



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO
EMPLEANDO PIGMENTOS CAROTENOIDES
(ASTAXANTINAS) OBTENIDOS A PARTIR DE
CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

(Litopenaeus vannamei)

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

DIEGO ROMERO OLMOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	M en C. Agustín Reyo Herrera
Vocal	M. en A.I. Landy Irene Ramírez Burgos
Secretario	M. en C. Rolando Salvador García Gómez
1er. Suplente	Dra. Marisela Bernal González
2do. Suplente	Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SITIO EN 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 Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE

Diego Romero Olmos

Declaración

“Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria. Con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las citas de, o con referencia a, las obras de otros autores aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante recursos editoriales convencionales”

Diego Romero Olmos

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al personal académico y administrativo de los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, (LIQAYQA) del Conjunto E de la Facultad de Química, por el apoyo otorgado para brindarme un espacio donde realizar ésta tesis experimental, así como las facilidades de materiales, equipos y reactivos empleados en la presente investigación.

Los reactivos, equipos y material de laboratorio empleados en esta investigación fueron parcialmente financiados por el proyecto PAPIIT IN217619 “Efecto del consumo de edulcorantes sobre la actividad de las enzimas reguladoras de la glucólisis y lipogénesis en extractos de hepatocitos y sus implicaciones metabólicas sobre el exceso de masa corporal y la obesidad” para la adquisición de los materiales y reactivos conducentes a la realización de esta tesis.

El apoyo parcial de la Facultad de Química a través del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (PAIP) Claves 50009065 y 50009067, también es reconocido.

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por la dirección de este trabajo.

Al M. en C. Rolando S. García Gómez por su amistad, asesoría y dirección realizada durante la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado por el tiempo invertido para la revisión de este documento, así como también por los comentarios realizados para la mejora del mismo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IV
ABREVIATURAS Y SIGLAS	IX
UNIDADES	XI
RESUMEN	XII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Objetivo general	1
1.3. Objetivos particulares	2
1.4. Hipótesis de trabajo	2
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Importancia del tema	3
2.2. Justificación del tema	3
2.3. Antecedentes	4
2.3.1. Generalidades del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	4
2.3.1.1. Clasificación taxonómica	4
2.3.1.2. Distribución geográfica	4
2.3.1.3. Morfología y descripción visual	4
2.3.1.4. Hábitat	5
2.3.1.5. Alimentación	6
2.3.1.6. Composición química	7
2.3.2. Panorama de la producción mundial y nacional de camarón	6
2.3.2.1. Subproductos del procesamiento del camarón y sus usos	10
2.3.3. Pigmentos carotenoides	11
2.3.3.1. Clasificación de los pigmentos: naturales y sintéticos	11
2.3.3.1.1. Carotenoides: carotenos y xantófilas	13
2.3.3.2. Fuentes de obtención de los pigmentos carotenoides	13
a) Extracción empleando disolventes orgánicos	13

	Página
b) Extracción empleando aceites vegetales comestibles	15
c) Extracción empleando métodos microbiológicos y enzimáticos	15
2.3.3.3. Astaxantina	16
2.3.3.3.1. Funciones bioquímicas de la astaxantina	17
2.3.4. Antioxidantes	19
2.3.4.1. Efecto antioxidante de la astaxantina	20
2.3.5. Oxidación lipídica	20
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	24
3.1 Diagrama de flujo general	24
3.2 Primera etapa: Obtención y acondicionamiento de la muestra	25
3.3 Segunda etapa: Desmineralización y análisis bromatológico	26
3.4 Tercera etapa: Obtención de la curva patrón de astaxantina, cuantificación e identificación de pigmentos carotenoides	26
3.5 Cuarta etapa: Estudios de cinética de reacción del deterioro de lípidos (degradación de pigmentos carotenoides y oxidación lipídica)	28
3.6 Quinta etapa: Elaboración del alimento, evaluación sensorial y análisis estadísticos	28
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Primera etapa: Granulometría y porcentaje de cenizas por tamaño de partícula de la harina de residuos de camarón entera	30
4.2. Segunda etapa: Análisis bromatológico de las harinas de residuos de camarón entera y desmineralizada	31
4.3 Tercera etapa	32
4.3.1. Cuantificación de pigmentos carotenoides	32
4.3.2. Efecto del calentamiento en la oxidación del aceite de soya	36

	Página
4.3.3. Identificación de los pigmentos carotenoides en las harinas de residuos de camarón	37
4.4. Cuarta etapa	39
4.4.1. Degradación de los pigmentos carotenoides	39
4.4.2. Oxidación lipídica	43
4.5. Quinta etapa: Evaluación sensorial	46
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1. Conclusiones	49
5.2. Recomendaciones	50
ANEXO 1. Análisis bromatológico (metodologías empleadas)	51
A.1.1. Determinación de humedad por secado en termobalanza (Kirk, y col., 1996)	51
A.1.2. Determinación de cenizas (Kirk y col., 1996)	51
A.1.3. Determinación de proteína (Método Oficial de la AOAC, 2001)	52
A.1.4. Determinación de grasa bruta por el método Soxhlet (James, 1995)	54
A.1.5. Determinación de fibra dietética total (Sigma, 2002)	55
ANEXO 2. Evaluación sensorial	58
Apéndice 1. Cuestionario de evaluación sensorial	58
Apéndice 2. Resultados de evaluación sensorial	60
Apéndice 3. Análisis de varianza de la evaluación sensorial	66
ANEXO 3. Acervo fotográfico	68
ANEXO 4. Tratamiento de residuos producidos en esta investigación	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA		Página
1	Morfología general del camarón (Pérez y Kensley, 1997)	5
2	Producción de camarón en México (SAGARPA, 2018)	8
3	Exportaciones e importaciones de camarón en México (SAGARPA, 2018)	9
4	Estructura química de los principales carotenoides (Higuera-Ciapara y col., 2006)	14
5	Estereoisómeros de la astaxantina (Higuera-Ciapara y col., 2006)	17
6	Clases de astaxantina y fuentes de obtención (Rao y col., 2014)	18
7	Mecanismo general de la autoxidación lipídica (Baduí-Dergal, 2006)	22
8	Diagrama general para la obtención, cuantificación, caracterización y aplicación de pigmentos carotenoides (astaxantinas)	24-25
9	Comparación de la composición química las harinas de camarón	32
10	Curva de calibración de astaxantina	32
11	Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100mL de aceite)	33
12	Rendimiento obtenido de pigmentos carotenoides(g /kg muestra)	35
13	Cromatoplaqa obtenida bajo luz UV	38
14	Cromatoplaqa obtenida al revelarse con una cámara de yodo	38
15	Gráficos cinéticos de primer orden de la degradación de los pigmentos carotenoides en aceite de soya a diferentes temperaturas	40
16	Gráfico de Arrhenius para la degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya	41
17	Gráficos cinéticos de orden cero de la oxidación lipídica en el aceite de soya sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas	42

FIGURA		Página
18	Gráficos cinéticos de orden cero de la oxidación lipídica en el aceite de soya con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas	43
19	Gráficos de Arrhenius para la oxidación lipídica del aceite sin y con pigmentos carotenoides	46
A2.2.1.	Evaluación de color en la salsa con pigmentos carotenoides	61
A2.2.2.	Evaluación de color en la salsa sin pigmentos carotenoides	61
A2.2.3.	Evaluación de olor en la salsa con pigmentos carotenoides	62
A2.2.4.	Evaluación de olor en la salsa sin pigmentos carotenoides	62
A2.2.5.	Evaluación de textura en la salsa con pigmentos carotenoides	63
A2.2.6.	Evaluación de textura en la salsa sin pigmentos carotenoides	63
A2.2.7.	Evaluación de sabor en la salsa con pigmentos carotenoides	64
A2.2.8.	Evaluación de sabor en la salsa sin pigmentos carotenoides	64
A2.2.9.	Probabilidad de compra de la salsa con pigmentos carotenoides	65
A2.2.10.	Probabilidad de compra de la salsa sin pigmentos carotenoides	65
A.3.1.	Muestra de cabeza de camarón	67
A.3.2.	Cabezas de camarón secas	68
A.3.3.	Molienda de la cabeza de camarón seca	68
A.3.4.	Harina de camarón entera y seca	68
A.3.5.	Harina tamizada de camarón (malla 40, 80 y base)	68
A.3.6.	Determinación de humedad por secado en termobalanza	68
A.3.7.	Determinación de cenizas	68
A.3.8.	Cenizas de muestra de camarón	68
A.3.9.	Desmineralización de harinas con ácido acético glacial	69
A.3.10.	Lavado y filtrado de harina de camarón y harina de camarón desmineralizada	69
A.3.11.	Harina desmineralizada de camarón lavada y secada	69
A.3.12.	Determinación de grasa por el método de Soxhlet	69
A.3.13.	Determinación de proteína por el método de Kjeldahl	69
A.3.14.	Etoxiquin ^{MR} empleado como antioxidante	69

FIGURA		Página
A.3.15.	Estándar de astaxantina ^{MR}	69
A.3.16.	Solución patrón de astaxantina empleado para elaborar la curva patrón	70
A.3.17.	Extracción de los pigmentos carotenoides	70
A.3.18.	Centrifugado de las muestras	70
A.3.19.	Muestra de aceite de soya con pigmentos carotenoides	70
A.3.20.	Muestras de aceite de soya con y sin pigmentos carotenoides	70
A.3.21.	Determinación de fibra dietética	70
A.3.22.	Cuestionario y muestras de salsa evaluadas	70
A.3.23.	Evaluación sensorial preliminar	71
A.3.24.	Evaluación sensorial final	71

TABLA		Página
1	Composición química del camarón <i>L. vannamei</i> (fresco) (Puga-López y col., 2013)	6
2	Composición mineral del camarón <i>L. vannamei</i> (fresco) (Gunalan y col., 2013)	7
3	Producción de camarón en México (SAGARPA, 2018)	9-10
4	Promotores e inhibidores de la oxidación lipídica (Baduí-Dergal, 2006)	21
5	Granulometría y porcentaje de cenizas de la harina de camarón	30
6	Análisis bromatológico de la harina de residuos de camarón	31
7	Concentración de los pigmentos carotenoides (mg/100 mL de aceite) en las muestras de harina de camarón bajo diferentes tratamientos	33
8	Análisis de varianza de 3 factores con interacción para la concentración de pigmentos carotenoides en diferentes muestras de harina de camarón	34
9	Índice de peróxidos del aceite de soya inicial y posterior a calentamiento a 60 y 80°C durante 20 minutos	36

TABLA		Página
10	Factores de retención (Rf) de carotenoides por cromatografía en capa fina (CCF)	37
11	Identificación de pigmentos carotenoides por cromatografía en capa fina (CCF)	38
12	Degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno	39
13	Cinéticas de degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya bajo diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno	40
14	Oxidación lipídica del aceite de soya sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas	43
15	Oxidación lipídica del aceite de soya con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas	44
16	Cinéticas de oxidación lipídica del aceite de soya sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno	44
17	Cinéticas de oxidación lipídica del aceite de soya con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno	45
18	Formulación de la salsa	46
A2.2.1.	Escala hedónica (verbal) de 9 puntos empleada en las evaluaciones sensoriales	60
A2.2.2.	Niveles de agrado promedio obtenidos para cada atributo sensorial en las dos muestras de salsa elaboradas	60
A2.2.3.	Escala de 5 puntos empleada para determinar la probabilidad de compra	60
A2.2.4.	Probabilidad de compra promedio para cada muestra de salsa	60
A2.3.1.	Análisis de varianza (<i>ANOVA en inglés</i>) para el color de las salsas	66

TABLA		Página
A2.3.3.	Análisis de varianza (<i>ANOVA en inglés</i>) para la textura de las salsas	66
A2.3.4.	Análisis de varianza (<i>ANOVA en inglés</i>) para el sabor de las salsas	66
A2.3.5.	Análisis de varianza (<i>ANOVA en inglés</i>) para la probabilidad de compra	67

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AOAC	(Association of Official Analytical Chemists) Siglas en inglés de la Asociación de Químicos Analíticos Estadounidenses quienes desarrollaron los Métodos Oficiales que llevan su nombre
<i>ANOVA</i> (ANDEVA)	Siglas en inglés para referirse al análisis de varianza (analysis of variance)
CCF	Cromatografía en capa fina
Ci, C	Concentración de los pigmentos carotenoides inicial y en un tiempo dado
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
E_a	Energía de activación
<i>FAO</i>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
<i>FDA</i>	Siglas en inglés de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
Fc	Valor absoluto del estudio estadístico
Ft	Valor crítico del diseño estadístico

H_1	Hipótesis donde existe diferencia significativa ($F_{calculada} > F_{crítica}$)
H_0	Hipótesis donde no existe diferencia significativa ($F_{calculada} < F_{crítica}$)
IP	Índice de peróxidos
K	Constante de velocidad de oxidación
LMP	Límite máximo permisible
LIQyQA	Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental
M_1	Aceite de soya sin pigmentos carotenoides,
M_2	Aceite de soya con pigmentos carotenoides
NMX	Norma Mexicana
P_c	Pigmentos carotenoides
R^2	Coefficiente de correlación
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
R_f	Factor de retardo, por sus siglas en inglés
Ups	Unidades prácticas de salinidad

UNIDADES

°C	Grados Celsius
% v/v	Porcentaje representado como una proporción volumen con respecto a volumen
% m/v	Porcentaje representado como una proporción masa con respecto a volumen
g/kg	Concentración de pigmentos carotenoides expresada como un rendimiento (gramos por cada kilogramo de muestra)
meq/kg	Índice de peróxidos expresado como miliequivalentes de tiosulfato por cada kilogramo de aceite
mg/100 mL	Concentración de pigmentos carotenoides expresada como miligramos por cada 100 mL de aceite
rpm	Revoluciones por minuto

Nota: Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Resumen

La captura de crustáceos en México, en especial del camarón, (*Litopenaeus vannamei*) ha mostrado un constante crecimiento a través de los años debido a su demanda nacional e internacional. Al separar los cefalotórax y exoesqueletos del resto del cuerpo del crustáceo se generan subproductos que, cuando no son reaprovechados y no se disponen de manera adecuada, ocasionan una fuente de contaminación. Entre los subproductos de valor de estos crustáceos sobresalen las proteínas, la quitina y los pigmentos carotenoides. En particular, estos últimos son de un gran interés debido a la tendencia mundial en el uso de pigmentos naturales. En esta investigación se extrajeron pigmentos carotenoides (astaxantinas), provenientes del cefalotórax de camarón, para que tras las operaciones unitarias de lavado, secado, molienda y tamizado se obtuviera harina entera. Esta harina después de un proceso de desmineralización empleando ácido acético al 8% v/v fue secada y puesta en frascos de vidrio color ámbar, para su resguardo. El diseño experimental fue de tipo multifactorial, teniéndose tres factores: a) el tipo de harina (entera y desmineralizada), b) las temperaturas de extracción (temperatura ambiente, 60 y 80°C) y c) la relación harina:aceite (1:10 y 1:30). Posteriormente, se identificaron los compuestos carotenoides presentes en las harinas de camarón por medio de una cromatografía en capa fina (*TLC*, por sus siglas en inglés). Se encontraron cinco pigmentos carotenoides distintos en las muestras de harina entera y desmineralizada (luteína, astaxantina libre, cantaxantina, monoéster de astaxantina y β -caroteno). Por otro lado, se evaluó la degradación lipídica del aceite de soya con y sin pigmentos, almacenándose ambas muestras bajo tres temperaturas diferentes (4, 25 y 35°C). Se determinaron cada semana, durante un mes, el índice de peróxidos y el contenido de pigmentos carotenoides con el objetivo de evaluar el orden de reacción (para la oxidación de lípidos y la degradación de los pigmentos carotenoides) y, así, obtener información a partir de sus cinéticas de reacción: la energía de activación, la velocidad de oxidación, el tiempo de vida media y el tiempo de oxidación. Finalmente, empleando el aceite se elaboraron dos muestras de salsa de chile de árbol con la finalidad de determinar mediante una evaluación sensorial empleando jueces no entrenados, la existencia de diferencias sensoriales entre los dos tipos de salsas, usando el aceite con y sin pigmentos y, evaluándose su nivel de aceptabilidad. De las 101 pruebas sensoriales realizadas, se encontraron que, al evaluar los atributos de color, olor, textura y sabor, no existieron diferencias significativas a una $p \geq \alpha$ de 0.05 entre estos atributos. El nivel de agrado promedio para estos atributos resultó prácticamente el mismo en todas las muestras. Al evaluar la probabilidad de compra, entre una salsa y otra, también resultó que no había alguna diferencia significativa, por lo que resulta factible la adición de los pigmentos en alimentos de este tipo para aumentar su valor nutracéutico, confiriéndoles opciones de compra a los consumidores para mejorar su salud.

Palabras clave: Obtención de pigmentos carotenoides (astaxantinas), caroteno-proteína, cefalotórax y exoesqueleto de camarón, extracción sólido-líquido, oxidación lipídica.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

De acuerdo con datos de la SAGARPA (2018), México se encuentra ubicado como el séptimo país a nivel de producción de camarón, siendo Sinaloa, Sonora y Nayarit los estados con una mayor producción (CONAPESCA, 2017), alcanzando en el 2017, un volumen de producción de 228 mil toneladas (SAGARPA, 2018).

La fracción no comestible del camarón (conocida una parte como cabeza o cefalotórax y la otra como cáscaras o exoesqueletos) no es aprovechada por los consumidores y, frecuentemente, es arrojada en altamar, puertos y tiraderos municipales, generando problemas de contaminación por la gran cantidad de materia orgánica depositada en esos sitios. No obstante, el cefalotórax de camarón es un subproducto aprovechable por su alto contenido de proteínas, quitina y pigmentos carotenoides (Higuera-Ciapara y col., 2006).

Actualmente, existe un gran mercado en aquellos consumidores que prefieren evitar productos con aditivos alimentarios sintéticos, prefiriendo en su lugar, alimentos elaborados con aditivos naturales. Los alimentos, desde el inicio de su producción hasta su consumo, son expuestos a diversas condiciones que pueden generar cambios en sus propiedades. Destacan entre ellas su olor, color y sabor, cambios nutrimentales y funcionales y/o producir ciertas enfermedades debido a la acumulación de compuestos dañinos.

Por ello, en este estudio, se propuso aprovechar los restos no comestibles del camarón, con el objetivo de extraer pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando un aceite vegetal comestible (aceite de soya) para proceder a su incorporación en algún alimento de consumo humano (salsa de chile de árbol con cacahuete) para que, de esta forma, sean aprovechadas sus características antioxidantes, permitiendo aumentar su valor nutrimental. De esta manera, se plantearon los siguientes objetivos particulares enmarcados dentro de un objetivo general.

1.2. Objetivo general

Obtener pigmentos carotenoides (astaxantinas) a partir de desechos de camarón mediante una extracción sólido-líquido con aceite de soya comestible como vehículo para adicionarse en un alimento.

1.3. Objetivos particulares

- Obtener harina a partir de subproductos de cefalotórax de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei*, conocido como camarón patiblanco, tras realizar las operaciones unitarias de lavado, secado, molienda y tamizado.
- Optimizar la extracción de pigmentos carotenoides, a través de un proceso de desmineralización de la harina de camarón con ácido acético glacial al 8% v/v en una relación harina-agente desmineralizante de 1 a 9.
- Evaluar los cambios en la composición bromatológica de las muestras de harina de camarón debido al proceso de desmineralización.
- Determinar el mejor método de extracción empleando 3 variables: tipo de harina (entera y desmineralizada), relación harina:aceite (1:10 y 1:30) y temperatura de extracción (temperatura ambiente, 60 y 80°C).
- Obtener la cinética y orden de reacción de la oxidación de lípidos y la degradación de los pigmentos carotenoides.
- Identificar algunos de los pigmentos carotenoides presentes mediante una cromatografía en capa fina.
- Elaborar un alimento funcional con el aceite de soya pigmentado (salsa) y llevar a cabo una evaluación sensorial mediante jueces no entrenados para determinar su aceptabilidad.

1.4. Hipótesis de trabajo

Partiendo del cefalotórax de camarón (*Litopenaeus vannamei*) se obtendrán pigmentos carotenoides (astaxantinas) empleando un aceite vegetal comestible para su incorporación en un alimento que mejoren las características antioxidantes del aceite.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia del tema

A pesar del éxito de la industria camaronera y su notable crecimiento alrededor del mundo, la gran cantidad de subproductos generados se han convertido en un problema económico y ambiental. Es por ello, que la industria ha sido objeto de críticas por parte de ambientalistas y científicos (Espinosa y Bermúdez, 2012). Los subproductos de crustáceos son generados durante las operaciones de procesamiento, así como en la obtención o acondicionamiento de las porciones comestibles de cangrejos, langostas, camarones, etc. Generalmente estos subproductos contienen sales minerales (15-35%), proteínas (25-50%), quitina (25-35%), lípidos y pigmentos.

La generación de subproductos de camarón es enorme si se compara con el porcentaje que se comercializa mundialmente. En la actualidad, son producidos alrededor de 6 millones 400 mil toneladas de camarón entero, mismas que equivalen a 4 millones 160 mil toneladas de camarón sin cabeza (2 millones 240 mil toneladas corresponden a desechos de cabeza de camarón que pueden reutilizarse en otros subproductos, es decir, en un 35%) (FIRA, 2009). Muchos de ellos son empleados para elaborar concentrados proteínicos y ser utilizados como piensos. Sin embargo, la gran mayoría de las industrias desechan estos residuos sin ningún tipo de uso tecnológico (Mendes y col., 2013).

Por ello, en esta investigación se decidió emplear estos subproductos y darles un uso viable al adicionarlos dentro de un alimento de gran aceptación nacional e internacional (una salsa mexicana) confiriéndole un valor adicional al alimento al agregarse pigmentos carotenoides (astaxantinas) que sirven como antioxidantes y, que para su adquisición, se parte de una materia prima que es un subproducto de la industria acuícola, que posee un alto valor agregado (Meléndez-Martínez y col., 2007).

2.2. Justificación del tema

Actualmente existe muy poca investigación en el desarrollo de tecnologías que permitan aprovechar los subproductos generados por la industria alimentaria y, para el caso del desarrollo de este trabajo, la industria camaronera (Mendes y col., 2013). Debido a esto, es necesario crear nuevos productos alimenticios sustituyendo los aditivos químicos

alimentarios, por aditivos naturales que aporten un beneficio nutracéutico, tanto al producto como al consumidor que lo adquiera. Para realizar lo anterior, se partió de cefalotórax de camarón, mejor conocida como “cabeza de camarón”. Pueden aprovecharse de este subproducto componentes como la quitina, las proteínas y los pigmentos carotenoides, siendo estos últimos, el objetivo de este estudio. El cefalotórax de camarón posee una gran cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) con gran poder antioxidante, la cual llega a ser mucho mayor al poder antioxidante de la vitamina E, y diez veces mayor a la de otros carotenoides (Yang y col., 2015).

2.3. Antecedentes

2.3.1. Generalidades del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

2.3.1.1. Clasificación taxonómica

El camarón blanco *L. vannamei* es un invertebrado marino que se encuentra agrupado dentro del Phylum *Arthropoda* (artrópodos), Familia *Penaeidae* y perteneciente al género *Litopenaeus*. Se caracteriza por poseer un exoesqueleto compuesto de quitina y un tronco compuesto de catorce segmentos más el telson (Magaña, 2018).

2.3.1.2. Distribución geográfica

La especie *L. vannamei* es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico; desde Sonora (México) hasta Tumbes (Perú) (DOF, 2018). Principalmente, se presenta en casi todos los países con salida al Océano Pacífico, aunque en algunos países la especie ha sido introducida con el paso del tiempo, principalmente a países asiáticos, mientras que en la mayoría de los países de América central la especie es nativa.

