa. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre la muestra o la grasa removida (Nielsen, 2003).

Procedimiento

Colocar un vaso para Goldfish en la estufa a 100°C hasta masa constante, aproximadamente 2 horas.

Pesar de 4 a 5 g de muestra sobre el papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón. Situar el cartucho en un recipiente con el fondo perforado y colocarlo en el sostenedor del equipo.

Adicionar en el vaso para Goldfish aproximadamente 40 mL del disolvente (éter etílico) y colocarlo en el equipo mediante un anillo de hierro con empaque de hule. Subir la parrilla girando hacia un lado y al contrario. Calentar hasta la extracción completa de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

Al finalizar, cambiar el sostenedor del cartucho por un recipiente sin perforación y calentar de nuevo para recuperar el disolvente del vaso.

Quitar el vaso del equipo y secar el extracto en una estufa a 100°C por 30 minutos, enfriar y pesar.

Calcular el porcentaje de grasa.

Cálculos

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

Donde:

A: Masa del vaso Goldfish con grasa

B: Masa del vaso Goldfish a masa constante

m: Masa de la muestra

A.1.3. 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 bajos las mismas condiciones de secado.

Procedimiento

1. Pesarse de 2 a 3 gramos de muestra en un pesafiltros con tapa (previamente colocado a masa constante 2 h a 130°C)
2. Secar las muestras 2 horas en estufa a 100 a 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

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

Donde:

A: Masa del pesafiltros + muestra húmeda

B: Masa del pesafiltros + muestra seca

m: Masa de la muestra en gramos

A.1.4 Determinación del porcentaje 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 SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato ácido 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 amoniacal 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 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 mL 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 450 cm^3 de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 ó 4 gránulos de zinc, un poco de parafina cuando sea necesario y 50 mL de hidróxido de sodio 6 N.
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 500 mL que contenga 50 mL 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 300 mL.
6. Retirar el matraz receptor y titular el destilado con HCl 0.1 N.

Cálculos

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

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.1.5. 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 gelatinizadas con una α -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 y acetona. El residuo se pesa después de ser secado. La mitad de las muestras se analizan 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.

1. Lavar los crisoles y secar a 525°C durante 1 hora.
2. Añadir 0.5 g 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 250 mL Las muestras no deben diferir en sus masas más de 20 mg. Registrar la masa de cada una de las muestras.
4. Añadir 50 mL de solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de fosfatos a pH de 6 a cada vaso de precipitados

5. Adicionar 0.1 mL de α -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 ± 0.2 añadiendo 10 mL de NaOH 0.275 N. 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 de 50 mg/mL, empleando solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de fosfatos como disolvente. Añadir 0.1 mL 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 a 4.6, para esto añadir 10 mL de HCl ó 0.375 a cada vaso. Verificar el pH, de ser necesario ajustar con NaOH o HCl.
13. A cada uno de los vasos añadir 0.1 mL de amiloglucosidasa
14. 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
15. Añadir 100 mL 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 sus respectivo crisol
17. Lavar el residuo con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etano al 95% y de porciones de 10 mL 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 proteína usando el método de 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_{blanco}-P_{blanco}-A_{blanco}

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

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

ANEXO 2
ACERVO FOTOGRÁFICO



Figura A.2.1 Muestra de quelas frescas



Figura A.2.2 Tratamiento térmico de los cefalotórax



Figura A.2.3 Tratamiento térmico de las quelas



Figura A 2.4 Molienda de los residuos de jaiba y quelas



Figura A.2.5 Harina tamizada



Figura A.2.6 Desmineralizado con HCl 1 N



Figura A.2.7 Filtrado de las harinas desmineralizadas



Figura A.2.8 Secado de las harinas desmineralizadas



Figura A.2.9 Harinas desmineralizadas con HCl 0.5, 1.0 y 1.5 N



Figura A.2.10 Harinas desmineralizadas con HCOOCH_3 8,10 y 12% (m/v)