2.3.1.3. Morfología y descripción visual

De cuerpo alargado, dividido en cefalotórax (rostro, antena, anténulas y periópodos), abdomen (seis segmentos abdominales y pleópodos) y cola (telson y urópodos), de color blanco translúcido con tonos gris-azulados. Tienen antenas, periópodos (patas delanteras) y urópodos (cola) pigmentados de color rojizo; el cual se intensifica, por acción del calor, al hidrolizar el complejo caroteno-proteína. Rostro moderadamente largo con siete a diez dientes dorsales y de dos a cuatro dientes ventrales. Aunque pueden encontrarse variaciones

en el color debido a deficiencias nutricionales. Las patas de *L. vannamei* pueden aparecer frecuentemente blancas, de ahí su nombre común en inglés white-legged shrimp castellanizado a camarón “patiblanco” o camarón blanco del Pacífico (DOF, 2018; Eldred y Hutton, 1960).

En la Figura 1 se muestra la forma general del cuerpo del camarón y sus diferentes partes.

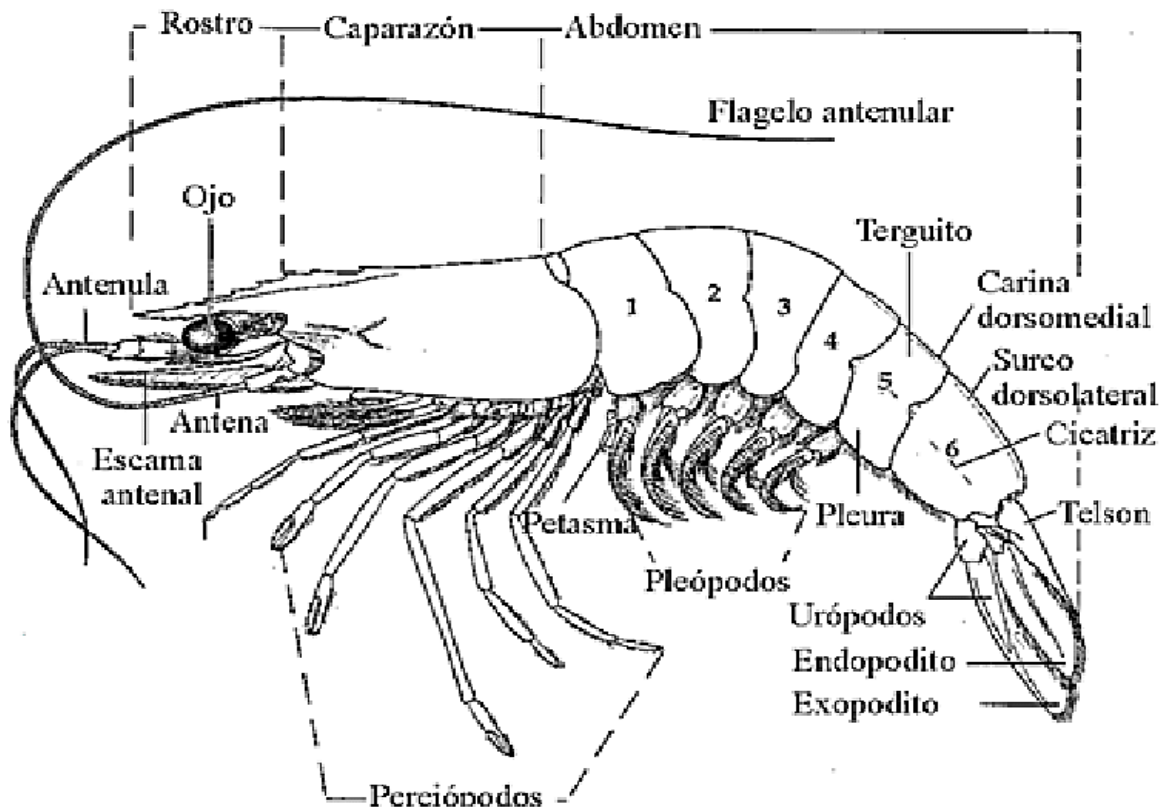


Figura 1. Morfología general del camarón (Pérez y Kensley, 1997)

2.3.1.4. Hábitat

Los camarones son uno de los animales que mejor se adaptan a todo tipo de cambios en su hábitat, desde alteraciones drásticas en la salinidad, la temperatura o proporción de compuestos nitrogenados del agua (SAGARPA, 2018).

Normalmente se encuentran en sistemas marinos con temperatura media anual de 20°C, pudiendo desarrollarse en aguas dulces o saladas. Pueden tolerar un intervalo de salinidad entre 5-40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups. Los adultos

viven en ambientes marinos tropicales y subtropicales con fondos arenosos, mientras que las postlarvas pasan la etapa juvenil y pre-adulta en estuarios y lagunas costeras (DOF, 2018). En su estado adulto viven en mar abierto, donde se reproducen y alcanzan una talla de entre 15 y 20 cm de largo (Torres, 2007).

Las características geográficas adecuadas para la pesca de camarón son: profundidades de 0 a 200 metros, pH de 7 a 9, temperaturas de 20 a 35°C, oxígeno disuelto 4 a 10 mg/L y salinidad de 5 a 35 ups (SAGARPA, 2018).

2.3.1.5. Alimentación

La alimentación de los crustáceos, como lo es el camarón, se comprende principalmente de fitoplancton: microalgas, cianobacterias y otros organismos autótrofos; en el cual el cloroplasto de manera autónoma es capaz de sintetizar carotenoides (Young y Britton, 1993), derivándose de ahí su característico color que puede ir de tonalidades rojizas a naranjas.

2.3.1.6. Composición química

En las Tablas 1 y 2 se aprecia la composición química (Puga-López y col., 2013) y la composición mineral (Gunalan y col., 2013) de la carne fresca de camarón de la especie *L. vannamei*.

Tabla 1. Composición química del camarón *L. vannamei* (fresco) (Puga-López y col., 2013)

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	73.65 ± 0.98
Proteína	20.01 ± 0.72
Cenizas	2.21 ± 1.01
Grasa cruda	1.31 ± 0.35

2.3.2. Panorama de la producción mundial y nacional de camarón

Actualmente, los camarones y las gambas son productos ampliamente comercializados y constituyen el segundo grupo principal de especies exportadas en términos de valor. El porcentaje de producción más elevado se registra con diferencia en los países de América Latina, Asia oriental y sudoriental, pero gran parte del consumo tiene lugar en los mercados

desarrollados. Aunque las capturas de camarón salvaje contribuyen con grandes volúmenes del suministro total, actualmente la mayor parte de los camarones son cultivados. Tal es el caso de la especie *L. vannamei* (FAO, 2018).

Tabla 2. Composición mineral del camarón *L. vannamei* (fresco) (Gunalan y col., 2013)

Minerales	Contenido (mg/g)
Calcio (Ca)	154.5
Magnesio (Mg)	13.41
Sodio (Na)	67.7
Potasio (K)	56.7
Fósforo (P)	6.98
Manganeso (Mn)	0.898
Hierro (Fe)	4.54
Cobre (Cu)	En trazas
Cromo (Cr)	En trazas

La demanda en los países de desarrollo sigue creciendo debido a que las preferencias de los consumidores han evolucionado como consecuencia del aumento de los ingresos y los mercados nacionales y regionales absorben un porcentaje de la producción cada vez mayor. Los precios comerciales de los camarones y las gambas han aumentado a lo largo de los dos últimos años en consonancia con la tendencia general (FAO, 2018).

La familia de los penaidos incluye las especies marinas comerciales más valiosas de camarón y representa al menos el 95% de la producción total de camarón de los países con salida al Océano Pacífico. La producción de la acuicultura continental comprende algunas especies de camarones marinos, como lo es el camarón patiblanco (*L. vannamei*), que pueden crecer en agua dulce o en aguas continentales salino-alcálinas después de una fase de aclimatación.

Dentro del grupo de los crustáceos, la especie *L. vannamei* es la que se produce más en la acuicultura mundial, representando un 53% de la pesca de crustáceos. Del 2012 hasta el 2016, la especie *L. vannamei* ha mostrado un incremento del 35.32% en su producción. En el 2012, la producción anual fue 2,688 toneladas, mientras que en el 2016 fue de 4,156 toneladas (FAO, 2018).

En el comercio mundial de pescados y productos pesqueros, los camarones y las gambas se ubican en el tercer lugar del valor comercial de esta industria con un 16.1%, en cuanto al porcentaje en cantidad, este grupo, ocupa el sexto lugar con un 6.2%. La producción mundial de camarón ha presentado un notable incremento del 71.43% en los últimos 45 años. En 1970 la producción mundial reportada fue de aproximadamente 1 millón de toneladas, mientras que en el 2016, fue de 3.5 millones de toneladas (FAO, 2018). Actualmente China se ubica en el primer lugar de producción de camarón a nivel mundial, aportando un 40% de la producción mundial con 2.7 millones de toneladas anuales. En México, el principal camarón cultivado es el camarón blanco *L. vannamei*, aunque otras especies de camarón son también cultivadas, tales como es el camarón azul *L. stylirostris* y el camarón café *Farfantepenaeus californienses*, pero en menor proporción (Puga-López y col., 2013).

México es el séptimo productor de camarón a nivel mundial, reportando una producción en el 2017 de 228 mil toneladas (Figura 2), la cual representa aproximadamente un 5% de la producción mundial de camarón (SAGARPA, 2018).

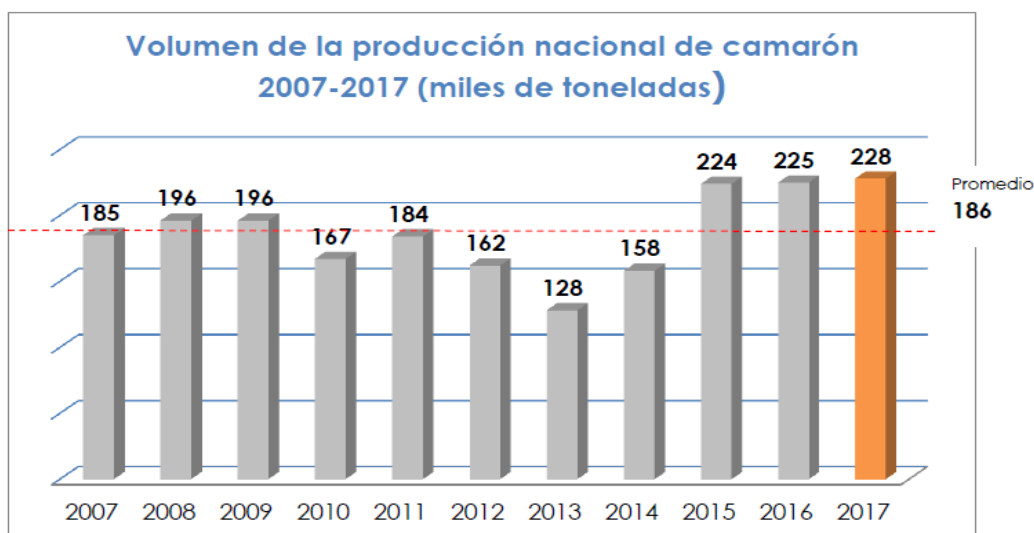


Figura 2. Producción de camarón en México (SAGARPA, 2018)

Derivado de un aumento en la producción nacional de camarón, desde el 2014, las importaciones han presentado una notable disminución, mientras que las exportaciones han ido en incremento desde el 2012 (Figura 3). El camarón se encuentra en el primer lugar de las especies pesqueras, siendo Estados Unidos, Vietnam y Francia los principales destinos de exportación (SAGARPA, 2018).

Evolución del comercio exterior (millones de dólares)

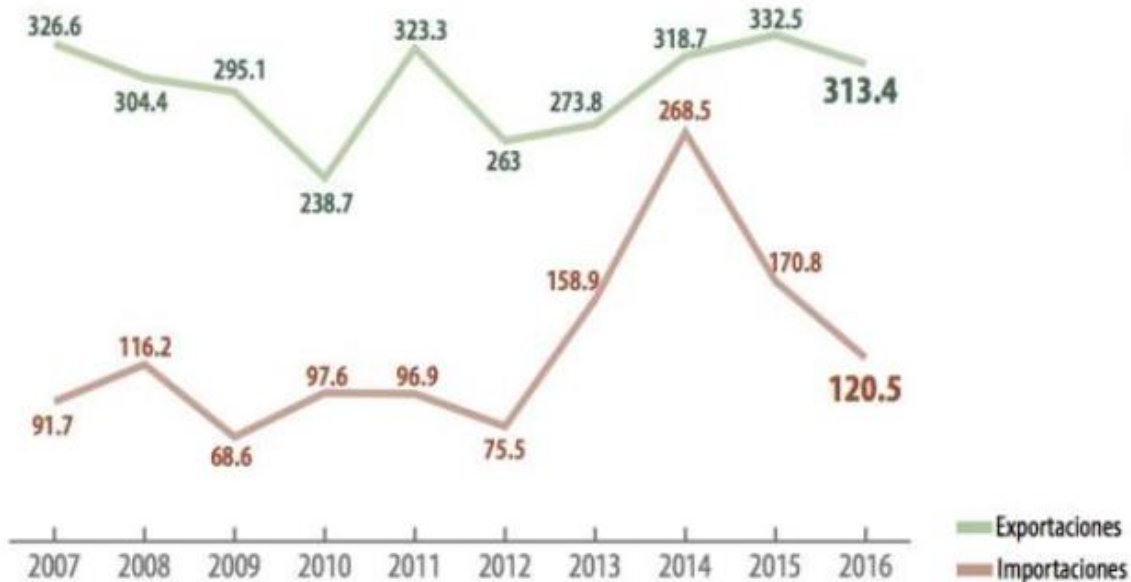


Figura 3. Exportaciones e importaciones de camarón en México (SAGARPA, 2018)

De acuerdo con la SAGARPA (2018), el camarón por su volumen se encuentra posicionado en el segundo lugar de la producción pesquera en México, con una participación en la producción pesquera del 12.8%; sin embargo, por su valor, se encuentra en el primer lugar. En México, la producción de camarón ha aumentado del 2007 al 2017 en un 18.86%, con una tasa de crecimiento anual del 1.67% (Figura 2). Esta producción se ve concentrada en tres estados (Tabla 3), siendo Sinaloa, Sonora y Nayarit los principales productores con un 37, 36.5 y un 9% de participación en el mercado, respectivamente, representando, entre los tres, un 82% de la producción anual (CONAPESCA, 2017).

Tabla 3. Producción de camarón en México (SAGARPA, 2018)

Lugar	Entidad federativa	Producción (toneladas)
1	Sinaloa	99,296
2	Sonora	67,084
3	Nayarit	17,661
4	Tamaulipas	14,185
5	Baja California Sur	10,816
6	Campeche	4,976
7	Colima	3,532

Lugar	Entidad federativa	Producción (toneladas)
8	Veracruz	3,365
9	Oaxaca	1,508
10	Chiapas	1,405
	Resto	1,244
	Total nacional	225,073

2.3.2.1. Subproductos del procesamiento del camarón y sus usos

La parte comestible del camarón representa aproximadamente el 50%, siendo la parte restante correspondiente al cefalotórax (cabeza), la cual incluye el exoesqueleto, las patas, las antenas, los ojos y la cola. Durante su procesamiento son eliminadas, conservándose aproximadamente un 15% de la parte no comestible. La generación de subproductos de camarón es grande, si es comparado con el porcentaje que se comercializa. Se estima que en el mundo se producen alrededor de 6.4 millones de toneladas de camarón entero, mismas que equivalen a 4.2 millones de toneladas de camarón sin cabeza; correspondiendo, 2.2 millones de toneladas de desechos de cabezas de camarón, lo cual representa un 35% (FIRA, 2009).

Estos desechos generan desperdicios que contaminan (en el caso de las granjas camaroneras y/o de los centros de distribución que reciben camarones completos y los descabezan), lo cual ocasiona contaminación de materia orgánica y la proliferación de fauna nociva. En aguas internacionales, la preocupación es mayor debido al aumento de materia orgánica en suspensión; lo cual a su vez ocasiona el aumento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), limitando la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y, a la larga, provocando la muerte de especies marinas dándose el proceso de contaminación conocido como eutrofización (No y Meyers, 1992).

Los subproductos de los crustáceos y, en particular, de la industria camaronera son aprovechables por sus altos contenidos de proteínas, lípidos, quitina y pigmentos, los cuales resultan ser útiles para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Knorr, 1991; Mandeville y col., 1991; Mathur y Narang, 1990; Seymour y col., 1996).

A partir de los subproductos de camarón, es posible procesarlos para la producción de harinas que contienen aproximadamente entre un 40 a 45% de proteína cruda y un 5% de humedad después de pasar por las operaciones unitarias de cocción, secado y molienda. Por

otra parte, la quitina y su derivado desacetilado (la quitosana) han sido extraídos de cefalotórax de crustáceos a nivel comercial en América del Norte. Se ha sugerido que el clorhidrato de glucosamina, puede derivarse de los caparazones de crustáceos, lo cual se traduce en una fuente comercial de glucosamina (FAO, 2018).

2.3.3. Pigmentos carotenoides

Según la *FDA* (Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos por *Food and Drug Administration* en inglés), un aditivo alimentario, es un material que se añade de manera intencionada, por lo general, en cantidades pequeñas a otra sustancia, para mejorar su apariencia, sabor, color o estabilidad. De acuerdo con la misma agencia, un pigmento es cualquier material que imparte color a otra sustancia obtenida por fuentes químicas o biológicas, ya sea extraída o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad, a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que, cuando es añadida, o aplicada a alimentos, medicamentos o cosméticos, es capaz de impartirle color por sí misma (Baduí-Dergal, 2006).

La coloración característica de los crustáceos es gracias al fitoplancton (microalgas, cianobacterias y organismos autótrofos) que consumen ya que los crustáceos (y particularmente el camarón), al percibir de estos organismos su alimento base, adquieren con el tiempo en su cubierta una coloración rojiza-naranja después de asimilarla en su estructura. En los crustáceos, el pigmento carotenoide encontrado en mayor proporción es la “astaxantina”, siendo la microalga *Haematococcus pluvialis* la fuente principal de este pigmento. En el camarón, los pigmentos carotenoides se presentan en forma de lipocromos solubles, unidos por medio de enlaces proteicos. De acuerdo con Hidalgo-Zambrano (1997), la hidrólisis de estos compuestos libera un pigmento rojo, al que se le llamó zooeritrina y, que posteriormente, adquirió el nombre de astaxantina.

2.3.3.1 Clasificación de los pigmentos: naturales y sintéticos

Entre la clasificación más común de los pigmentos se encuentra la de los colorantes naturales y los sintéticos, aportando entre un 47% y un 53% respectivamente a las ventas mundiales.

a) Colorantes sintéticos. Los colorantes sintéticos requieren de una certificación extra para su comercialización e incluyen sustancias químicas sintetizadas con alto grado de pureza, mientras que los colorantes naturales son generados por microorganismos, plantas, minerales y animales. Entre la principal clasificación de los colorantes se encuentran:

- ✓ Azoicos: su estructura química es mono, di o triazo. Producen casi toda la gama de colores, caracterizándose por tener un grupo cromóforo Azo ($-N=N-$).
- ✓ Antraquinonas: su estructura es uno o más grupos carboxilo y un sistema de anillos conjugados, contando con al menos tres anillos conjugados.

Debido a la preocupación por la seguridad en el uso de los pigmentos sintéticos, éstos han sido estudiados exhaustivamente respecto con sus efectos hacia la salud. Aunque a la mayoría se les han atribuido daños en el comportamiento conductual de los niños, este hecho no se ha comprobado, pero aún queda duda sobre su posible participación en otras alteraciones hacia la salud (Baduí-Dergal, 2006).

Por esto, se ha reducido cada vez más su uso en alimentos, aunque los aspectos de legislación varían ampliamente entre bloques comerciales y países dentro de cada bloque (Baduí-Dergal, 2006).

b) Colorantes naturales. Los colorantes naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen. Aunque hay colorantes poco comunes, como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en seis categorías (Baduí-Dergal, 2006):

1. Carotenoides
2. Clorofilas
3. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos
4. Betalaínas
5. Hemopigmentos
6. Otros pigmentos naturales

En este estudio solamente se hará mención del grupo de los carotenos, debido a que son los pigmentos de interés que forman parte del cefalotórax de camarón.

2.3.3.1.1. Carotenoides: carotenos y xantófilas

De acuerdo con Baduí-Dergal (2006), químicamente, los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, los cuales son sus derivados oxigenados. La mayoría de ellos son hidrocarburos de 40 átomos de carbono, los cuales contienen dos sistemas de anillos terminales unidos a una cadena conjugada de dobles enlaces o un sistema polieno. De manera general, los carotenos están compuestos únicamente de carbono e hidrógeno; y las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenoides. En los últimos, el oxígeno puede presentarse como grupos OH (zeaxantina), o como oxi-grupos (cantaxantina); o como una combinación de ambos (astaxantina) (Higuera-Ciajara y col., 2006).

El sistema polieno le proporciona a los carotenoides su distintiva estructura molecular, sus propiedades químicas y sus características de absorción de la luz. Cada doble enlace del sistema polieno puede existir en dos configuraciones distintas; como isómeros geométricos cis o trans. Debido a que los isómeros geométricos cis son termodinámicamente menos estables, en la naturaleza, la gran mayoría de los carotenoides, se encuentran como isómeros geométricos trans (Young y Britton, 1993) (Figura 4).

Tanto los carotenoides como las xantofilas se encuentran unidas a otras moléculas a través de enlaces ésteres (Shahidi y Brown, 1998). Estos complejos (caroteno-proteína) cambian de coloración si se les proporciona calor debido a la desnaturalización de las proteínas, liberando el pigmento asociado a ella y exponiendo su coloración roja-anaranjada característica.

2.3.3.2. Fuentes de obtención de los pigmentos carotenoides

a) Extracción empleando disolventes orgánicos

La extracción de pigmentos de crustáceos se puede llevar a cabo a través de disolventes orgánicos (Muzarelli, 1977). Diversos autores han reportado múltiples condiciones para su extracción, las cuales se describen a continuación.

Muzarelli (1977) menciona que es posible recuperar estos pigmentos a partir del material quitinoso de crustáceos utilizando disolventes y/o agentes desnaturalizantes de proteínas, después de un proceso de descalcificación (desmineralizado). El ácido cítrico acuoso, las sales del ácido etilendiamino tetracético (*EDTA*) y el ácido clorhídrico disuelven el

carbonato de calcio, pero dejan todos los pigmentos firmemente asociados con la quitina. Los pigmentos en el caparazón descalcificado se extraen con acetona o etanol y con ácido acético tibio. Por otro lado, Takeungwongtrakul y col. (2013), emplearon isopropanol, acetona y hexano, además de mezclas con diferentes proporciones para la extracción de pigmentos a partir del hepatopáncreas de *L. vannamei*.

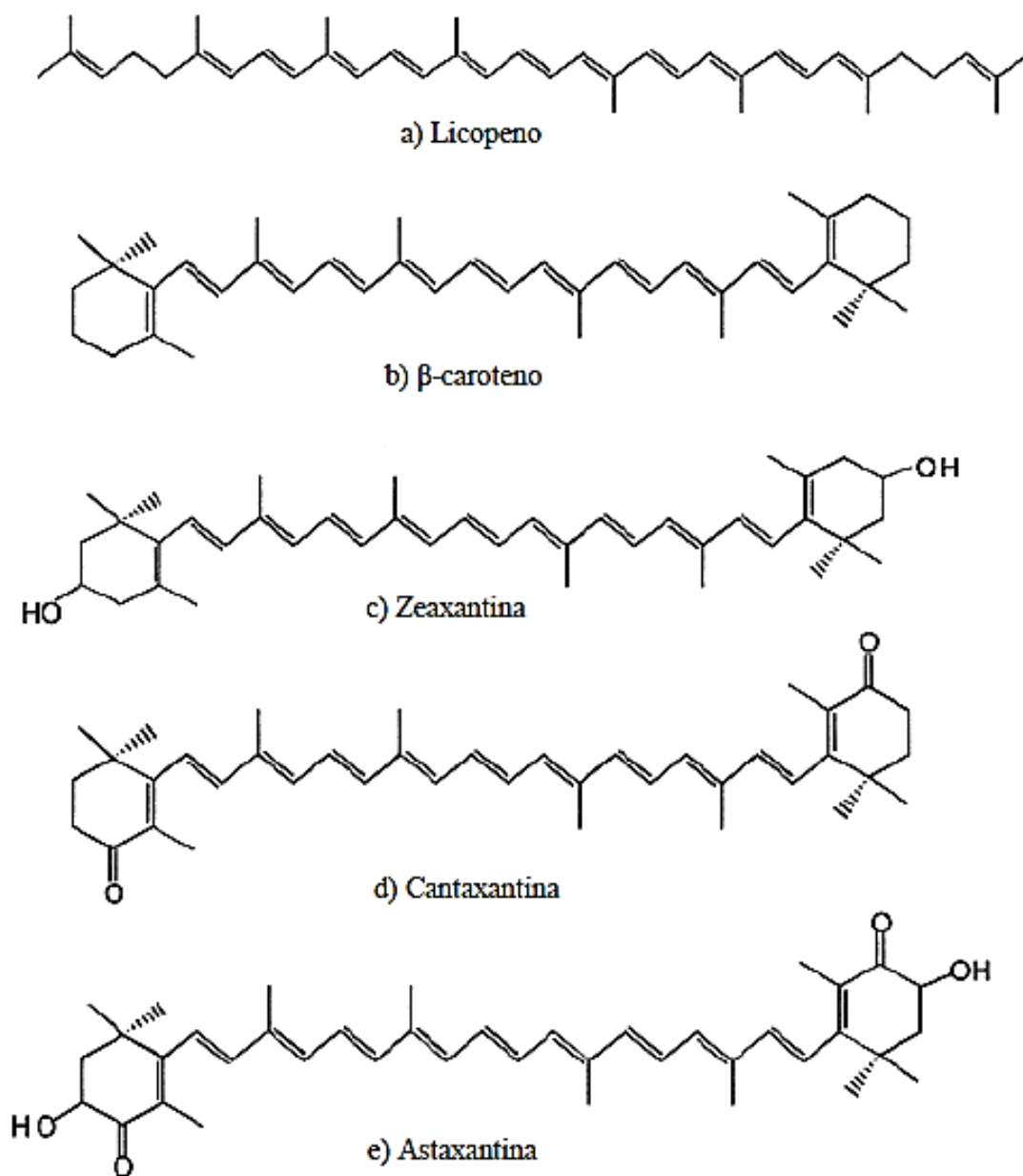


Figura 4. Estructura química de los principales carotenoides (Higuera-Ciapara y col., 2006)

b) Extracción empleando aceites vegetales comestibles

Otros procesos de extracción incluyen el uso de aceites de soya, girasol, canola, algodón, etc. El uso de estos aceites permite mejorar la estabilidad de los pigmentos extraídos, debido a que resultan ser una buena barrera contra el oxígeno, además de que pueden emplearse posteriormente en la elaboración de algún alimento. Por ello, resultan una alternativa prometedora, ofreciendo ventajas atractivas en comparación con los métodos convencionales, debido a la solubilidad que presenta la astaxantina en los aceites comestibles (Sachindra y Mahendrakar, 2005).

Por otro lado, además de ser un proceso amigable con el ambiente y un método de extracción sostenible, el aceite ocupa un papel como protector contra el oxígeno y, consecuentemente, retrasa el tiempo de oxidación y la velocidad de degradación del extracto de astaxantina (Pu y Sathivel, 2010).

Sachindra y Mahendrakar (2005) han reportado que el aceite de girasol resulta ser una opción en la sustitución con los disolventes orgánicos para la extracción de pigmentos carotenoides. Sin embargo, encontraron que su alta viscosidad representa un problema obteniéndose bajos rendimientos de extracción, inclusive a altas temperaturas.

Por otro lado, Chen y Meyers (1982) reportaron el uso de aceite de soya como disolvente para la extracción de astaxantina en cangrejos de río; durante su extracción y cuantificación se empleó el antioxidante “etoxiquin” con el objetivo de inhibir la degradación de los pigmentos.

c) Extracción empleando métodos microbiológicos y enzimáticos

Gildberg y Stenberg (2001), reportaron, un método de extracción integral de desechos de camarón utilizando una proteasa. Este método permite extraer quitina, pigmentos y proteína hidrolizada más eficientemente que los métodos tradicionales en relación con la proporción de proteína recuperada y quitosana de alta calidad. Por su parte, Armenta y col. (2002) reportaron, el empleo de inóculos de la bacteria *Lactobacillus spp.*, para llevar a cabo una biodegradación láctica, con la finalidad de desproteínizar los residuos de camarón así como estabilizar los pigmentos. Posteriormente, la extracción de los pigmentos carotenoides fue efectuada empleando diversas mezclas de disolventes como agua:cloroformo:metanol, éter de petróleo:acetona:agua y aceite de soya. Los extractos resultantes fueron sometidos a una

desproteinización empleando una mezcla de enzimas comerciales así como proteasas aisladas en el camarón. Una vez hidrolizadas las muestras, procedieron a la cuantificación de astaxantina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*, en inglés). Se encontró una mayor concentración de astaxantina en los residuos biodegradados con enzimas que en aquellos que no las emplearon.

2.3.3.3 Astaxantina

La astaxantina o 3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona es un pigmento, que pertenece a la familia de las xantofilas (Higuera-Ciapara, y col., 2006; Yang, y col., 2015). Estos, a su vez, pueden clasificarse en dos categorías, los incluidos como provitamina A (precursores de la vitamina A), como lo es el licopeno y el β -caroteno, y los que no pueden hacerlo. Algunos de los carotenoides que no son provitamina A son las xantofilas, en donde se incluyen a la astaxantina, luteína y zeaxantina (todos encontrados como pigmentos en los crustáceos) (Torres, 2007).

La astaxantina se compone por dos anillos terminales unidos por una cadena de polieno. Esta molécula tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3, 3' del anillo β -ionona. En el caso uno, el grupo hidroxilo reacciona con un ácido graso y luego forma un monoéster, mientras que cuando ambos grupos hidroxilo reaccionan con ácidos grasos, el resultado se denomina un diéster (Rao y col., 2014).

La astaxantina existe en estereoisómeros, isómeros geométricos, formas libres y esterificadas. Todas estas formas se encuentran en fuentes naturales. Los estereoisómeros (3S, 3'S) y (3R, 3'R) son los más abundantes en la naturaleza. *Haematococcus* biosintetiza el isómero (3S, 3'S) mientras que la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* produce el isómero (3R, 3'R).

La astaxantina sintética comprende isómeros de (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R). El estereoisómero primario de astaxantina encontrado en el krill antártico *Euphausia superba* es (3R, 3'R) que contiene principalmente la forma esterificada, mientras que en el salmón silvestre del Atlántico es (3S, 3'S) que se presenta en forma libre (Figura 5). La astaxantina tiene la fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ siendo su masa molecular de 596.84g/mol (Rao y col., 2014). En los crustáceos, la astaxantina, se presenta en casi todas las clases como pigmento característico, ya sea en forma libre o de forma esterificada (monoésteres y/o diésteres de

astaxantina), o bien como caroteno-proteína. El principal sitio de acumulación es el exoesqueleto (cefalotórax y caparazón) de los crustáceos, el cual puede llegar a contener el 90% de la astaxantina en forma libre (Figura 6) (Torres, 2007).

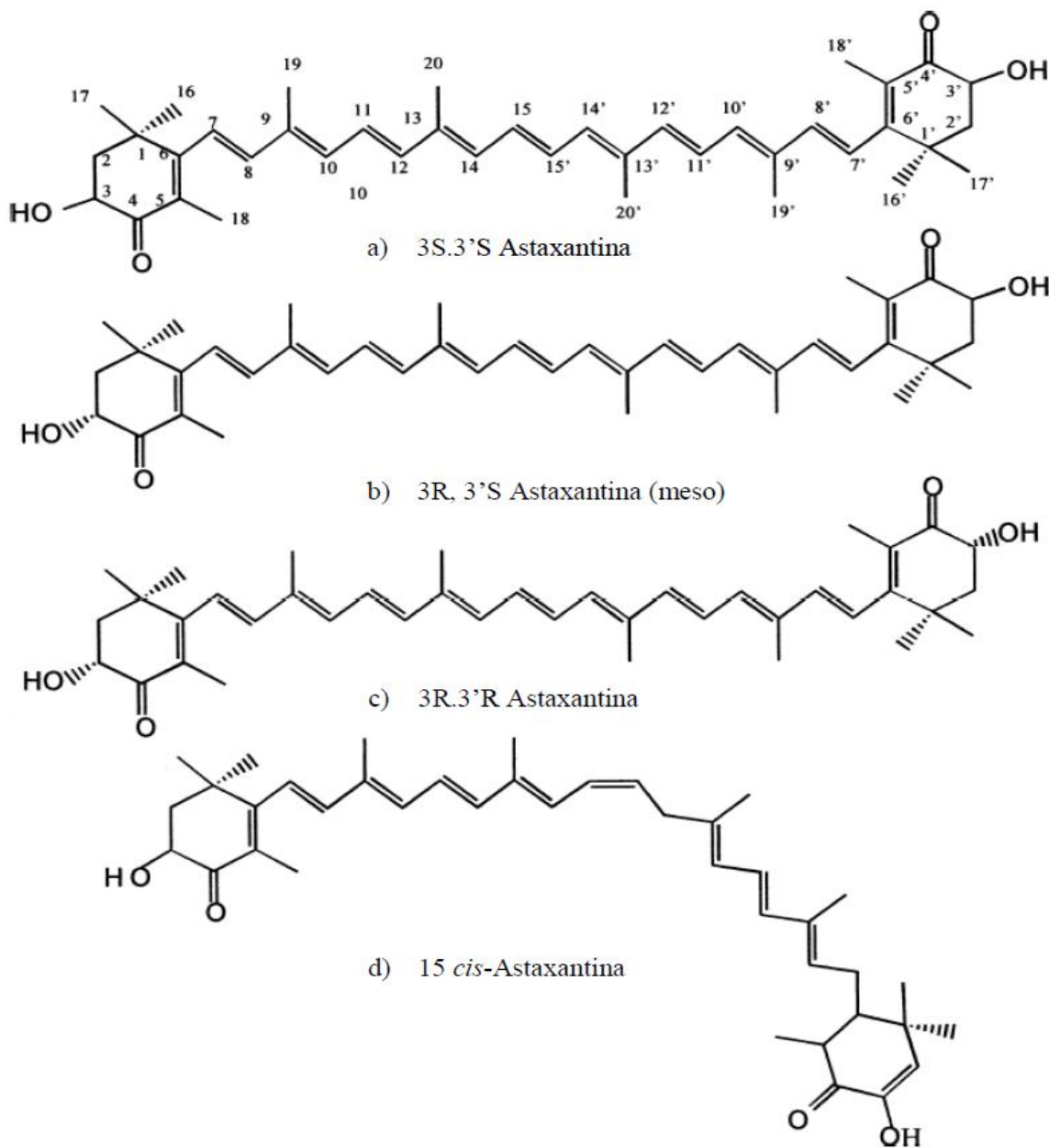


Figura 5. Estereoisómeros de la astaxantina (Higuera-Ciapara y col., 2006)

2.3.3.3.1 Funciones bioquímicas de la astaxantina

El estrés, estilo de vida sedentario, dieta desbalanceada y el tabaco son factores que contribuyen a la generación de radicales libres, los cuales ocasionan la oxidación celular.

Paulatinamente, causan el envejecimiento de manera general. A este proceso se le conoce de manera coloquial como “estrés oxidativo”.

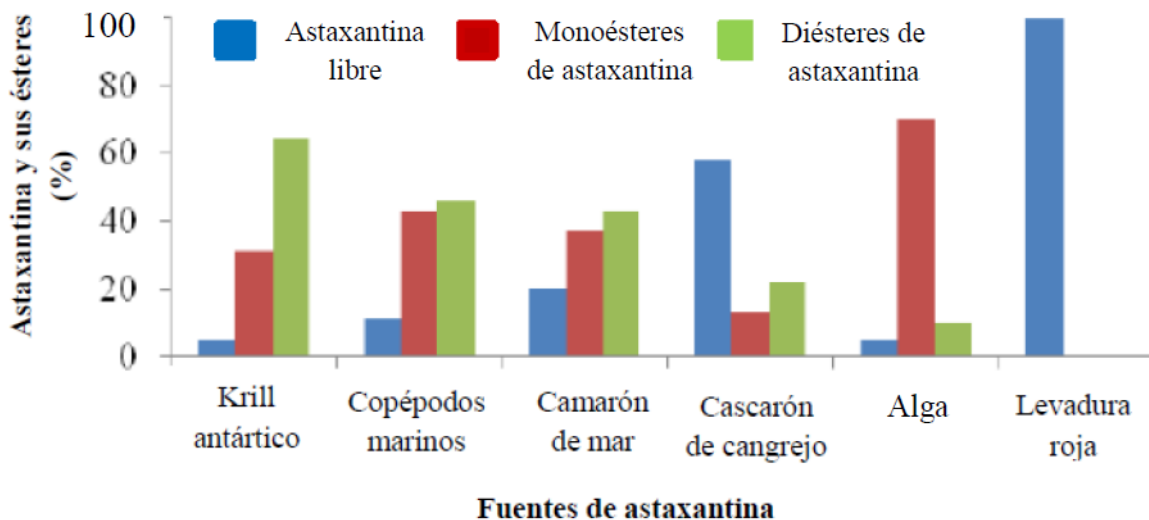


Figura 6. Clases de astaxantina y fuentes de obtención (Rao y col., 2014)

Entre los padecimientos y enfermedades que ocasionan el proceso de oxidación celular se encuentran: la degeneración macular, retinopatía, carcinogénesis, envejecimiento de la piel, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis), etc. (Oryza Oil y Fat Chemical Co. LTD, 2006; Higuera-Ciapara y col., 2006).

La astaxantina, además de su funcionalidad como pigmento colorante, debido a su especial estructura química, posee una gran capacidad antioxidante. Esta llega a ser mucho mayor que la de la vitamina E, siendo 10 veces mayor a la de otros carotenoides, incluyendo la zeaxantina, luteína, el β -caroteno, y la cantaxantina (Yang y col., 2015).

Oryza Oil & Fat Chemical Co., LTD (2006) e Higuera-Ciapara y col., (2006) han reportado diferentes funciones biológicas de la astaxantina y los beneficios que significan para la salud humana, entre los que destacan los siguientes:

- ✓ Protección contra enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, trombosis cerebral e infarto cerebral)
- ✓ Prevención contra la degeneración macular
- ✓ Mejoramiento de funciones inmunológicas
- ✓ Prevención contra enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis: disminución de los efectos perjudiciales del colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*, en inglés)

- ✓ Enfermedades cardiacas: favorece la reparación del daño ocasionado por la falta de oxígeno en el tejido cardiaco
- ✓ Efecto antibacteriano contra infecciones de *H. pylori*
- ✓ Efecto anticancerígeno

Para controlar y reducir la oxidación, el cuerpo humano produce sus propias enzimas antioxidantes, tales como la super-oxido-dismutasa, la catalasa y la peroxidasa, así como otras moléculas con poder antioxidante, sin embargo, en muchos casos, estos compuestos no son suficientes como para proveer una protección adecuada en contra del estrés oxidativo (Higuera-Ciapara y col., 2006).

Lo anterior explica el creciente interés por parte de la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, por introducir un número cada vez mayor de productos con astaxantina en el mercado.

2.3.4 Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que tiene la capacidad de remover radicales libres del sistema, ya sea al reaccionar con ellos para producir otros compuestos inocuos o bien al interrumpir las reacciones de oxidación (Higuera-Ciapara y col., 2006).

Los antioxidantes son ampliamente usados en la industria de los alimentos para prevenir o retrasar la oxidación de grasas y aceites, principalmente. Existen sustancias provenientes de fuentes naturales que en cierta medida actúan como antioxidantes, tal es el caso de la lecitina, los tocotrienoles y los tocoferoles (vitamina E). Su poder antioxidante es inverso al de su función biológica y se encuentran en concentraciones de 1150, 1000, 950, 600 y 100 ppm en los aceites crudos de soya, palma, algodón, maíz y oliva, respectivamente (Baduí-Dergal, 2006).

Los derivados fenólicos, como las isoflavonas, genisteína, daidzeína y gliciteína y los ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico y cumárico presentan estas propiedades. Estos ácidos son escasos en los aceites, excepto en el de oliva virgen (80 ppm), cuya presencia se supone es la razón de su alta estabilidad. Por otro lado, los extractos de especias como clavo, romero, salvia, orégano y pimienta gorda presentan esta actividad, pero no se usan como tal por su intenso aroma y color (Baduí-Dergal, 2006).

Debido a las bajas concentraciones de estas sustancias dentro de las grasas y aceites y a su baja actividad antioxidante, las industrias optan por utilizar antioxidantes sintéticos. Los antioxidantes sintéticos son propiamente donadores de protones, como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), la 2,4,5-trihidroxi-*tert*-butofenona (THBP), el 4-hidroxi-*tert*-butilfenol, la *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) y los galatos. No detienen la formación de radicales, sino que reaccionan con ellos, los estabilizan y producen radicales del antioxidante menos activo. Es decir, se consumen en la reacción y, por lo tanto, la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual. Los antioxidantes contienen una o más funciones hidroxilo y actúan en la iniciación y propagación de la oxidación al ceder un átomo de hidrógeno a los radicales ácido graso ($R\cdot$) y a los hidroperóxidos ($ROO\cdot$), restaurando el ácido (RH) y el hidroperóxido (ROOH) (Baduí-Dergal, 2006).

2.3.4.1 Efecto antioxidante de la astaxantina

La presencia del grupo hidroxilo (OH) y del grupo cetona (C=O), en ambos lados del anillo ionona, junto con la presencia de una estructura de carbonos con dobles enlaces, explican su gran capacidad antioxidante en comparación con la del β -caroteno y la vitamina E. Los dos tipos de actividad antioxidante de la astaxantina son el secuestrar el oxígeno singulete y la inhibición de la peroxidación lipídica (Oryza Oil & Fat Chemical Co., LTD, 2006).

2.3.5. Oxidación lipídica

Las altas temperaturas, y la presencia de oxígeno actúan como catalizadores que aceleran las reacciones de oxidación lipídica, lo cual resulta en la formación de sabores extraños y aceites menos apetecibles.

La velocidad de oxidación lipídica depende fuertemente del grado de insaturación de la grasa o aceite, el cual a su vez está determinado por el número de dobles enlaces que contienen los ácidos grasos que conforman a la grasa o al aceite.

Una elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) hace más susceptible a la oxidación a los aceites, resultando en una pérdida de AGP debido a la formación de compuestos volátiles y no volátiles de tempranas y avanzadas etapas. Debido a que los altos niveles de AGP en los aceites son considerados benéficos en términos del mantenimiento

de la salud, el control de la estabilidad oxidativa de los aceites que contienen altos niveles de AGP, como el caso del aceite de soya, se vuelve esencial. Esto es importante, no solamente por la evaluación de la calidad sensorial del aceite, sino también para la determinación de su valor nutricional.

La autoxidación de lípidos se debe a una reacción en cadena causada por radicales libres, empezando por una reacción de tipo endotérmico (energía libre de Gibbs positiva, es decir, requiere energía) ocasionada por la pérdida de un átomo de hidrógeno bajo la presencia de iniciadores de la oxidación, tales como trazas de metales, luz, calor y/u oxígeno (Pignitter y Somoza, 2012).

La reacción requiere de una energía de activación (E_a) de 20-30 kcal/mol, indicando, que, a bajas temperaturas como, por ejemplo a 20°C, la autoxidación es más importante. Aunque la E_a es baja, necesita de catalizadores, ya que el O₂ en estado normal de triplete (electrones externos con *spin* igual) es poco electrófilo y no actúa en los dobles enlaces. Sin embargo, cuando los *spines* o giros son diferentes hay una repulsión, ya que el oxígeno se excita y se vuelve electrófilo con una configuración de singulete que se une a los ácidos insaturados que se encuentran en estado singulete, duplicándose la velocidad por cada 15 °C (Tabla 4) (Baduí-Dergal, 2006).

Tabla 4. Promotores e inhibidores de la oxidación lipídica (Baduí-Dergal, 2006)

<i>Promotores</i>	<i>Inhibidores</i>
Temperaturas altas	Refrigeración
Metales, Cu, Fe, etc.	Secuestradores
Peróxidos de grasas oxidadas	Antioxidantes
Lipoxidasa	Escaldado
Presión de oxígeno	Gas inerte o vacío
Luz UV	Empaque opaco
Poliinsaturación	Hidrogenación de ácidos grasos insaturados

El mecanismo de propagación de la autoxidación se lleva a cabo mediante radicales libres, considerándose que procede en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En el proceso descrito por Baduí-Dergal (2006), el metileno C11 del grupo 1,4-pentadieno tiene sus dos hidrógenos activados por la influencia de dobles enlaces adyacentes; haciendo que

un fotón produzca un radical ácido graso ($R\bullet$) al actuar sobre uno de los hidrógenos (Figura 7).

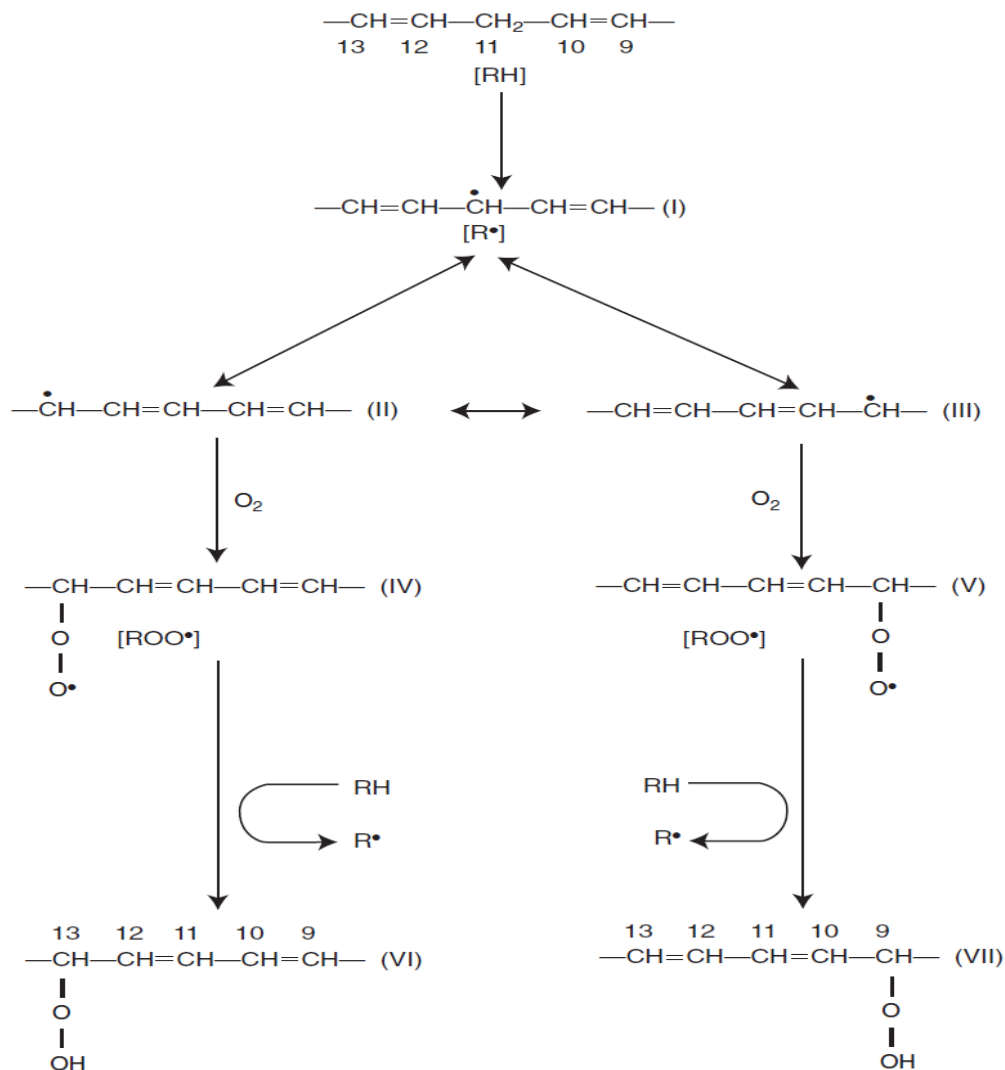


Figura 7. Mecanismo general de la autoxidación lipídica (Baduı-Dergal, 2006)

Por su distribución electrónica inestable, (I) se transforma en dos híbridos de resonancia conjugados más estables (II) y (III) en equilibrio que, en presencia de oxígeno, generando los correspondientes radicales hidropéroxidos ($ROO\bullet$; IV y V). Estos, a su vez, interactúan con un ácido insaturado (RH) y producen dos hidropéroxidos ($ROOH$; VI y VII), además de regenerar un radical libre ($R\bullet$) que vuelve a entrar a la reacción (Baduı-Dergal, 2006).