Figura A.2.11 Calcinación de las harinas



Figura A.2.12 Determinación del contenido de proteína por el método de Kjeldhal



Figura A.2.13 Determinación de % de grasa por el método de Goldfish



Figura A.2.14 Extracción de los pigmentos con aceite de soya



Figura A.2.15 Pigmentos carotenoides (astaxantina) extraídos

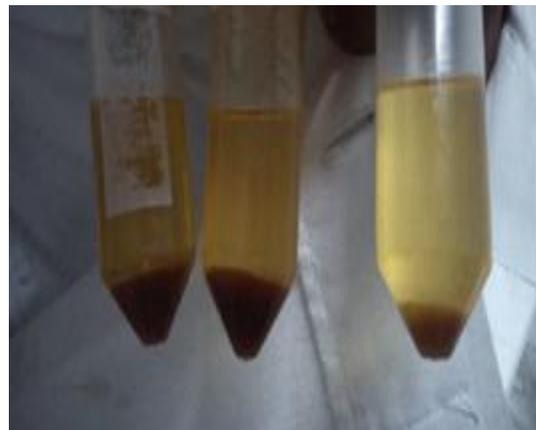
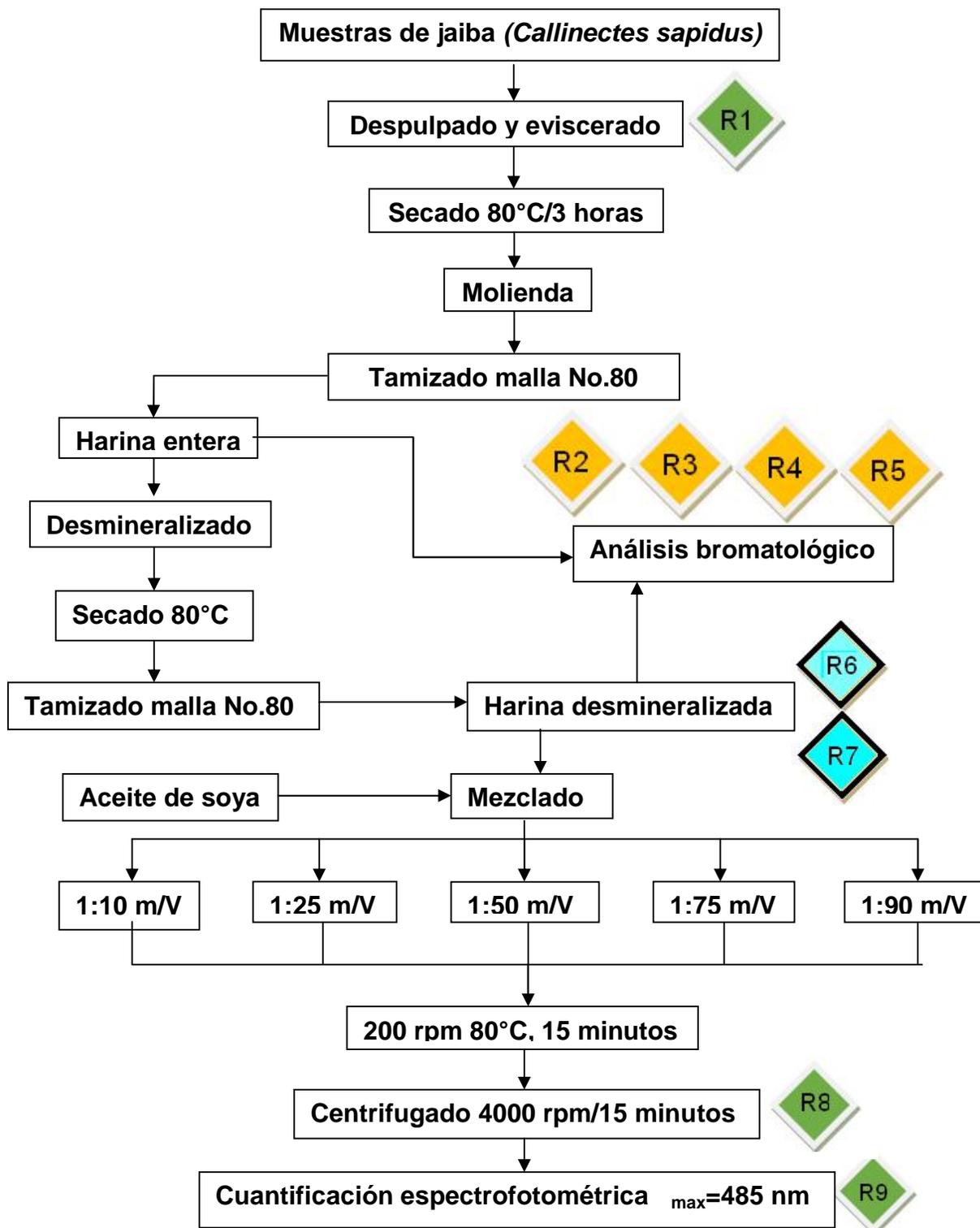


Figura A.2.16 Centrifugado de las muestras

ANEXO 3

DIAGRAMA ECOLÓGICO



R1, R8 y R9: Resíduos orgánicos no peligrosos. Se envían a disposición para producir composta o se desechan de forma adecuada en la basura orgánica.

R2: H_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , 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_3BO_3 , 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 etílico, grasa. Se recupera el éter etílico a través de un equipo de 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 y R7: HCl , NaOH y residuos orgánicos, HCOOCH_3 , NaOH y residuos orgánicos. Se neutraliza la disolución y se desecha en la tarja con otros residuos no peligrosos.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 16a Ed. AOAC, Washington, D.C. EEUU.

Armenta-López, R.E., 2002. Obtención de astaxantina a partir de residuos de camarón fermentados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana Unidades Iztapalapa y Xochimilco.

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

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

Belandria-Briseño, J.C., Morillo-de-Montiel, N.J. (2008). Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista Cubana de Química*. 3:17-26.

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

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

Britton, G., Wessie, R.J., Askin, D., Lugtenburg, J., Conrad, J.P.Y., Merlin, J.-C. 1997. Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins. *Pure and Applied Chemistry*. 69(10):2075-2084.

Cabello, A.M., Martinez, 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.