Los hidropéroxidos son reactivos, producen nuevos radicales que alimentan la reacción, interaccionan con otras moléculas, se polimerizan e incrementan la viscosidad; se oxidan,

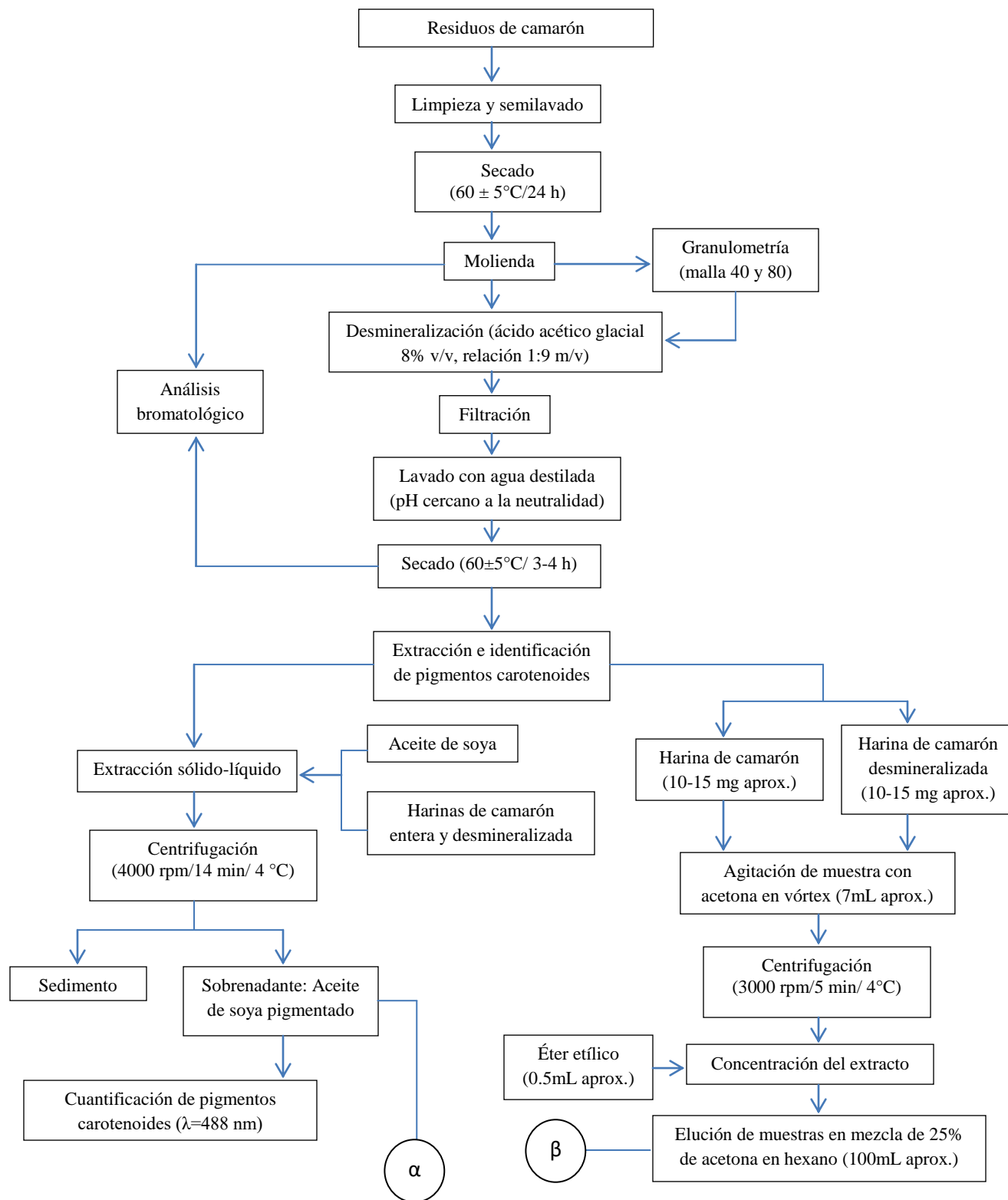
sintetizan epóxidos, su ruptura genera aldehídos, cetonas, ácidos y otros compuestos de baja masa molecular que confieren olores, se deshidratan y sintetizan cetoglicéridos, se ciclan, etcétera (Baduı-Dergal, 2006).

El índice de peróxidos puede ir declinando, sin embargo, la viscosidad aumenta, así como la degradación y la generación de compuestos oloríficos. Por esta razón, el índice de peróxidos no necesariamente refleja el grado de oxidación de una grasa ya que depende del momento en que se determina (Baduı-Dergal, 2006).

Con base al marco teórico y en los objetivos propuestos, a continuación se presenta la metodología seguida.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

La Figura 8 presenta el diagrama de bloques de la metodología empleada.



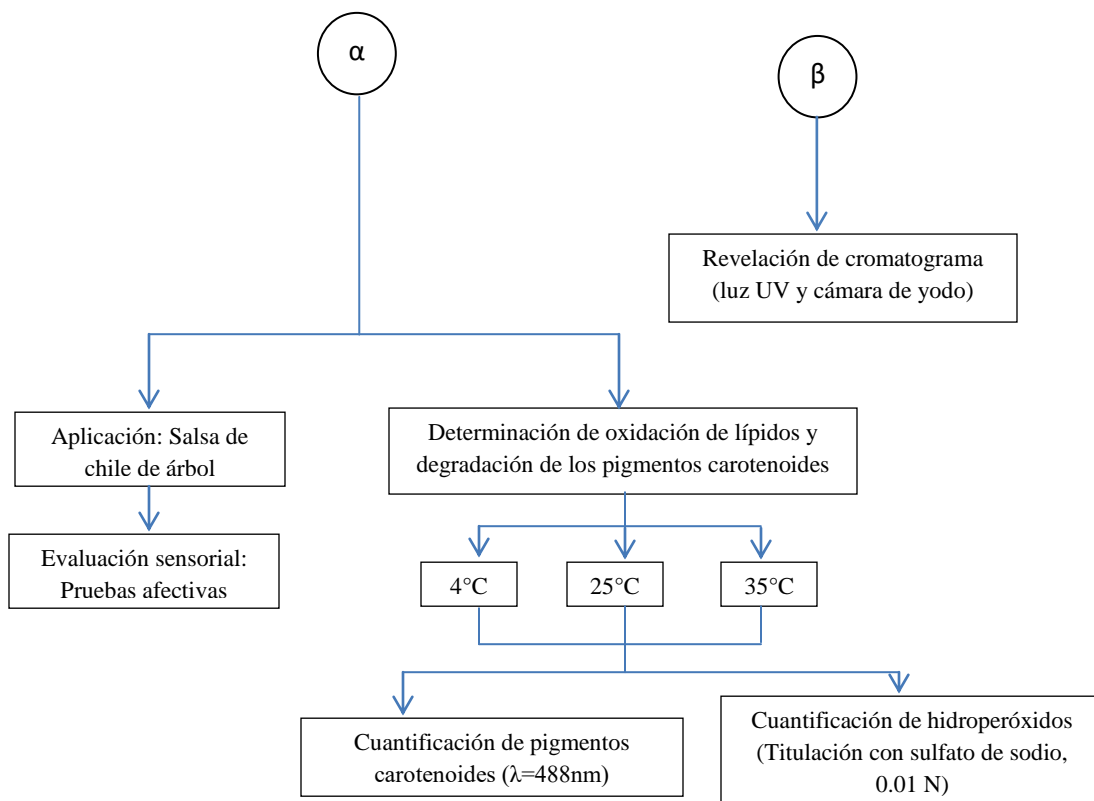


Figura 8. Diagrama general para la obtención, cuantificación, caracterización y aplicación de pigmentos carotenoides (astaxantinas)

3.2. Primera etapa: Obtención y acondicionamiento de la muestra

Los cefalotórax de camarón (*Litopenaeus vannamei*) fueron obtenidos en el mercado de la central de Abastos “La Nueva Viga” de la Ciudad de México. Posteriormente, fueron transportados congelados a los Laboratorios 301, 302 y 303 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM en bolsas de plástico oscuras para evitar la degradación prematura de los pigmentos.

Una vez en los laboratorios, fueron lavadas superficialmente con agua potable para colocarse en charolas de aluminio y secarse empleando una estufa marca Felisa modelo F-293D, a $60\pm 5^{\circ}\text{C}/24$ horas hasta su secado completo.

Una vez secas, se molieron en una licuadora casera marca Hamilton Beach modelo 50242R-MX a su máxima potencia (1500 rpm) hasta obtener harina, la cual se tamizó con tamices de malla 40 y 80 (0.420 y 0.177 mm, respectivamente) con el objetivo de homogeneizar el tamaño de partícula.

3.3. Segunda etapa: Desmineralización y análisis bromatológico

Parte de las harinas obtenidas previamente fueron sometidas a un proceso de desmineralizado empleando ácido acético glacial (agente desmineralizante) (Ameh y col., 2014) al 8% v/v en una relación harina-agente desmineralizante 1:9 (m/v), manteniendo la muestra en agitación constante durante 1 hora. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada hasta obtener un pH neutro y filtradas con papel filtro Whatman No.1, para proceder a su secado a $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 3-4 horas hasta lograr una humedad del 4-7%. El análisis bromatológico fue realizado empleando las siguientes metodologías establecidas:

- ✓ Proteína cruda (Kjeldahl) (AOAC, 2001)
- ✓ Grasa cruda (Soxhlet) (James, 1995)
- ✓ Cenizas totales (calcinación) (Kirk y col., 1996)
- ✓ Humedad (termobalanza) (Kirk y col., 1996)
- ✓ Fibra dietética total (Sigma, 2002)
- ✓ Carbohidratos digeribles (Obtenidos por diferencia)

En el Anexo 1 se describen las metodologías empleadas para la realización del análisis bromatológico de las harinas entera y desmineralizada del cefalotórax de camarón.

3.4. Tercera etapa: Obtención de la curva patrón de astaxantina y cuantificación e identificación de pigmentos carotenoides

La curva patrón de astaxantina se realizó empleando un espectrofotómetro UV-Visible marca GBC (Scientific Equipment) modelo Cintra 5 y, a partir de un estándar de astaxantina (Sigma), se realizó una curva patrón, tomando seis puntos en un rango de concentraciones de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$. De ambas lecturas, tanto para la elaboración de la curva patrón como para la extracción de pigmentos, se eligieron la absorbancias correspondientes a los 488nm de longitud de onda (λ) debido a que presentaba el valor mayor de absorbancia de los pigmentos carotenoides (astaxantina).

Debido al carácter lipofílico de los pigmentos carotenoides, se decidió realizar su extracción empleando aceite de soya comestible (marca Nutrioli) tanto para las harinas enteras como las desmineralizadas, a través de tres temperaturas de agitación constante

durante 20 minutos (Luna-Rodríguez, 2003): a) temperatura ambiente, b) calentamiento a 60°C y c) calentamiento a 80°C. Se utilizaron dos relaciones de harina:aceite: a)1:10 y b)1:30. Posteriormente, cada muestra fue centrifugada a 4,000 rpm en una centrífuga de la marca Eppendorf modelo 5810-R durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, recuperando el extracto oleoso. Finalmente, se realizó la cuantificación de los pigmentos carotenoides en un espectrofotómetro UV-Visible ($\lambda_{\text{máx}}=488$ nm), tras la realización previa de la curva de calibración como fue mencionado en el párrafo anterior. Para asegurar la conservación de los pigmentos carotenoides durante los procesos de extracción para cada método, se añadieron 500 ppm de Etoxiquin (antioxidante) y se elaboró un blanco (sin la adición de pigmentos) con la misma concentración. La metodología seguida fue la establecida por Tenorio (2013) y por Chen y Meyers (1982).

El diseño experimental para el análisis de varianza fue de tipo multifactorial involucrando tres factores: a) tipo de harina, b) relación harina-aceite de soya y c) temperatura de calentamiento, con tres réplicas por cada combinación de factores. El factor tipo de harina, se manejó con dos niveles: harina entera y harina desmineralizada; el factor relación harina:aceite de soya con dos niveles: una relación 1:10 y una relación 1:30 y, finalmente, el factor temperatura de calentamiento contó con tres niveles: T₁: fue la extracción con agitación constante a temperatura ambiente durante 20 minutos, T₂: fue la extracción con agitación constante a 60°C durante 20 minutos y T₃: fue la extracción con agitación constante a 80°C durante 20 minutos. La variable de respuesta fue la cantidad de pigmentos carotenoides extraídos (leídos como astaxantina) medidos como mg de pigmentos carotenoides/100mL de aceite de soya. El análisis de varianza utilizado fue realizado mediante Excel con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (nivel de confianza del 95%).

Para identificar los pigmentos carotenoides presentes en las harinas de residuos de camarón (entera y desmineralizada), se siguió la metodología establecida por Grung y col. (1992), utilizando un vórtex (a 3000 rpm), se disolvieron de 10-15 mg (aprox.) de las muestras con aproximadamente 7mL de acetona. Posteriormente, el excedente de acetona se secó y se re-suspendió la muestra con 0.2mL (aprox.) de éter etílico. Lo anterior se repitió para el estándar de astaxantina. De la parte superior de la suspensión, se colocaron los puntos de cada muestra en una cromatoplaqueta con gel de sílice de 10x5cm. Inmediatamente después se

colocaron en cada punto en la cromatoplaca. Se introdujo en una disolución eluyente de acetona al 25% en hexano, previamente preparada. Por último, al término de la elución, se identificaron cada uno de los puntos con ayuda de luz UV y una cámara de yodo.

3.5. Cuarta etapa: Estudios de cinética de reacción del deterioro de lípidos (degradación de pigmentos carotenoides y oxidación lipídica)

Para evaluar el grado del deterioro de los lípidos, se prepararon dos muestras de aceite de soya, uno que contenía pigmentos carotenoides (extraídos de la harina de camarón desmineralizada en una relación 1:10m/v mediante agitación constante a temperatura ambiente durante 20 minutos) y otra sin pigmentos carotenoides (aceite de soya de la marca Nutrioli). Ambas muestras fueron almacenadas bajo tres temperaturas diferentes (4, 25 y 35°C) y durante cada semana (por un mes) se les determinó el índice de peróxidos y el contenido de pigmentos carotenoides por triplicado. Finalmente, se realizaron los tratamientos matemáticos necesarios para obtener el orden de reacción (para la oxidación de lípidos y la degradación de los pigmentos carotenoides) y obtener diferentes datos de sus cinéticas de reacción, tales como la energía de activación (E_a), la velocidad de oxidación (k), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y el tiempo de oxidación (t_o).

3.6. Quinta etapa: Elaboración de un alimento y su evaluación sensorial

Para evaluar la aceptabilidad de los pigmentos carotenoides obtenidos de cefalotórax de camarón en un alimento, se prepararon dos muestras de salsa de chile de árbol con cacahuete, empleando para ello, los siguientes ingredientes: Para la muestra 1 se adicionó el aceite de soya con pigmentos carotenoides (astaxantinas), cacahuete, chile de árbol, chile morita, vinagre, jugo de limón, orégano y sal. La muestra 2 se realizó con los mismos ingredientes pero sin la adición de los pigmentos carotenoides, únicamente se empleó el aceite de soya como base. Las evaluaciones sensoriales se realizaron a través de pruebas escalares (escala hedónica verbal y de nivel de preferencia). Para ello, se realizó una evaluación sensorial preliminar con personal de los Laboratorios 301, 302 y 303 del Conjunto E, de la Facultad de Química de la UNAM y, con base en estos resultados, se ajustaron las formulaciones para proceder a realizar una evaluación sensorial final con jueces no entrenados. Para determinar el nivel de aceptación, se utilizó una escala hedónica

verbal escogiéndose cuatro atributos sensoriales (olor, color, textura y sabor), solicitándoles a los evaluadores seleccionaran la muestra de su mayor agrado y/o preferencia. Para reducir el sesgo estadístico, se elaboraron códigos con tres dígitos para cada una de las muestras.

A partir de los datos obtenidos de las evaluaciones sensoriales (101), se realizaron análisis de varianza (*ANOVA*, en inglés) de un factor para cada uno de los atributos sensoriales y para la probabilidad de compra entre las muestras mediante Excel (con un nivel de confianza del 95%). De esta manera se determinó la existencia de diferencias significativas entre las dos muestras de salsa elaboradas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Primera etapa: Granulometría y porcentaje de cenizas por tamaño de partícula de la harina entera de residuos de camarón

Los resultados de la Tabla 5 muestran que la distribución por tamaño de partícula de las harinas de cefalotórax de camarón fueron uniformes una respecto de la otra, ya que existió prácticamente el mismo porcentaje de tamaño de partícula entre las mallas 40, 80 y la “base” (lo cual, es lo no retenido por la última malla No. 80). En cuanto a la determinación del contenido de cenizas (Tabla 5), se realizó con la finalidad de conocer si habría alguna variación entre los tamaños de partícula, determinando cuál fracción de la harina de camarón sería la más adecuada para desmineralizar. Sin embargo, los datos mostraron una variación mínima entre ellos y, por ello, se decidió juntar todas las fracciones y realizar la desmineralización a la parte correspondiente del conjunto de ellas.

Tabla 5. Granulometría y porcentaje de cenizas de la harina de camarón

No. de malla	Tamaño de partícula (mm)	Cantidad retenida (g)	Porcentaje (%)	Cenizas (%)
40	>0.420	165.2	31.9	13.77 ^{±0.07}
80	0.420-0.177	191.4	37.0	16.22 ^{±0.04}
Base	<0.177	161.3	31.1	14.48 ^{±0.03}
Sumatoria		517.9	100.0	
Promedio				14.82^{±0.02}

**Los resultados mostrados son el promedio de 2 determinaciones*

4.2. Segunda etapa: Análisis bromatológico de las harinas de residuos de camarón entera y desmineralizada

Los resultados de la Tabla 6 muestran que los componentes de la harina de residuos camarón que presentaron una menor diferencia con respecto de lo reportado en la literatura fueron el contenido de humedad, de proteína y de carbohidratos totales (carbohidratos digeribles y fibra). Por otro lado, el contenido de cenizas y de grasa fueron los macronutrientes más variables. La grasa fue el componente que mayor diferencia mostró (en el presente trabajo las harinas de residuos de camarón tienen un valor de grasa del 14.50%. Sin embargo, los datos reportados por Mendes y col. (2013) mostraron la existencia de un 8% de grasa en la harina de residuos camarón de la misma especie).

Tabla 6. Análisis bromatológico de la harina de residuos de camarón

Componente (%)	Harina entera (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Harina desmineralizada (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Harina entera (<i>Litopenaeus vannamei</i>) Mendes y col., (2013)	Harina entera Simpson y Haard (1985)****
Humedad	7.42 ^{±1.04}	6.50 ^{±0.71}	5.77 ^{±0.07}	4.40
Cenizas	14.75 ^{±0.31}	6.32 ^{±0.09}	19.77 ^{±1.20}	26.00
Grasa	14.50 ^{±0.90}	28.67 ^{±0.53}	8.00 ^{±1.33}	12.27
Proteína*	45.26 ^{±0.57}	44.24 ^{±0.08}	48.24 ^{±1.81}	43.13
Carbohidratos digeribles**	0.27 ^{±0.39}	1.50 ^{±0.28}	1.79 ^{±0.65}	-
Carbohidratos totales	18.07 ^{±0.24}	14.27 ^{±0.40}	18.28 ^{±0.1}	14.20
Fibra***	17.80 ^{±0.09}	12.77 ^{±0.51}	16.50 ^{±1.34}	-

Los resultados reportados son el promedio de 3 mediciones experimentales *Factor de conversión nitrógeno proteínico (para crustáceos) de 5.4 (Lim y Sessa, 1995), ** Calculado por diferencia, ***Incluye quitina, ****No especifica la especie

Por otro lado, los datos reportados por Simpson y Haard (1985), mostraron un porcentaje de grasa más cercano al que se obtuvo en este trabajo, aunque la especie de camarón no fue especificada. De acuerdo con Ameh y col. (2014), durante la desmineralización ácida del exoesqueleto del camarón, el calcio presente en forma de sal (carbonato de calcio) es disuelto por el ácido. En este trabajo, el proceso de desmineralización de la harina de camarón fue llevado a cabo con ácido acético glacial al 8% v/v, en una relación harina:agente desmineralizante de 1:9 m/v, por lo que se observó que el tratamiento cumplió con su propósito; el cual consistió en disminuir considerablemente el contenido de minerales, para así, poder concentrar la grasa dentro de la muestra. De lo anterior, se puede suponer que la gran mayoría de las cenizas del camarón presentes en él, corresponden al calcio, ya que después de la desmineralización el contenido de cenizas disminuyó más del doble; mientras que la grasa presente en la muestra desmineralizada fue del doble con respecto de la muestra inicial. Otro componente que se vio disminuido después del proceso de desmineralización, fue el contenido de fibra con un 5% menor que el de la harina entera (Figura 9).

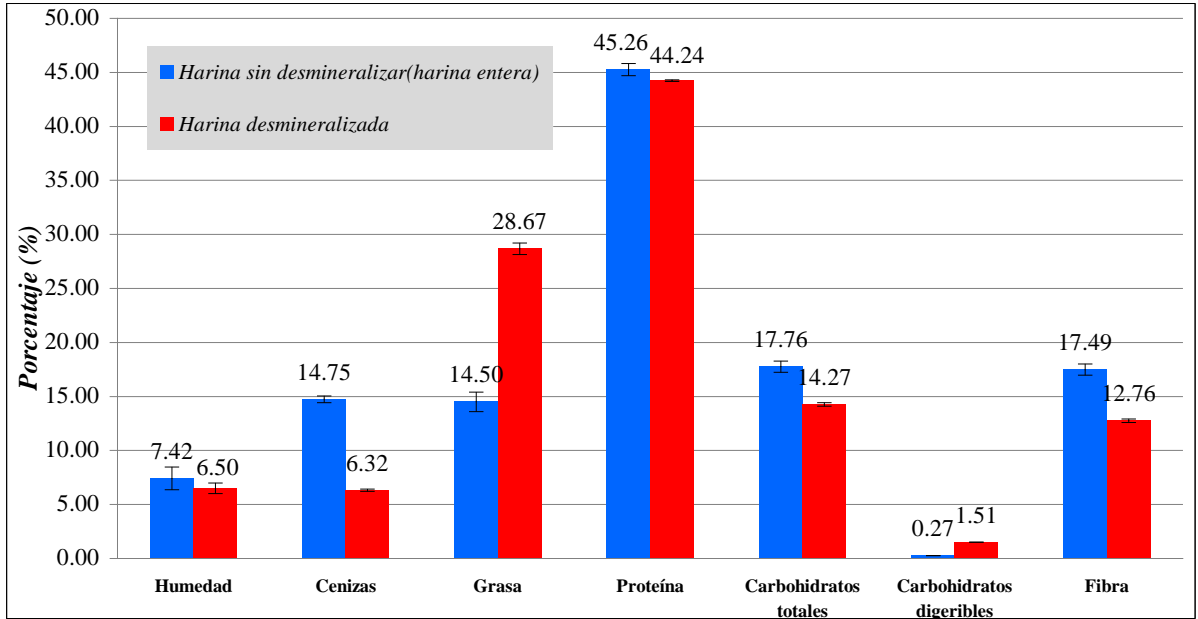


Figura 9. Comparación de la composición química de las harinas de cefalotórax de camarón entera y desmineralizada de esta investigación

4.3. Tercera etapa

4.3.1. Cuantificación de pigmentos carotenoides

Para la determinación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas), fue necesario realizar una curva de calibración (Fig. 10), empleando seis puntos y un estándar de astaxantina (Sigma). De esta manera fue posible la obtención de un coeficiente de correlación de 0.991. Los resultados de las extracciones se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 11.

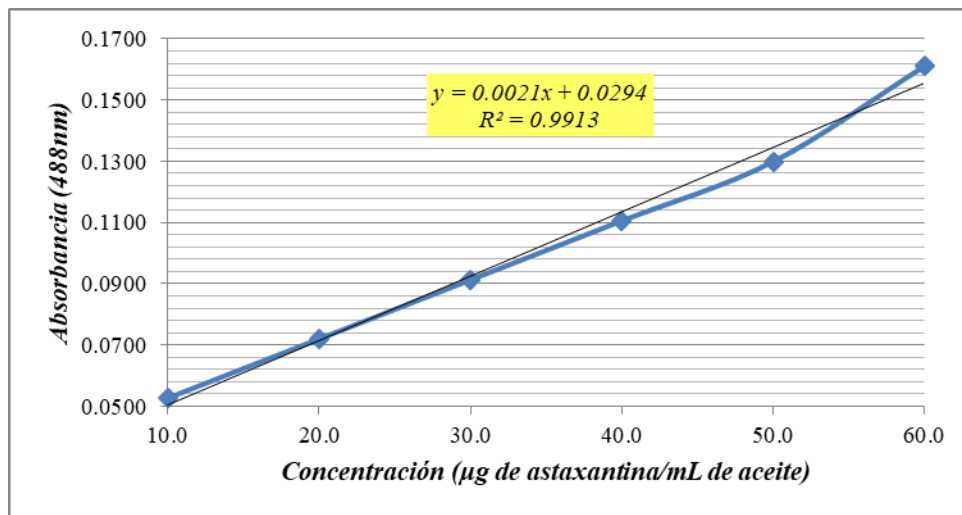


Figura 10. Curva de calibración de astaxantina

Tabla 7. Concentración de los pigmentos carotenoides (mg/100 mL de aceite) en las muestras de harina de camarón bajo diferentes tratamientos

Tipo de harina							
Harina entera				Harina desmineralizada			
Relación harina:aceite				Relación harina:aceite			
1:10		1:30		1:10		1:30	
Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción		Tipo de extracción	
T ₁	45.475 ^{±1.557}	T ₁	21.541 ^{±1.775}	T ₁	50.417 ^{±1.475}	T ₁	31.923 ^{±1.884}
T ₂	58.481 ^{±2.148}	T ₂	39.182 ^{±2.215}	T ₂	78.532 ^{±2.254}	T ₂	63.048 ^{±2.141}
T ₃	67.913 ^{±2.565}	T ₃	51.833 ^{±2.679}	T ₃	83.724 ^{±2.452}	T ₃	70.446 ^{±2.741}

Los resultados reportados son el promedio de 3 mediciones experimentales donde: T₁=Agitación constante a temperatura ambiente durante 20 minutos, T₂= Agitación constante a 60°C durante 20 minutos y T₃= Agitación constante a 80°C durante 20 minutos

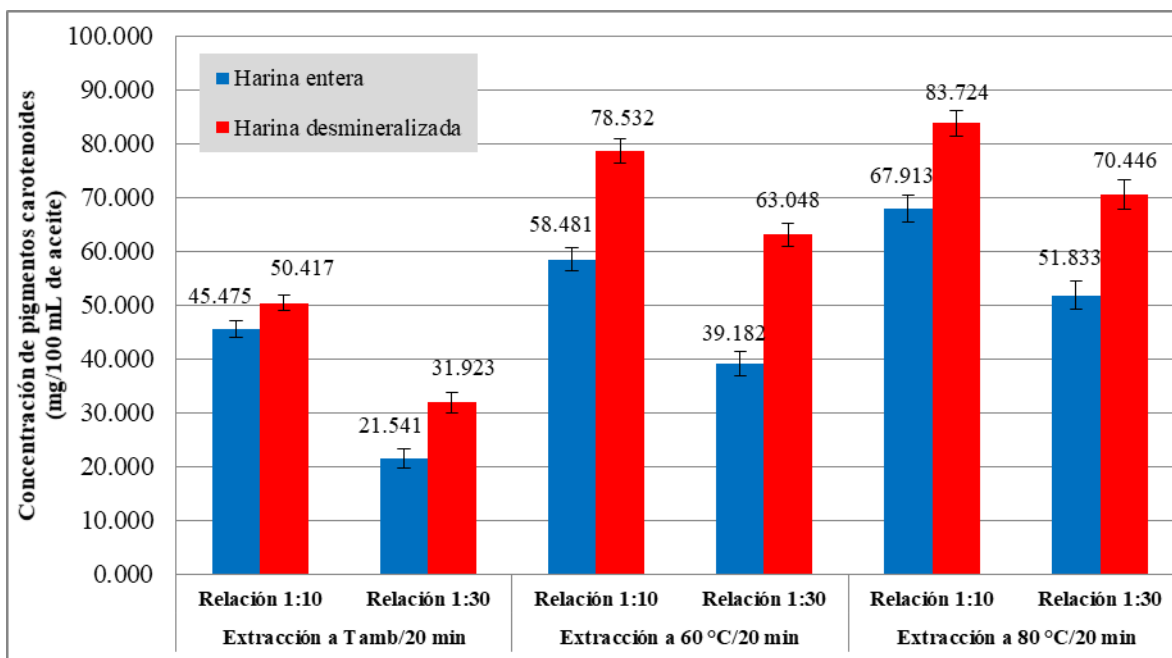


Figura 11. Concentración de pigmentos carotenoides (mg/100 mL de aceite)

De acuerdo con la Figura 11, la máxima concentración de pigmentos carotenoides, dentro del aceite de soja, se obtuvo con las harinas desmineralizadas en una relación harina:aceite

1:10 y mediante el calentamiento a 80°C durante 20 minutos. Al comparar la extracción entre los dos tipos de harinas analizadas (harina entera y harina desmineralizada) se observó que, para las tres temperaturas de extracción (T amb, 60 y 80°C) y las dos relaciones harina:aceite (1:10 y 1:30), siempre se obtuvo una mayor concentración de pigmentos carotenoides en las harinas desmineralizadas, debido a que, como ya fue mencionado, este proceso concentra la grasa en la muestra. Por otra parte, el aumento de la temperatura mejora la extracción de los pigmentos carotenoides.

Sin embargo, se ha reportado que las altas temperaturas pueden generar oxidación lipídica y rancidez oxidativa en los aceites (Baduí-Dergal, 2006); lo cual podría reducir la actividad antioxidante de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) dentro del aceite. Esto se verá más adelante.

En cuanto a la relación harina:aceite se obtuvo que siempre que se emplee una relación cada vez mayor, la cantidad de pigmentos carotenoides dentro del aceite disminuirá pero, por otro lado, la cantidad obtenida de la muestra siempre será mayor (ver Figuras 11 y 12).

Los datos mostrados en la Tabla 8, fueron analizados mediante un análisis multivariable de tres factores (tipo de harina, relación harina:aceite y temperatura de extracción) con interacción con un $\alpha=0.05$. Los resultados de dicho análisis se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de varianza de 3 factores con interacción para la concentración de pigmentos carotenoides en diferentes muestras de harina de camarón

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Fc	Ft	Conclusión
A: Tipo de harina	19.02	1.00	19.02	9.45	4.26	H ₁
B: Relación harina: aceite	27.77	1.00	27.77	13.80	4.26	H ₁
C: Temperatura de extracción	6.82	2.00	7.26	4.61	3.40	H ₁
AB	10.43	1.00	10.43	5.18	4.26	H ₁
AC	20.93	2.00	10.47	5.20	3.40	H ₁
BC	23.47	2.00	11.74	5.83	3.40	H ₁
ABC	17.14	2.00	8.57	4.26	3.40	H ₁
Error total	48.31	24.00	2.01			
Total (corrección)	276.94	35.00				

Donde: GL= Grados de libertad y H₁= Diferencia significativa

Los resultados de la Tabla 8 muestran que entre las tres variables (A: tipo de harina, B: relación harina:aceite y C: temperatura de extracción) y entre sus interacciones (AC, BC y ABC) hubieron diferencias significativas en cuanto a la concentración de los pigmentos carotenoides dado que para cada una de ellas el valor de Fc fue mayor que el de Ft.

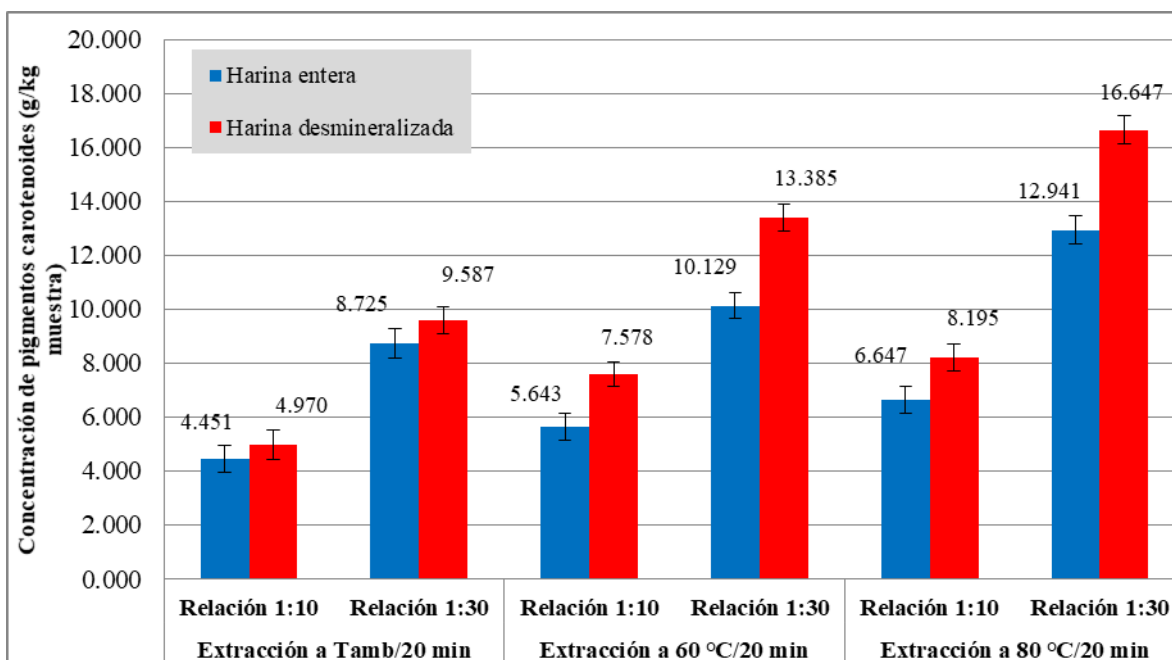


Figura 12. Rendimiento obtenido de pigmentos carotenoides (g/kg muestra)

Para saber cuál de las dos relaciones de harina:aceite empleadas fue la más eficiente, fue necesario determinar el rendimiento expresado en gramos de pigmentos carotenoides (astaxantinas)/kg de harina, es decir, la cantidad de pigmento, obtenido, por cada kg de harina. Para ello, se construyó la Figura 12, donde se aprecia que, al aumentarse la temperatura de calentamiento, la mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) por kilogramo de harina se obtuvo al emplear harina desmineralizada, en una relación harina:aceite de 1:30.

A pesar de que la relación 1:30 permitió obtener una mayor cantidad de pigmentos carotenoides (astaxantinas) por cada kilogramo de muestra, en la Figura 11 (concentración de pigmentos carotenoides por cada 100mL de aceite) se aprecia que, al emplearse dicha relación, la concentración de pigmentos carotenoides en aceite fue menor que si se emplea la relación 1:10. Esto fue debido a que se encuentra más diluida la muestra en la relación

1:30 que en la 1:10. Por ello, es recomendable que en futuras investigaciones se emplee un mayor número de tratamientos, para encontrar las condiciones óptimas que permitan utilizar la menor cantidad posible de harina y, a su vez, obtener una concentración adecuada en el aceite.

4.3.2. Efecto del calentamiento en la oxidación del aceite de soya

A pesar de que el calentamiento del aceite de soya a las temperaturas de 60 y 80°C durante la extracción mecánica de los pigmentos carotenoides, por 20 minutos, permitió obtener una mayor concentración de los mismos, existe la posibilidad de que el aceite se oxide, y que, por ende se generen compuestos que aceleren su oxidación. Para estudiar esto, se decidió determinar el índice de peróxidos al aceite soya después de calentarse a esas temperaturas y durante ese tiempo de 20 min. Los resultados presentados mostraron que no es conveniente el calentamiento del aceite soya para la extracción de los pigmentos carotenoides debido a que, como se muestra en la Tabla 9, el grado de oxidación es lo suficientemente alto (para ambas temperaturas) como para afectar el efecto antioxidante de los pigmentos carotenoides.

Tabla 9. Índice de peróxidos del aceite de soya inicial y posterior al calentamiento a 60 y 80°C durante 20 minutos

Muestra	Índice de peróxidos del aceite de soya (miliequivalentes de tiosulfato de sodio/ kg de muestra)			*Deterioro por calentamiento (%)	
	Inicial	Después de calentamiento		60 °C/20 min	80 °C/20 min
		60 °C/20 min	80 °C/20 min		
1	0.201 ^{±0.005}	0.375 ^{±0.027}	0.820 ^{±0.150}	18.73 ^{±1.35}	41.00 ^{±7.49}
2	0.206 ^{±0.005}	0.429 ^{±0.027}	0.794 ^{±0.150}	21.44 ^{±1.35}	39.68 ^{±7.49}
3	0.212 ^{±0.005}	0.404 ^{±0.027}	1.065 ^{±0.150}	20.18 ^{±1.35}	53.26 ^{±7.49}
Promedio	0.206^{±0.005}	0.402^{±0.027}	0.893^{±0.150}	20.12^{±1.35}	44.65^{±7.49}

*Los resultados reportados son el promedio de tres mediciones experimentales. *El porcentaje de deterioro está determinado por el límite máximo permisible establecido por la NMX-F-252-1985 para el índice de peróxidos en aceite comestible de soya (2 meq/kg)*

El índice de peróxidos (IP) mostró el grado de peroxidación (compuestos oxidados con enlace oxígeno-oxígeno) midiendo la cantidad total de peróxidos en la sustancia. Esta es una de las principales causas de la generación de rancidez, deterioro y producción de toxinas, así como de radicales libres, los cuales degradan ácidos grasos y otros compuestos

lipídicos (Dermiş y col., 2012). Se tomó como referencia el límite máximo permisible (LMP) para el IP, establecido por la norma mexicana NMX-F-252-1985 (DOF, 1985), el cual es de 2.0 meq de tiosulfato de sodio/kg de muestra. Pudo determinarse el grado de oxidación de las muestras, obteniéndose que después del calentamiento a 60 y 80°C durante 20 minutos, no se superó el LMP, obteniéndose un IP de 0.402 ± 0.027 y de 0.893 ± 0.150 meq/kg muestra, respectivamente y un porcentaje de deterioro de lípidos de 20.12 ± 1.35 y $44.65 \pm 7.49\%$, respectivamente, considerando que el 100% del deterioro correspondió al LMP.

4.3.3. Identificación de los pigmentos carotenoides en las harinas de residuos de camarón

La identificación de los pigmentos carotenoides presentes en la harina de residuos de camarón (entera y desmineralizada) fue llevada a cabo a través de una cromatografía en capa fina, CCF, siguiendo la metodología establecida por Grung y col. (1992), en la cual, se calculó el factor de retardo (*R_f*) de cada pigmento y se comparó con respecto del estándar de astaxantina comercial de la marca SIGMA. En la Tabla 10 se aprecian los valores de *R_f* típicos de diversos pigmentos carotenoides, para la metodología realizada por Grung y col. (1992).

Tabla 10. Factores de retención (*R_f*) de carotenoides por cromatografía en capa fina, CCF

Carotenoide	*Valor típico de <i>R_f</i>
β-caroteno	0.99
Equinenona	0.87
Diésteres de astaxantina	0.75
Monoésteres de astaxantina	0.50
Cantaxantina	0.40
Astaxantina libre	0.33
Luteína/Zeaxantina	0.25

* Siguiendo la metodología establecida por Grung, et al. (1992)

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos al realizar la CCF, tanto de la muestra de harina de residuos de camarón entera como de la desmineralizada. En ella se lograron identificar los siguientes compuestos: luteína, astaxantina libre, cantaxantina, monoésteres de astaxantina y β-caroteno. Al colocar la cromatoplaque bajo la luz UV (Fig. 13) únicamente se pudieron apreciar 3 pigmentos carotenoides para ambas muestras de harina

de camarón (puntos B y C), mientras que para el estándar de astaxantina (punto A) únicamente se apreció la banda correspondiente a la astaxantina libre. Posteriormente, se introdujo la misma cromatoplaaca a una cámara de yodo y fue posible identificar 2 pigmentos carotenoides adicionales para los puntos B y C, los cuales correspondían a la luteína y al β -caroteno; mientras que para el punto A, se identificó al β -caroteno (véase Fig. 14.). En los estudios llevados a cabo por Takeungwongtrakul y col. (2013) y por Gulzar y Benjakul (2018), se identificaron a través de una CCF los mismos carotenoides (con excepción de la luteína) a partir de muestras de cefalotórax de camarón de la misma especie (*Litopenaeus vannamei*).

Tabla 11. Identificación de pigmentos carotenoides por cromatografía en capa fina, CCF

A		B		C	
Rf	Carotenoide identificado	Rf	Carotenoide identificado	Rf	Carotenoide identificado
0.32	Astaxantina libre	0.23	*Luteína/Zeaxantina	0.23	*Luteína/Zeaxantina
		0.32	Astaxantina libre	0.32	Astaxantina libre
		0.39	Cantaxantina	0.39	Cantaxantina
0.97	* β -caroteno	0.49	Monoésteres de astaxantina	0.47	Monoésteres de astaxantina
		0.95	* β -caroteno	0.95	* β -caroteno

A: Estándar de astaxantina, B: Harina desmineralizada de camarón, C: Harina entera de camarón
*Tanto el β -caroteno como la luteína fueron revelados utilizando una cámara de yodo

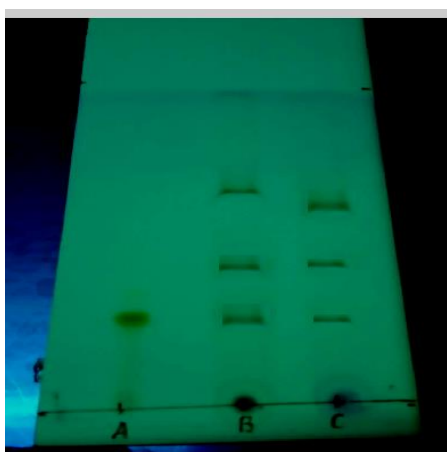


Figura 13. Cromatoplaaca obtenida bajo luz UV. A) Estándar de astaxantina Sigma. B) Pigmentos obtenidos de la harina de cefalotórax de camarón previamente desmineralizado.

C) Pigmentos obtenidos de la harina entera de cefalotórax de camarón

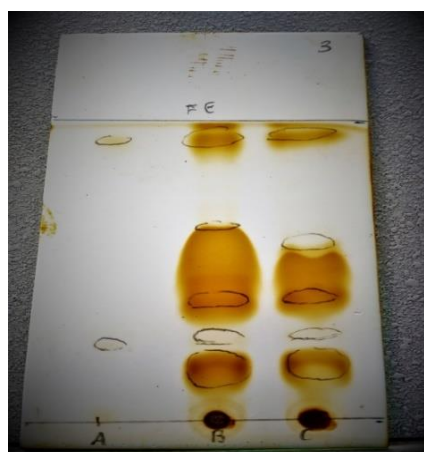


Figura 14. Cromatoplaaca obtenida al revelarse con una cámara de yodo.

A) Estándar de astaxantina Sigma. B) Pigmentos obtenidos de la harina de cefalotórax de camarón previamente desmineralizado. C) Pigmentos obtenidos de la harina entera de cefalotórax de camarón

4.4. Cuarta etapa

4.4.1 Degradación de los pigmentos carotenoides

Como se comentó en la etapa anterior, los pigmentos carotenoides (pc) y, en particular, la astaxantina son susceptibles a la oxidación debido a sus estructuras con alto grado de insaturación (Takeungwongtrakul y col., 2013). En este trabajo se observó una degradación de los pigmentos carotenoides, la cual fue variable a diferentes temperaturas, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno

Temperatura de almacenamiento (°C)	Concentración (mg/100mL)				
	Semana				
	0	1	2	3	4
4	27.857 ^{±0.068}	24.325 ^{±0.072}	21.505 ^{±0.076}	19.987 ^{±0.081}	18.530 ^{±0.089}
25	27.857 ^{±0.068}	23.206 ^{±0.073}	20.207 ^{±0.079}	18.432 ^{±0.080}	16.914 ^{±0.092}
35	27.857 ^{±0.068}	21.135 ^{±0.064}	17.215 ^{±0.080}	15.234 ^{±0.087}	13.874 ^{±0.095}

Los resultados reportados son el promedio de tres mediciones experimentales

La concentración inicial fue de 27.86^{±0.07} mg/100mL de aceite. En la Figura 15 se puede apreciar que a medida que la temperatura aumentó el nivel de degradación de los pigmentos carotenoides era cada vez mayor; mientras que la menor degradación se obtuvo a los 4°C, observándose después de cuatro semanas, un porcentaje de degradación del 33.48% (Tabla 13). Por otro lado, a las temperaturas de almacenamiento de 25 y 35°C, la degradación de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) y, después de cuatro semanas, fue de 39.28 y del 50.20%, respectivamente.