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.

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

Choubert, G., Heinrich, O. (1993). Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: Assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxantin. *Aquaculture*, 112:217-226.

Comisión de Acuicultura y Pesca, 2012. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2012*. [En línea] (Último acceso el 28 de agosto de 2014). Disponible: www.conapesca.gob.mx

CONAPESCA, 2013. *La Pesca y Acuicultura en Cifras 2013*. Comisión de Acuicultura y Pesca. [En línea] (Último acceso el 28 de agosto de 2014). Disponible: www.conapesca.gob.mx

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, en 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. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Jueves 24 de septiembre de 2009 (Primera Sección).

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.

Escobar, D. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*. 18:260-266.

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

FAO, 2014. Fishery and aquaculture statistics. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Roma. Anuario FAO Estadísticas de pesca y acuicultura 2014. [En línea] (Ultimo acceso 9 de mayo del 2015). Disponible en www.fao.org

Félix-Valenzuela, L., Higuera-Ciapara, I., Goycoolea-Valencia, F. (2001). Supercritical CO₂/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

- 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.
- Gogate, P.R., Nadar, S.G. (2015). Ultrasound-assisted Intensification of extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Indian Chemical Engineer*, pp. 1-16. doi: 10.1080/00194506.2015.1026947.
- Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F. M., Mrejen, S., Cardoso, M. T., Palavra, A. F., Mendes, R.L. (2007). Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*. 101:717-723.
- Guillou, A., Khalil, M., and Adambounou, L., (1995). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of precessed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*., 130: 351-360.
- 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., Ogonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic photoautotrophic cultura. *Journal Applied Phycology*. 13:395-402.
- 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.
- INEGI. 2015. Marco geoestadístico nacional, 2010. Página electrónica: <http://cuentame.inegi.org.mx/territorio/extension/default.aspx?tema=T> (Último acceso el 28 de enero de 2015).

Ishiwara, M. 1980. Thermal reaction of β -carotene. Part 1. *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*. 2:153-161.

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.

Johnson, E.A., An, G.H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11:297-326.

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

Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *J. Food Science*. 45(2):114-122.

Liaaen-Jensen, S., Storebakken, T. 1998. The pigmentation of salmonids 1: Carotenoids. Basel: F. Hoffman-La Roche Brochures, 8.

Luna-Rodríguez, A., Medina-Reyna, C.E., Pedroza-Islas, R., Durán-Domínguez-de-Bazúa, C. 2008. Oleous extraction of carotenoids from shrimp cephalothorax and its effect on a microencapsulated diet with Nauplii larvae. *J. Aq. Food Prod. Technol.* 17(4):367-386.

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

Mendoza-Pérez, S. 2014. Obtención de pigmentos carotenoides a partir de desechos de jaiba (*Callinectes sapidus*). Tesis para obtener el título de Químico de Alimentos, México, D.F.: UNAM, Facultad de Química.

Mendoza-Pérez, S., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. 2015. Astaxantina, un poderoso antioxidante presente en los residuos de crustáceos con potencial nutracéutico. *Industria Alimentaria*. 37(3):32-41. ISSN 0187-7658.

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

Millikin, M.R., Williams, A.B. (1984). Synopsis on biological data on the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbum. NOAA Technical Report NMFS 1. FAO Fisheries Report Synopsis No. 138. Washington DC, EE.UU.

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.

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

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

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.

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

Primo-Yúfera, E. 2007. Química orgánica y aplicada: De la molécula a la industria. Barcelona: Ed. Reverté, 868.

Rao, A.R., Moi, P.S., Ravi, S., Gokare, A. R. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs*, 12:128-152.

Sachindra, N.M., Mahendrakar, N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96:1195-1200.

Schiedt, K., Bischoff, S., Glinz, E. 1993. Metabolism of carotenoids and *in vivo* racemization of (3S, 3'S)-astaxanthin in the crustacean *Penaeus*. En: *Methods in Enzymology*. Volume 214. L. Packer (Ed.). San Diego CA: Academic Press, Inc., pp. 146-166.

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

Shahidi, F., Botta, F. (1994). Seafoods chemistry processing, technology, and quality. Seafood processing by-products. Blackie Academic & Professional. Glasglow, Escocia, pp. 322-323.

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.

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

Tenorio-García, E., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. (2012). Premio a la MEJOR contribución en cartel de la Mesa Redonda de TECNOLOGÍAS MÁS LIMPIAS. Obtención de pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su aplicación en muestras alimenticias / *Carotenoid pigments obtained from cephalothorax shrimp and its application in food samples*. Facultad de Química, UNAM, México. En VII Minisimposium Internacional sobre Remoción de Contaminantes de Agua, Atmósfera y Suelo. Septiembre 12-15, 2012. Xalapa de Enríquez, Veracruz, 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., Tidemann, E., Hansen, F., Raa, J. (1981-1982). 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.

Villalobos-Hiriart, J.L. (1998). Taxonomía de los crustáceos con énfasis en el orden decapoda. Instituto de Biología, UNAM. México D.F. México.

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 on the stability of (all-E) astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8346-8351.