La degradación térmica de la astaxantina ha sido estudiada en diversos sistemas-modelo, siendo descrita por Takeungwongtrakul y col., (2013), como una reacción con cinética de primer orden, es decir, que la velocidad de la reacción es independiente de la concentración de los reactivos. Lo anterior se cumplió al elaborar los tratamientos necesarios de los datos obtenidos. El comportamiento cinético de primer orden de la reacción de degradación de los pigmentos carotenoides se demostró por la linealidad del gráfico realizado entre el $\ln(C/C_i)$ de los pigmentos y el tiempo (semanas) (Fig. 15).

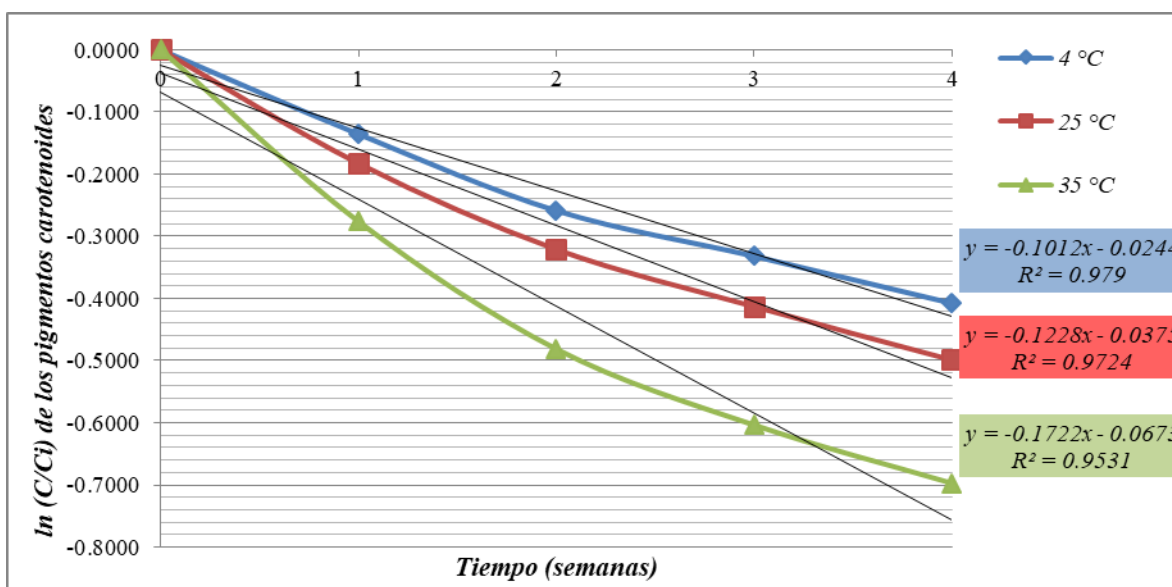


Figura 15. Gráficos cinéticos de primer orden de la degradación de los pigmentos carotenoides en aceite de soja a diferentes temperaturas

Tabla 13. Cinéticas de degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soja bajo diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno

Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (días)	Degradación de los pigmentos carotenoides (%)
4	0.101	0.9790	48	33.48
25	0.123	0.9724	40	39.28
35	0.172	0.9531	28	50.20
Ea (kJ/mol)	11.14			

Constante de velocidad de degradación (*k*), Tiempo de vida media (*t*_{1/2}), Energía de activación (*Ea*)

La constante de degradación (*k*) de los pigmentos carotenoides fue determinada por la regresión lineal del ln(*C/Ci*) contra el tiempo. La cinética de primer orden demostró que la *k* de la degradación de los pc se incrementó con el aumento de temperatura (Tabla 13), indicando que los pc fueron degradados a una mayor velocidad conforme se incrementó la temperatura. Los valores de *k* para los aceites almacenados a 4, 25 y 35°C fueron de 0.101, 0.123 y 0.172, respectivamente (Tabla 13). Los coeficientes de correlación (*R*²) del modelo cinético de primer orden fueron 0.979, 0.972 y 0.953, para las muestras de aceite almacenadas a 4, 25 y 35°C, respectivamente. Los resultados indicaron que el modelo cinético de primer orden puede ser empleado para describir el comportamiento de la

degradación de la astaxantina, en las muestras almacenadas entre los 4 y 35°C. Pu y Sathivel (2011), reportaron que la degradación de la astaxantina, proveniente de cangrejo de río en aceite de lino, fue descrita por una reacción con cinética de primer orden. Por otro lado, Rao y col. (2007), reportaron también una reducción drástica de la concentración de astaxantina a elevadas temperaturas.

El gráfico de Arrhenius del $\ln(k)$ contra el $1/T$ para la degradación de los pigmentos carotenoides se aprecia en la Figura 16.

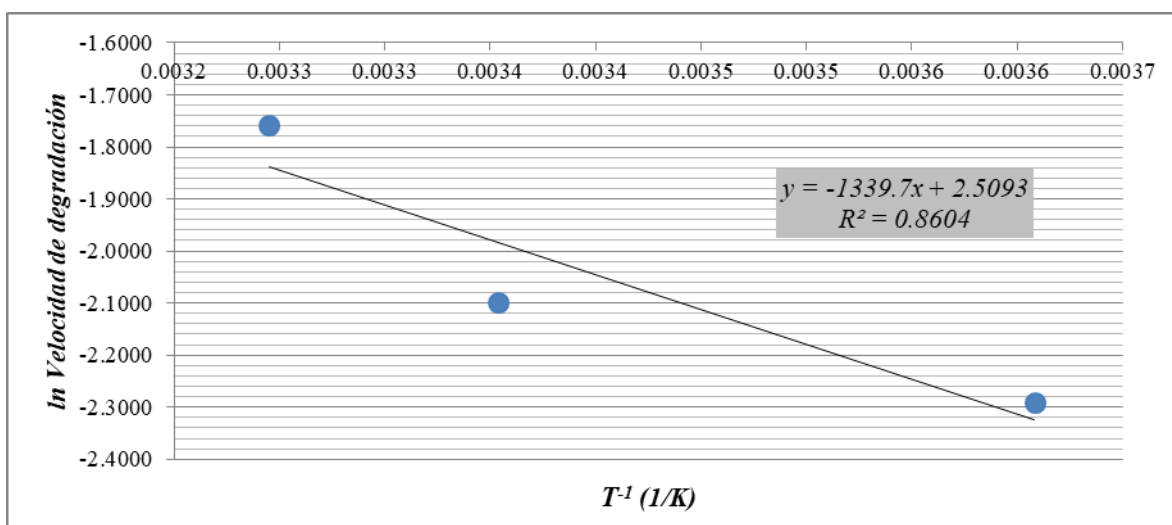


Figura 16. Gráfico de Arrhenius para la degradación de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya

La pendiente corresponde a la energía de activación (E_a) dividida por la constante molar de los gases. Los valores de k fueron descritos por la ecuación de Arrhenius, en la cual se obtuvo una R^2 de 0.86 (por lo que para obtener un mejor coeficiente de correlación R^2 se recomendaría realizar un mayor número de tratamientos, es decir, más de tres temperaturas de almacenamiento). De acuerdo con Farhoosh y Hoseini-Yazdi (2014), la energía de activación es la energía mínima requerida para que una reacción química ocurra. La energía de activación (E_a) obtenida de la degradación de los pc fue de 11.14 kJ/mol, la cual fue menor que la reportada en otros estudios; en los cuales las energías de activación fueron de 52.01 kJ/mol (Takeungwongtrakul y col., 2013) y de 88.44 kJ/mol (Pu y col., 2010).

En este trabajo se obtuvo una menor energía de activación debido a que las muestras de aceite con pigmentos carotenoides no fueron tratadas bajo las condiciones de

almacenamiento ideal en las que un aceite es almacenado. En este caso estuvieron en contacto permanentemente con el oxígeno con el objetivo de acelerar la oxidación lipídica y de esta manera demostrar que el oxígeno es el oxidante que juega un papel mayor que la temperatura en cuanto a la degradación de los pigmentos carotenoides. Para evaluar la estabilidad de los pigmentos carotenoides en el aceite de soya, se determinó la vida media aparente, siendo para las temperaturas de 4, 25 y 35°C de 48, 40 y 28 días, respectivamente. Los resultados demostraron, que, bajo estas condiciones de almacenamiento, la vida media de los pigmentos carotenoides (astaxantinas) estuvo determinada por la temperatura.

4.4.2. Oxidación lipídica

Los cambios en los índices de peróxidos (IP) del aceite sin y con pigmentos carotenoides, se presentan en las Figuras 17 y 18.

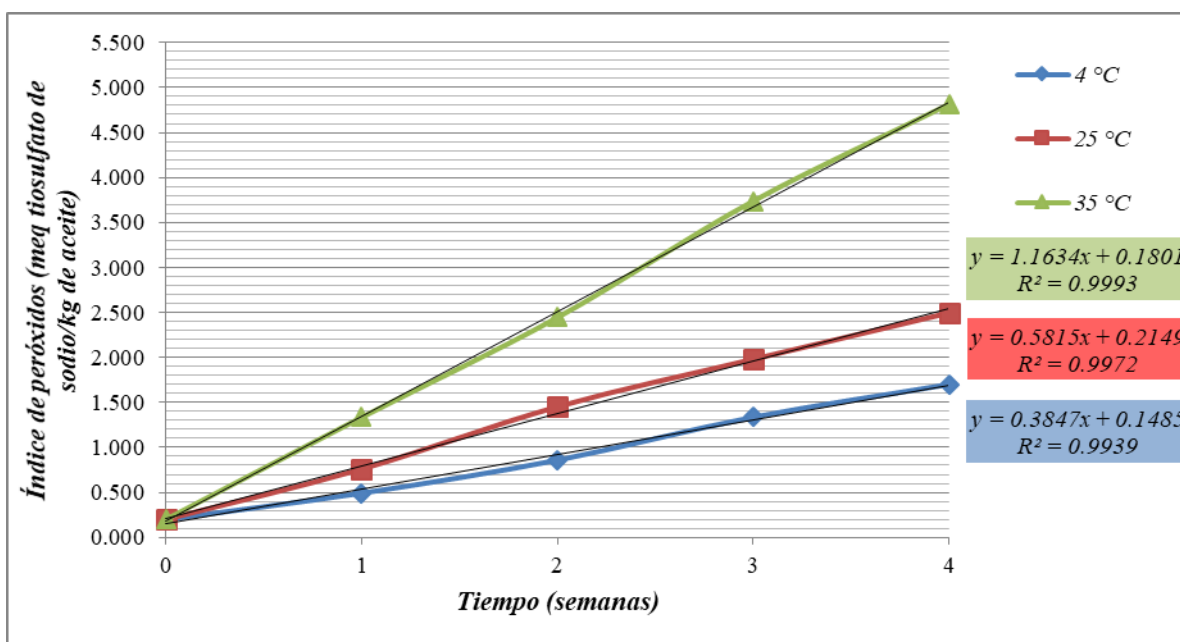


Figura 17. Gráficos cinéticos de orden cero de la oxidación lipídica en el aceite de soya sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas

Los hidroperóxidos son los productos primarios de la oxidación lipídica, y un indicador para cuantificarlos, es la rancidez oxidativa (Baduí-Dergal, 2006). Los resultados indicaron que el IP se incrementó con el paso del tiempo y con el aumento de las temperaturas; observándose un incremento continuo en ambas muestras de aceite, bajo las temperaturas

manejadas durante el periodo evaluado de 1 mes. Para ambas muestras de aceites, se cumplió que el grado de oxidación fue mayor a temperaturas cada vez mayores; mostrándose un menor grado en las muestras almacenadas a 4 y 25°C, y a la temperatura de 35°C uno mucho mayor, por lo cual, la determinación del IP para ambas muestras de aceite permitió conocer la actividad antioxidante de los pigmentos carotenoides obtenidos del cefalotórax de camarón.

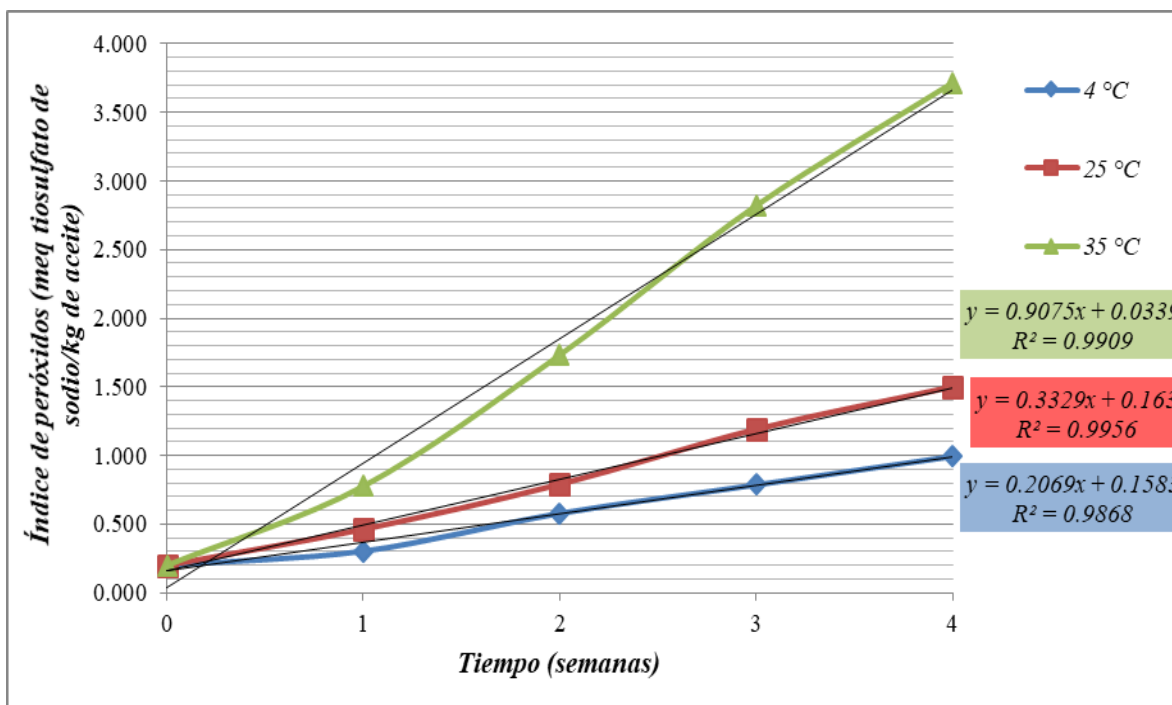


Figura 18. Gráficos cinéticos de orden cero de la oxidación lipídica en el aceite de soja con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas

Los resultados mostrados en las Tablas 14 y 15, muestran que la presencia de los pigmentos carotenoides en el aceite de soja disminuye la velocidad del proceso de oxidación.

Tabla 14. Oxidación lipídica del aceite de soja sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas

Temperatura de almacenamiento (°C)	Índice de peróxidos (meq de tiosulfato de sodio/kg de aceite)				
	Semana				
	0	1	2	3	4
4	0.200 ^{±0.025}	0.492 ^{±0.028}	0.859 ^{±0.037}	1.337 ^{±0.048}	1.701 ^{±0.047}
25	0.200 ^{±0.025}	0.759 ^{±0.031}	1.453 ^{±0.029}	1.980 ^{±0.044}	2.497 ^{±0.039}
35	0.200 ^{±0.025}	1.335 ^{±0.030}	2.445 ^{±0.033}	3.739 ^{±0.044}	4.815 ^{±0.041}

Tabla 15. Oxidación lipídica del aceite de soya con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas

Temperatura de almacenamiento (°C)	Índice de peróxidos (meq. de tiosulfato de sodio/kg de aceite)				
	Semana				
	0	1	2	3	4
4	0.200 ^{±0.025}	0.303 ^{±0.026}	0.578 ^{±0.029}	0.786 ^{±0.034}	0.993 ^{±0.033}
25	0.200 ^{±0.025}	0.463 ^{±0.023}	0.790 ^{±0.032}	1.191 ^{±0.030}	1.501 ^{±0.038}
35	0.200 ^{±0.025}	0.776 ^{±0.025}	1.732 ^{±0.032}	2.821 ^{±0.039}	3.715 ^{±0.031}

En cuanto al comportamiento cinético de la reacción de oxidación, éste se ajustó a uno de orden cero, es decir, que la velocidad de la reacción fue directamente proporcional a la concentración de un único reactivo (en este caso, los compuestos oxidados), de la misma manera que los autores Gómez-Alonso y col. (2004) lo establecieron.

Debe aclararse que, la velocidad de oxidación puede depender de diversos factores como son la temperatura, la presencia de inhibidores o catalizadores, la naturaleza del medio de reacción, etc. (Baduí-Dergal, 2006). La velocidad de la oxidación lipídica (k) en la muestra de aceite sin pigmentos carotenoides presentó un aumento de 0.385 a 1.163 cuando la temperatura se incrementó de 4 hasta 35°C (Tabla 16).

Tabla 16. Cinéticas de oxidación lipídica del aceite de soya sin pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno

Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)	R ²	*t (días)
4	0.385	0.9939	34
25	0.582	0.9972	21
35	1.163	0.9993	11
Ea (kJ/mol)	23.25		

* Tiempo en el que alcanza el límite máximo permisible establecido por la NMX-F-252-1985, (DOF, 1985) para el índice de peróxidos en aceite comestible de soya (2 meq/kg). Constante de velocidad de degradación (k), Energía de activación (E_a)

Por otro lado, la k obtenida en el aceite con los pigmentos carotenoides (astaxantinas) presentó un aumento de 0.207 a 0.908 bajo el mismo incremento de temperatura y en el mismo periodo de un mes (Tabla 17). A pesar de que la muestra de aceite con pc presentó un incremento conforme transcurrió el tiempo, las velocidades de oxidación k fueron menores para las tres temperaturas (4, 25 y 35°C); observándose en la Figura 18 valores de las pendientes menores que las de la Figura 17.

Tabla 17. Cinéticas de oxidación lipídica del aceite de soya con pigmentos carotenoides a diferentes temperaturas y al contacto con el oxígeno

Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)	R ²	*t (días)
4	0.207	0.9868	62
25	0.333	0.9956	39
35	0.908	0.9909	15
Ea (kJ/mol)	30.62		

* Tiempo en el que alcanza el límite máximo permisible establecido por la NMX-F-252-1985, (DOF, 1985) para el índice de peróxidos en aceite comestible de soya (2 meq/kg). Constante de velocidad de degradación (k), Energía de activación (E_a)

Evidentemente al presentar una mayor velocidad de oxidación las muestras de aceite sin pigmentos carotenoides fueron aquellas que superaron con mayor rapidez el LMP (límite máximo permisible) establecida por la normativa mexicana. Para el aceite sin pc se obtuvo que el LMP fue superado después de 34, 21 y 11 días, a las temperaturas de 4, 25 y 35°C respectivamente; mientras que para el aceite con pigmentos carotenoides después de 62, 39 y 15 días se superó este límite para las temperaturas de 4, 25 y 35°C, respectivamente.

El gráfico de Arrhenius para la oxidación lipídica en el aceite sin pc y con pc se muestra en la Figura 19, obteniéndose coeficientes de correlación (R²) de 0.868 y 0.826, respectivamente. Posiblemente se requiriera emplear un mayor número de tratamientos para mejorar la linealidad de los gráficos. A partir de este gráfico fueron obtenidas las energías de activación (E_a), encontrando, que la energía mínima requerida para que las reacciones de oxidación ocurrieran en el aceite con pigmentos carotenoides fue mayor que la requerida en el aceite sin pc, 30.62 y 23.25 kJ/mol, respectivamente (Ver Tablas 16 y 17). Lo anterior indica que los pigmentos carotenoides están cumpliendo un efecto inhibitor de la oxidación, es decir, actúan como un agente antioxidante.

Las E_a obtenidas fueron muy similares a las reportadas por Takeungwongtrakul (2013) y Sathivel y col. (2008), 21.59 kJ/mol y 33.20 kJ/mol, respectivamente. En los estudios realizados por Pu y col. (2010), en aceite de lino adicionado con astaxantina, se requirió de una mayor E_a que en el aceite que no lo contenía, siendo de 93.37 y 68.97 kJ/mol, respectivamente.

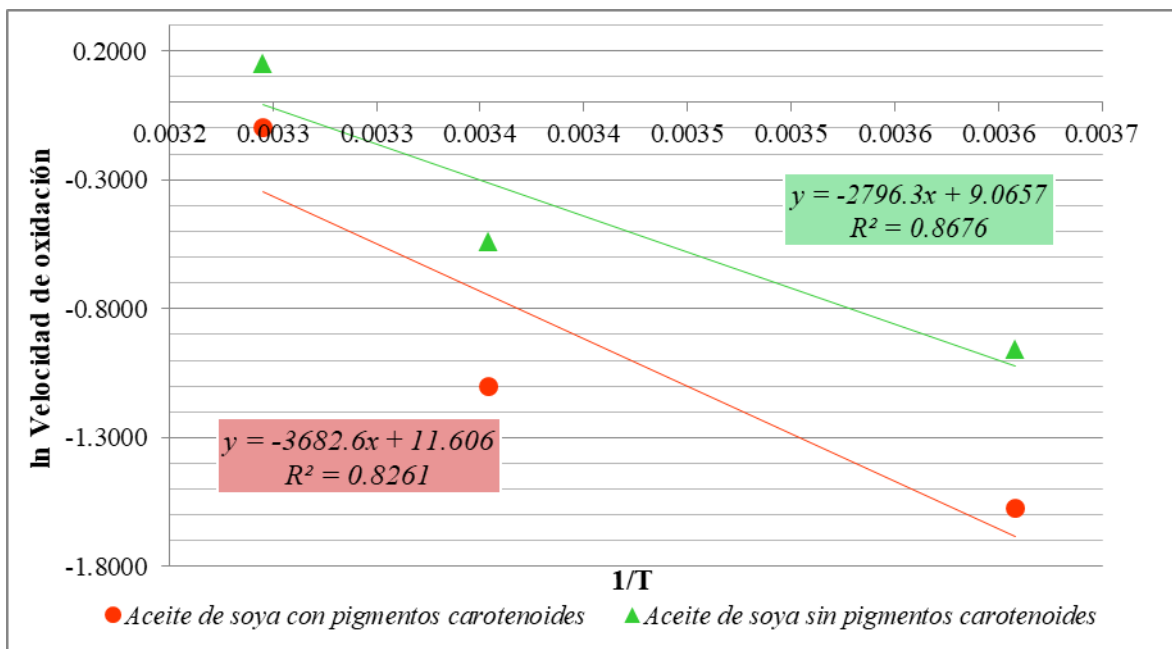


Figura 19. Gráfico de Arrhenius para la oxidación lipídica del aceite con y sin pigmentos carotenoides

4.5. Quinta etapa: Evaluación sensorial

En la Tabla 18 se aprecia la formulación final empleada para la elaboración de dos muestras de salsas de chile de árbol.

Tabla 18. Formulación de la salsa

Ingrediente	Cantidad (g)	Porcentaje (%)
*Aceite de soja	200.00	65.60
Cacahuete	50.00	16.40
Chile de árbol	15.32	5.02
Chile morita	8.40	2.76
Vinagre	9.22	3.02
Jugo de limón	7.00	2.30
Orégano	1.56	0.51
Sal	13.40	4.39
Total	304.90	100.00

*M₁: Aceite de soja sin pigmentos carotenoides, M₂: Aceite de soja con pigmentos carotenoides

La muestra 1 (M₁) fue elaborada con aceite de soja normal (sin adición de pigmentos carotenoides), mientras que la muestra 2 (M₂), fue elaborada con aceite de soja en el cual se extrajeron los pigmentos carotenoides del camarón. Para ello se empleó harina de

camarón previamente desmineralizada en una relación (1:10) a temperatura ambiente y con 20 minutos de agitación.

Para homogeneizar el grado de acidez de ambas salsas se ajustó el pH de ambas muestras utilizando vinagre y jugo de limón, hasta un pH de 5.4 ± 0.9 ; ya que se ha encontrado que la astaxantina presenta buena estabilidad en intervalos de pH de 5-7 (Herrera-Andrade y col., 2011).

Los resultados obtenidos de las pruebas afectivas siempre permiten conocer la aceptación, rechazo, preferencia o nivel de agrado de uno o varios productos. Específicamente, las pruebas escalares de tipo afectivo son las que se utilizan con el propósito de conocer el nivel de agrado o desagrado de un producto. Estas pruebas tienen gran aplicación práctica, son fáciles de interpretar y los resultados que de ellas se obtienen, permiten tomar acciones importante con base en la venta del producto, posibles cambios en su formulación, etc. (Manfugás, 2007).

En el Anexo 2 (Apéndice 3), se muestran los resultados obtenidos de los análisis de varianza, andeva (*ANOVA* en inglés) para cada atributo sensorial y para la probabilidad de compra, donde:

- H_1 : Existe diferencia significativa ($F_{calculada} > F_{crítica}$)
- H_0 : No existe diferencia significativa ($F_{calculada} < F_{crítica}$)

Para cada uno de los cuatro atributos sensoriales evaluados no se encontraron diferencias significativas entre las muestras. Esto indica que la aplicación del aceite de soya pigmentado en la salsa no resultó diferente del aceite de soya sin pigmentos; ya que como se muestra en la Tabla 18 la formulación para cada salsa fue exactamente la misma, modificándose únicamente el tipo de aceite.

La puntuación promedio obtenida en las muestras para cada atributo resultó muy similar; observándose un nivel de agrado promedio de 7 (“me gusta moderadamente”) en todos los atributos sensoriales. Se observó que la probabilidad de compra promedio para la muestra 2 (salsa con pigmentos carotenoides), fue ligeramente superior a la de la muestra 1 (salsa sin

pigmentos carotenoides); observándose una probabilidad de compra promedio de 2 (“probablemente lo compraría”). Sin embargo, el análisis de varianza mostró que no hubo diferencia significativa en la probabilidad de compra; esto significa que el consumidor compraría indistintamente entre una muestra y otra (Ver Anexo 2, Apéndice 2).

De acuerdo con estos resultados, a continuación se presentan las conclusiones derivadas de ellos y lo que sería pertinente realizar en futuras investigaciones.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La mayor concentración de pigmentos carotenoides en el aceite de soya (extracto oleoso), se consiguió al utilizar harina desmineralizada en una relación 1:10 mediante calentamiento a 80°C; obteniéndose una concentración de 83.724 mg/100 mL.
- La mayor concentración de pigmentos carotenoides por kilogramo de harina, se consiguió al utilizar la harina desmineralizada en una relación 1:30 mediante calentamiento a 80°C; obteniéndose una concentración de 16.647 g/kg.
- Mediante el análisis de varianza de tres factores (tipo de harina, relación harina:aceite y temperatura de extracción) con un nivel de significancia del 0.05 se obtuvo la existencia de diferencias significativas en la concentración de pigmentos carotenoides para cada factor y entre sus interacciones.
- El proceso de desmineralización ácida de la harina de camarón logró una considerable disminución del contenido de cenizas, permitiendo concentrar la grasa y facilitando así la extracción de los pigmentos carotenoides.
- Se determinó que el calentamiento del aceite de soya a 80 y 60°C durante 20 minutos genera una oxidación del 44.65 y 20.12%, respectivamente, con respecto del límite establecido por la NMX-F-252-1985, (DOF, 1985).
- Debido a lo anterior y de acuerdo con la aplicación que se le da al aceite, el método de extracción más viable de los pigmentos carotenoides fue a través de la agitación mecánica a temperatura ambiente.
- Fue posible la identificación de cinco pigmentos carotenoides en las muestras de harina de camarón (luteína, astaxantina libre, cantaxantina, monoésteres de astaxantina y β -caroteno) empleando cromatografía en capa fina.
- Se determinó que el orden de reacción de la oxidación lipídica se ajusta a uno de orden cero (la velocidad de oxidación es directamente proporcional a la concentración de los reactivos) y el de la degradación de los pigmentos carotenoides a uno de primer orden (la velocidad de degradación es independiente de la concentración de los reactivos).
- Se determinó que el grado de oxidación de los lípidos y el nivel de degradación de los pigmentos carotenoides, aumentó conforme se incrementó la temperatura.

- Se observó que la velocidad de oxidación (k) fue mayor en el aceite sin pigmentos carotenoides que en el aceite pigmentado, y que, la energía de activación (E_a) necesaria para oxidar al aceite fue mayor en el aceite que contiene pigmentos carotenoides que en el aceite que no los contiene, lo cual demostró su efecto antioxidante.
- Se encontró que las muestras de salsa elaboradas presentaron un buen nivel de agrado y que la probabilidad de compra de ambas muestras fue alta.
- Se determinó que para los cuatro atributos sensoriales evaluados (color, olor, textura y sabor) no hubo diferencias significativas, al igual que en la probabilidad de compra; por lo tanto, se establece que el consumidor podría elegir indistintamente cualquiera de las dos muestras.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar el tiempo como variable durante la extracción (a temperatura ambiente) y cuantificación de los pigmentos carotenoides, para evaluar la eficiencia en la extracción a diferentes tiempos.
- Secar las cabezas de camarón empleando una estufa de vacío disminuyendo lo más posible las altas temperaturas, para así evitar la degradación de los pigmentos carotenoides.
- Analizar y comparar las muestras de aceite de soya y aceite de soya pigmentado a través de una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Para obtener valores más confiables de los parámetros cinéticos de velocidad de oxidación (k), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), tiempo de oxidación (t_o) y energía de activación (E_a), se recomienda realizar un mayor número de tratamientos con más de tres temperaturas de almacenamiento.

ANEXO 1

Análisis bromatológico (metodologías)

A.1.1. Determinación de humedad por secado en termobalanza (Kirk y col., 1996)

Fundamento

Este método se basa en evaporar, de manera continua, la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de masa, hasta que la muestra se sitúe a masa constante. El error de pesado en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente.

Procedimiento

Colocar la charola en espacio destinado para ello en la termobalanza y encender el equipo. Pesar de 8 a 10 g de muestra en la charola de aluminio formando una capa lo más homogénea posible. Registrar la pérdida de masa o, en su caso, el porcentaje de humedad (según el equipo) después de 10-15 minutos, o bien cuando ya no haya variación en la lectura.

A.1.2. Determinación de cenizas (Kirk y col., 1996)

Fundamento

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

Procedimiento

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

Llevar el crisol a una mufla, 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 (g)

B: Masa del crisol vacío a masa constante (g)

M: Masa de la muestra (g)

A.1.3. Determinación de proteína (AOAC, 2001)

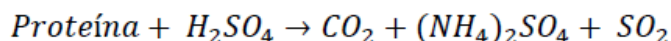
Fundamento

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 dióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en dióxido de azufre, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

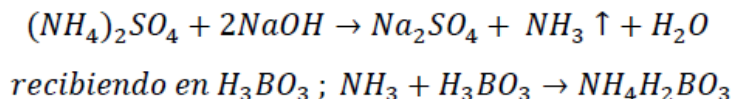
El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método, de Kjeldahl-Gunning,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

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas y reacciones químicas:

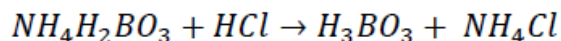
a) Digestión



b) Destilación



c) Titulación



Procedimiento

a) Digestión

1. Pesar de 0.1-0.2 g de muestra e introducir en un tubo Kjeldahl, agregar 0.15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio y 10mL de ácido sulfúrico concentrado.
2. Encender el aparato y precalentar a la temperatura de 360°C. Colocar los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl y colocarlo en el bloque de calentamiento.
3. Ajustar la unidad de evacuación de gases con las juntas colocadas sobre los tubos de digestión.
4. Accionar la trampa de succión de gases antes de que se produzcan éstos. Calentar hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido quede transparente, con una coloración azul verdosa.
5. Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases, colgar el portatubos para enfriar.
6. Después del enfriamiento, desconectar la trampa.

b) Destilación

1. En un matraz Erlenmeyer de 250mL adicionar (según se indique) 50 mL de HCl 0.1 N y unas gotas de indicador rojo de metilo 0.1%, o bien 50 mL de ácido bórico al 4% con indicadores.
2. Conectar el equipo de destilación y esperar unos instantes para que se genere vapor.
3. Colocar el tubo de digestión con la muestra diluida y las sales disueltas en un volumen no mayor de 10 mL de agua destilada, en el aparato de destilación cuidando de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

4. Adicionar hidróxido de sodio al 36% (hasta 40 mL aproximadamente). Encender el equipo de destilación hasta alcanzar un volumen de destilado en el matraz Erlenmeyer de 100-150 mL, lavar la alargadera con agua destilada, recoger el agua de lavado sobre el destilado. Una vez finalizada la destilación, regresar la palanca de vapor a la posición original.

c) Titulación

1. Titular el exceso nitrógeno amoniacal con una disolución de HCl 0.1 N.

Cálculos

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

donde:

V: Volumen real de ácido empleado en la titulación, es decir, restando error con blanco (mL).

N: Normalidad del HCl

M: Masa de la muestra (g)

F: Factor de conversión de nitrógeno proteínico

A.1.4. Determinación de grasa bruta por el método Soxhlet (James, 1995)

Fundamento

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

Procedimiento

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

Cálculos

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

donde:

A: Masa del matraz + grasa (g)

B: Masa del matraz vacío a masa constante (g)

M: Masa de la muestra (g)

A.1.5. Determinación de fibra dietética total (Sigma, 2002)

Fundamento

La fibra dietética es una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inicialmente se define como restos de células de plantas resistentes a la hidrólisis por las enzimas de hombre. Esta

definición fue modificada para incluir las hemicelulosas, celulosas, ligninas, pectinas, gomas, oligosacáridos no digeribles y ceras.

Este ensayo determina el contenido total de fibra dietética de los alimentos mediante una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras secas y libres de grasa son digeridas enzimáticamente con la proteasa para eliminar la proteína presente en la muestra (no se emplean las enzimas amiloglucosidasa y alfa amilasa debido a que la muestra contiene menos del 2% de almidón). Se añade etanol para precipitar la fibra dietética soluble. El residuo se filtra y se lava con etanol y acetona. Después del secado, se pesa el residuo. La mitad de las muestras son analizadas para las proteínas y la otra mitad son incineradas. La fibra dietética total es la masa de los residuos, menos la masa de la proteína y cenizas.

Procedimiento

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 P1. Almacenar en el desecador hasta su uso.
3. Pesar 1 gramo de muestra en vaso de precipitados de 250 mL. Las muestras no deben diferir en sus masas en más de 20 mg. Registrar la masa de cada una de las muestras.
4. 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.
5. Inmediatamente antes de su uso, preparar una solución de proteasa cuya concentración sea 50 mg/mL, empleando solución amortiguadora de fosfatos como disolvente. Añadir 0.1 mL de esta solución a cada uno de los vasos de precipitados.
6. 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 de que la temperatura interna haya alcanzado los 60 °C.
7. Retirar los vasos del baño de agua y esperar a que alcancen la temperatura ambiente.
8. Añadir 100 mL de etanol al 95% a cada uno de los vasos de precipitado.

9. Humedecer y redistribuir la cama de celita en cada uno de los crisoles usando etanol al 78%. Aplicar suavemente succión para secar la celita. Mantener la succión suave y cuantitativamente transferir el precipitado y la suspensión de cada vaso de precipitados a su respectivo crisol.
10. Lavar el residuo con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 95% y dos porciones de 10 mL de acetona.
11. Secar los crisoles que contienen el residuo durante 12 horas a 105°C en una estufa convencional o a 70°C en estufa de vacío.
12. Enfriar los crisoles en un desecador y registrar esta masa como “Residuo + Celita + Masa de crisol” o P2.
13. Analizar el residuo de dos muestras y dos blancos para proteínas usando el método de Kjeldahl.
14. Analizar el contenido de cenizas de dos muestras y de dos blancos, registrar esta masa como “Cenizas + Celita + Masa de crisol” o P3.

Cálculos

Masa del residuo= P2-P1

Masa de cenizas= P3-P1

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. EVALUACIÓN SENSORIAL

Apéndice 1. Cuestionario de evaluación sensorial

Edad: _____ Sexo: F / M

- ¿Con qué frecuencia consume salsas?
 - a) 1 vez al día b) 3 o 5 veces a la semana c) 1 vez a la semana
 - d) 1 vez cada quince días e) 1 vez al mes

- ¿Las salsas que consume son caseras o provienen de tiendas de autoservicio?

- ¿Acostumbra consumir salsas base aceite (ejemplo: salsa macha)?
 - a) Sí b) No

A continuación se le presentan 2 muestras de salsas, marque en la hoja el código correspondiente a la muestra y proceda con la evaluación de cada atributo en el orden que se presentan en la tabla.

Seleccione con una X el nivel de agrado para cada atributo sensorial.

Puntuación	Nivel de agrado	Código de muestra:				Código de muestra:			
		_____				_____			
		Color	Olor	Textura	Sabor	Color	Olor	Textura	Sabor
9	Me gusta muchísimo								
8	Me gusta mucho								
7	Me gusta moderadamente								
6	Me gusta poco								
5	Ni me gusta ni me disgusta								
4	Me disgusta poco								
3	Me disgusta moderadamente								
2	Me disgusta mucho								
1	Me disgusta muchísimo								

- Con base a lo percibido sensorialmente, seleccione la muestra que más haya sido de su agrado

Código de muestra: _____

- De manera general y según su preferencia, ¿Qué tan seguro estaría de comprar las muestras que se le presentaron?

Puntuación	Posibilidad de compra	Código de muestra: _____	Código de muestra: _____
1	Definitivamente lo compraría		
2	Probablemente lo compraría		
3	No estoy seguro		
4	Probablemente no lo compraría		
5	Definitivamente no lo compraría		

- ¿Cambiaría su probabilidad de compra, si supiera que las salsas contienen pigmentos carotenoides naturales (antioxidantes)?

a) Sí b) No

- Por último ¿Tiene alguna observación y/o recomendación sobre las muestras de salsa elaboradas?

Código de muestra: _____

Código de muestra: _____

¡GRACIAS!

Apéndice 2. Resultados de evaluación sensorial

Tabla A2.2.1. Escala hedónica (verbal) de 9 puntos empleada en las evaluaciones sensoriales

Puntuación	Nivel de agrado
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta moderadamente
6	Me gusta poco
5	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me disgusta poco
3	Me disgusta moderadamente
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

Tabla A2.2.2. Escala de 5 puntos empleada para determinar la probabilidad de compra

Puntuación	Posibilidad de compra
1	Definitivamente lo compraría
2	Probablemente lo compraría
3	No estoy seguro
4	Probablemente no lo compraría
5	Definitivamente no lo compraría

Tabla A2.2.3. Niveles de agrado promedio obtenidos para cada atributo sensorial en las dos muestras de salsa elaboradas

Muestra	1				2			
	Color	Olor	Textura	Sabor	Color	Olor	Textura	Sabor
Atributo sensorial								
Puntuación promedio	7.01	7.45	6.70	6.92	7.31	7.52	6.94	7.07

*M₁: Salsa sin pigmentos carotenoides, M₂: Salsa con pigmentos carotenoides

Tabla A2.2.4. Probabilidad de compra promedio para cada muestra de salsa

Muestra	Probabilidad de compra promedio
1	2.24
2	2.45



Figura A2.2.1. Evaluación de color en la salsa con pigmentos carotenoides



Figura A2.2.2. Evaluación de color en la salsa sin pigmentos carotenoides

Olor

Salsa con pigmentos carotenoides (n=101)

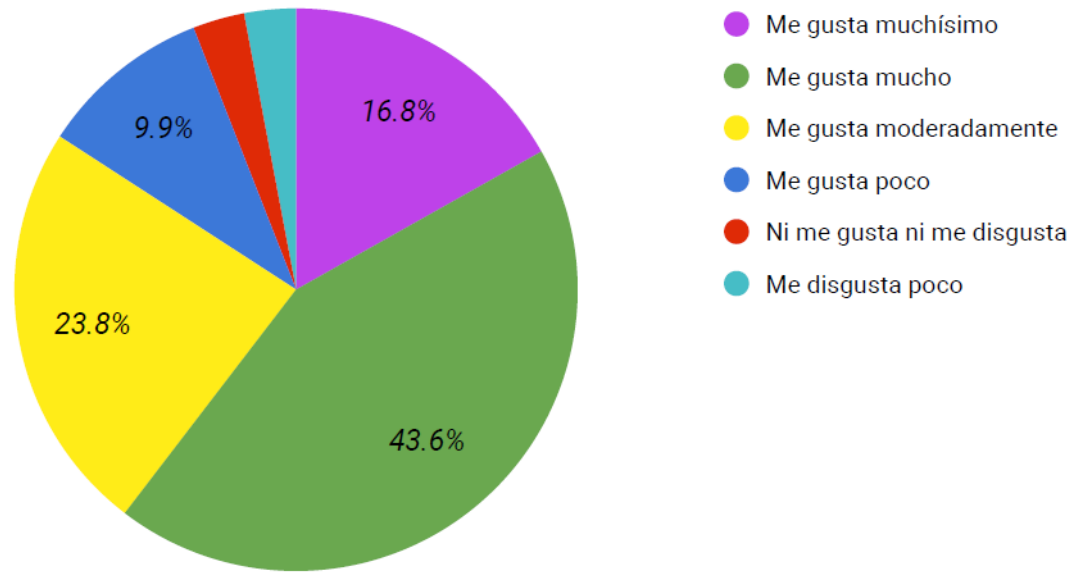


Figura A2.2.3. Evaluación de olor en la salsa con pigmentos carotenoides

Olor

Salsa sin pigmentos carotenoides (n=101)

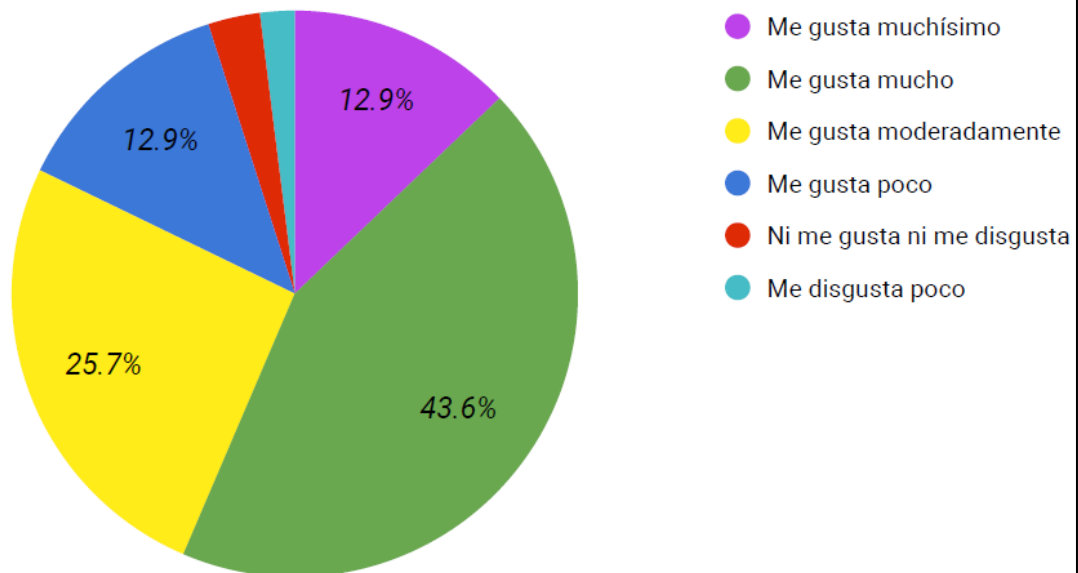


Figura A2.2.4. Evaluación de olor en la salsa sin pigmentos carotenoides

Textura

Salsa con pigmentos carotenoides (n=101)

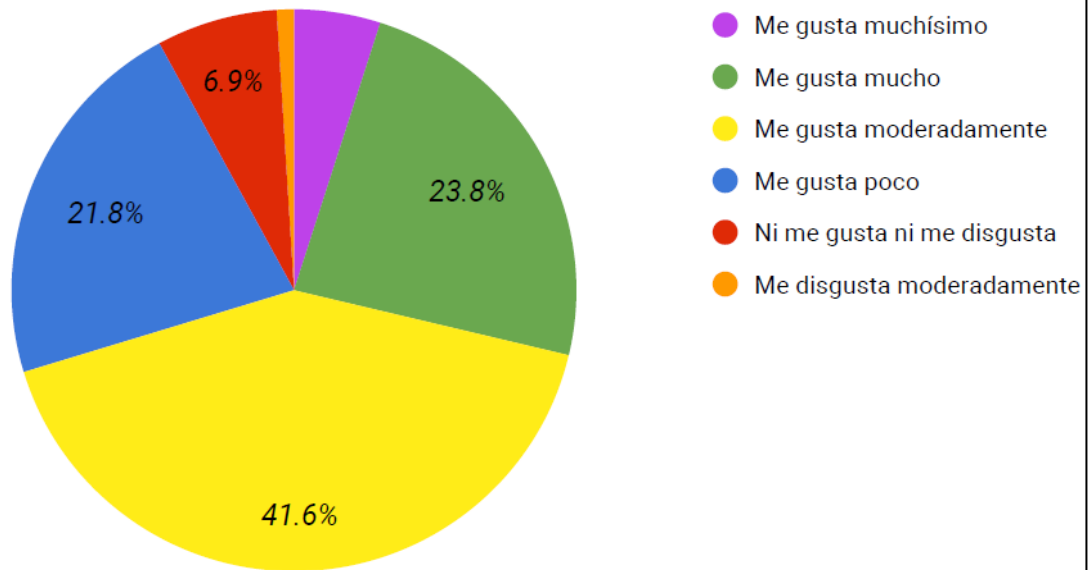


Figura A2.2.5. Evaluación de textura en la salsa con pigmentos carotenoides

Textura

Salsa sin pigmentos carotenoides (n=101)

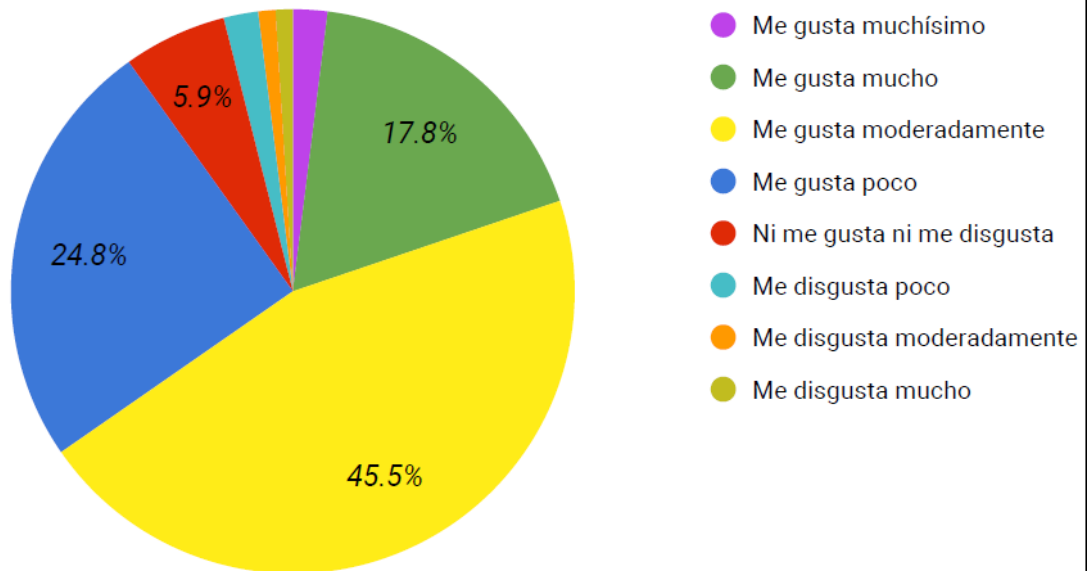


Figura A2.2.6. Evaluación de textura en la salsa sin pigmentos carotenoides

Sabor

Salsa con pigmentos carotenoides (n=101)

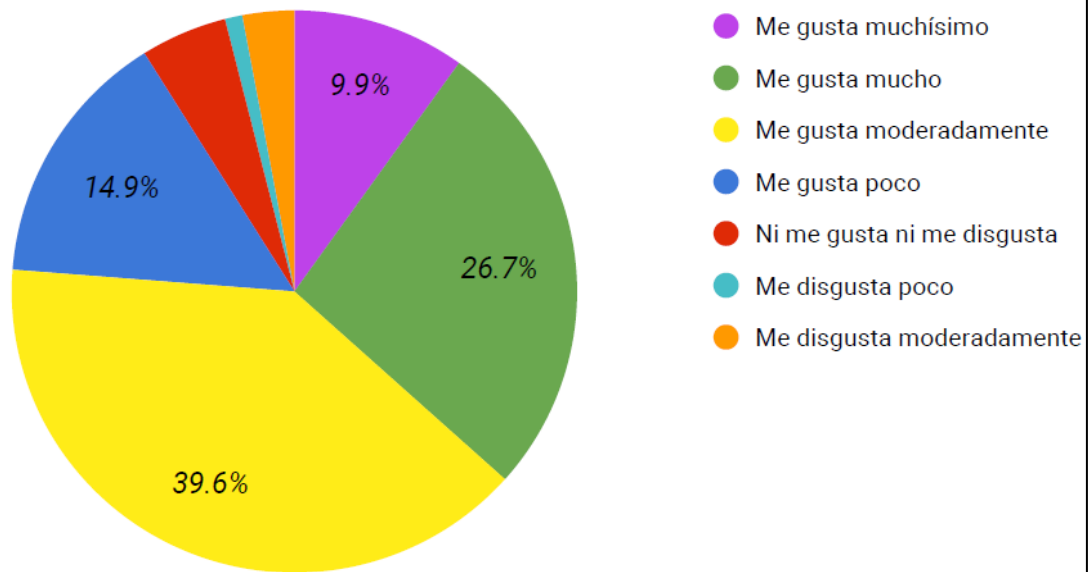


Figura A2.2.7. Evaluación de sabor en la salsa con pigmentos carotenoides

Sabor

Salsa sin pigmentos carotenoides (n=101)

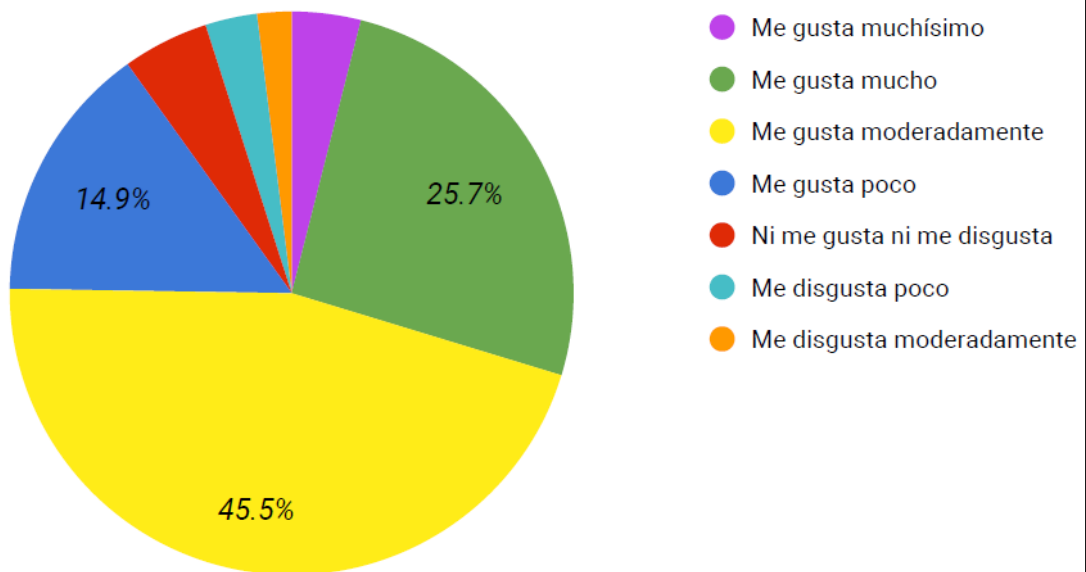


Figura A2.2.8. Evaluación de sabor en la salsa sin pigmentos carotenoides

Probabilidad de compra

Salsa con pigmentos carotenoides (n=101)

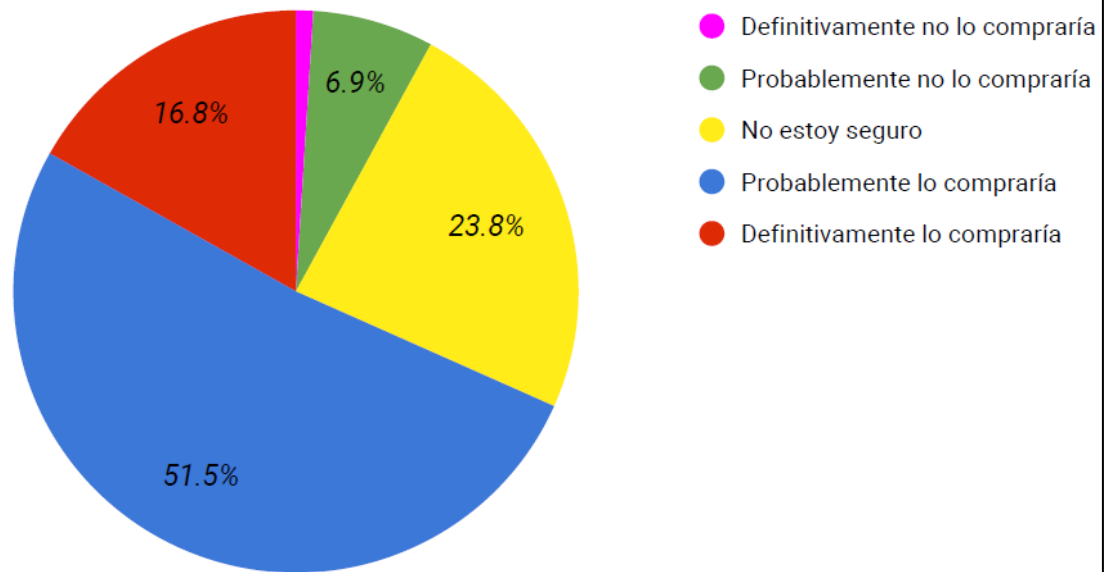


Figura A2.2.9. Probabilidad de compra de la salsa con pigmentos carotenoides

Probabilidad de compra

Salsa sin pigmentos carotenoides (n=101)

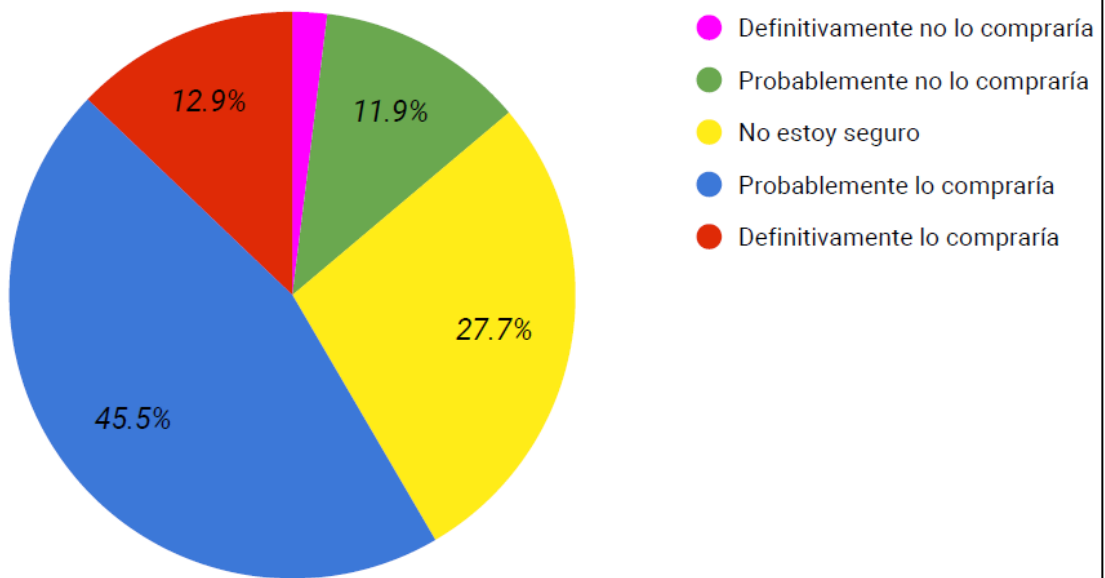


Figura A2.2.10. Probabilidad de compra de la salsa sin pigmentos carotenoides

Apéndice 3. Análisis de varianza de evaluación sensorial

Tabla A2.3.1. Análisis de varianza (ANOVA en inglés) para el color de las salsas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	4.805	1	4.81	3.75	0.0541	3.89	H ₀
Dentro de los grupos	253.39	198	1.28				
Total	258.195	199					

Tabla A2.3.2. Análisis de varianza (ANOVA en inglés) para el olor de las salsas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	0.605	1	0.605	0.4882	0.4855	3.89	H ₀
Dentro de los grupos	245.39	198	1.24				
Total	245.995	199					

Tabla A2.3.3. Análisis de varianza (ANOVA en inglés) para la textura de las salsas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	2.88	1	2.88	2.4438	0.1196	3.89	H ₀
Dentro de los grupos	233.34	198	1.18				
Total	236.22	199					

Tabla A2.3.4. Análisis de varianza (ANOVA en inglés) para el sabor de las salsas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	0.72	1	0.72	0.4997	0.4804	3.89	H ₀
Dentro de los grupos	285.26	198	1.44				
Total	285.98	199					

Tabla A2.3.5. Análisis de varianza (ANOVA en inglés) para la probabilidad de compra

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	2	1	2	2.4924	0.1160	3.89	H ₀
Dentro de los grupos	158.88	198	0.802				
Total	160.88	199					

ANEXO 3. ACERVO FOTOGRÁFICO



Figura A3.1. Muestra de cabeza de camarón



Figura A3.2. Cabezas de camarón secas



Figura A3.3. Molienda de la cabeza de camarón seca



Figura A3.4. Harina de camarón entera seca



Figura A3.5. Harina tamizada de camarón (malla 40,80 y base)



Figura A3.6. Determinación de humedad por termobalanza



Figura A3.7. Determinación de cenizas



Figura A3.8. Cenizas de muestra de camarón



Figura A3.9. Desmineralización de harinas con ácido acético glacial



Figura A3.10. Lavado y filtrado de harina de camarón desmineralizada



Figura A3.11. Harina desmineralizada de camarón lavada y seca



Figura A3.12. Determinación de grasa por el método de Soxhlet



Figura A3.13. Determinación de proteína por el método de Kjeldahl

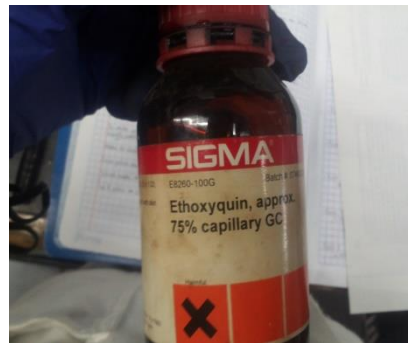


Figura A3.14. Etoxiquin^{MR}

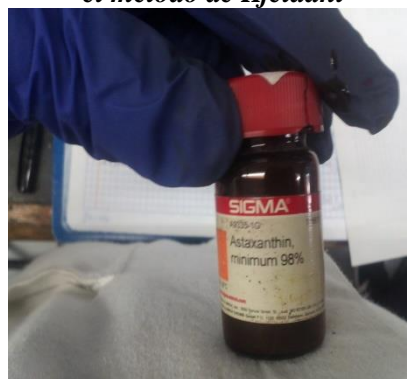


Figura A3.15. Estándar de Astaxantina^{MR}



Figura A3.16. Solución patrón de astaxantina



Figura A3.17. Extracción de pigmentos carotenoides



Figura A3.18. Centrifugado de las muestras

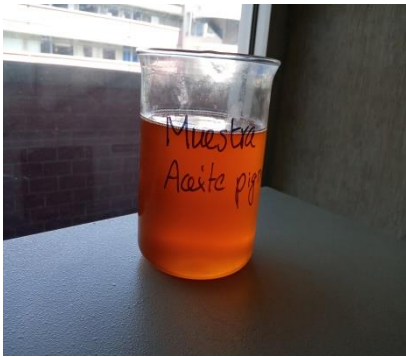


Figura A3.19. Muestra de aceite de soya con pigmentos carotenoides



Figura A3.20. Muestras de aceite de soya con y sin pigmentos carotenoides

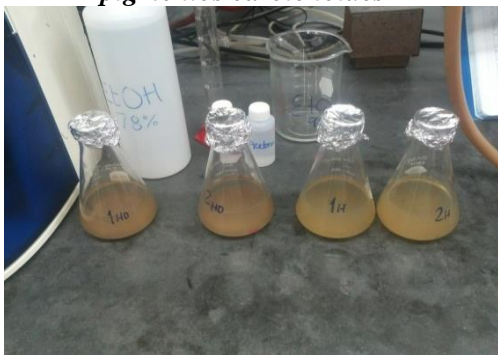


Figura A3.21. Determinación de fibra dietética total

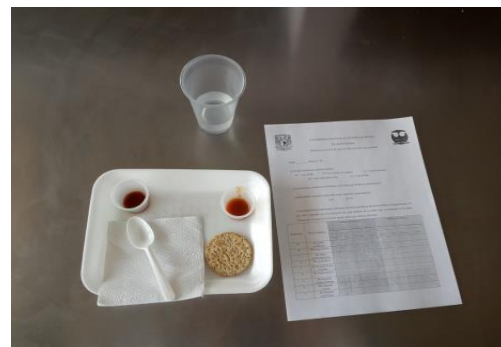


Figura A3.22. Cuestionario y muestras evaluadas

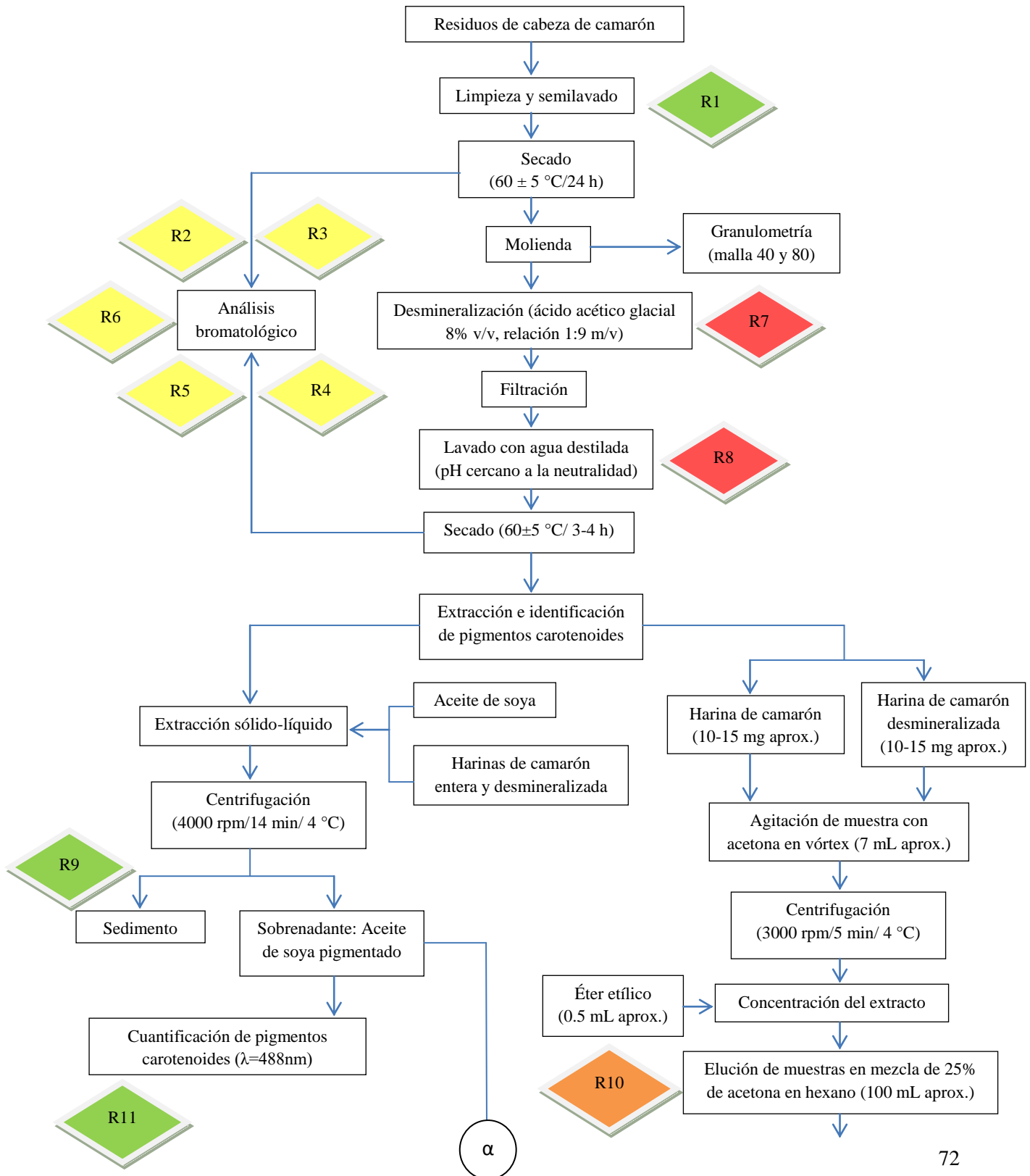


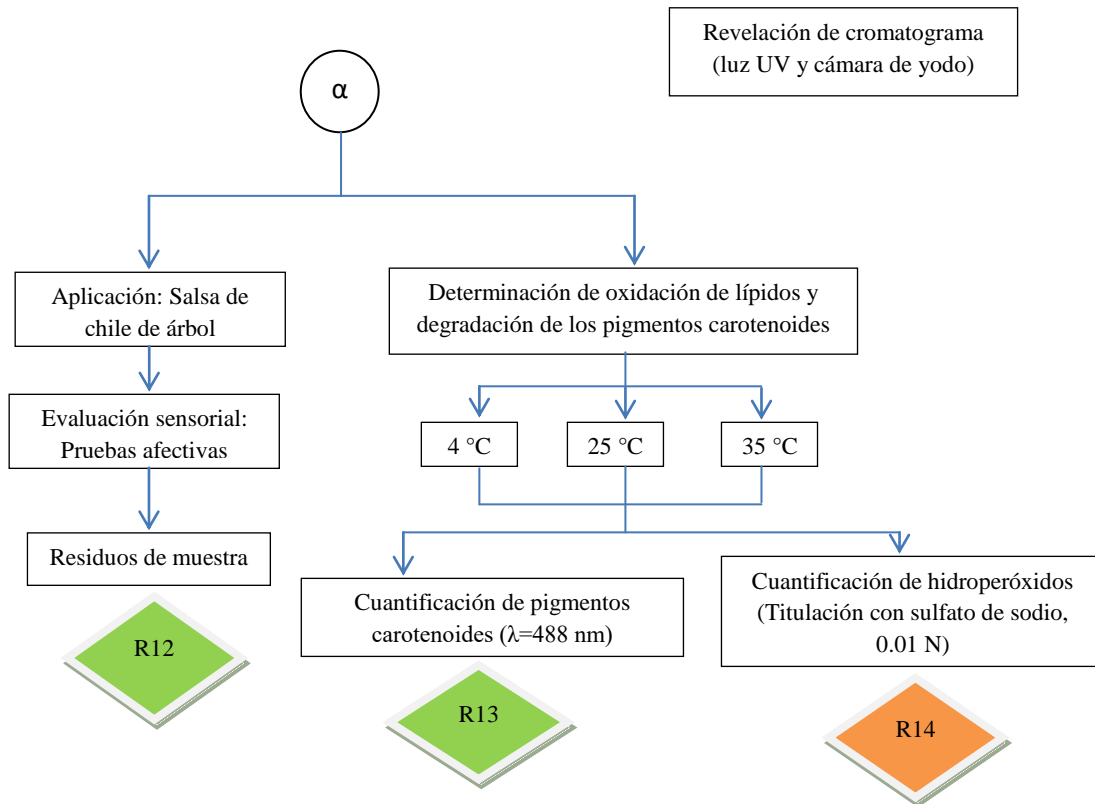
Figura A3.23. Evaluación sensorial preliminar



Figura A3.24. Evaluación sensorial final

ANEXO 4. TRATAMIENTO DE RESIDUOS PRODUCIDOS EN ESTA INVESTIGACIÓN





R1, R9, R11, R12 y R13: Residuos orgánicos no peligrosos. Se envían a disposición para producir composta o se desechan de forma adecuada en la basura orgánica.

R2: El residuo de cenizas (residuo inorgánico no peligroso) se desecha de forma adecuada en la basura.

R3: Una vez titulado con HCl y neutralizado el residuo de nitrógeno amoniacal, se vierte en la tarja.

R4: H₂SO₄, CuSO₄.5H₂O, Na₂SO₄, NaOH, muestra de camarón. 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).

R5: Éter etílico, grasa. Se recupera el éter de petróleo a través de un evaporador rotatorio al vacío.

R6: 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)

R7 y R8: Una vez neutralizado el residuo de ácido acético, se vierte en la tarja.

R10 y R14: Se acondicionaron para su envío a través de la colecta de residuos de la UGA (Unidad de Gestión Ambiental de la FQ-UNAM). El acondicionamiento de estos residuos consistió en el envasado de los mismos y el etiquetado en el cual se especificó la naturaleza química del compuesto así como el nombre de la persona que lo generó entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameh, A. O., Abutu, D., Isa, M. T., Rabi, U. 2014. Kinetics of demineralization of shrimp shell using lactic acid. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*. 24: 13-22.
- AOAC. 2001. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. Vol. 2, Parte 2. 17. Ed. AOAC. 1417 págs. Washington, D.C., EE.UU.
- Armenta, R. Guerrero, I., Huerta, S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*. 67(2): 1002-1006.
- Baduı-Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos*. 4^a ed. Pearson. Ciudad de México, México.
- Chen, H. M., Meyers, S. P. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*. 47: 892-896.
- CONAPESCA. 2017. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Mazatlán Sinaloa, México. Disponible en: https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf. Último acceso: 07/06/2019.
- Dermiş, S., Can, S., Doğru, B. 2012. Determination of peroxide values of some fixed oils by using the mFOX method. *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*. 45(5): 359-363.
- DOF. 2018. Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). Documento emitido por el Diario Oficial de la Federación (Segunda Sección). Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308082/02camaron_blanco_pacifico.pdf.

Último acceso: 7/06/2019.

- DOF. 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal: El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. *Diario Oficial de la Federación*: jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. México D.F., México.
- DOF. 1985. Normas mexicanas. NMX-F-252-1985. Alimentos. Aceite comestible puro de soya. Dirección General de Normas. De las fuentes internacionales de internet: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-252-1985.PDF>. [Último acceso: 12 de abril del 2019].
- Eldred, B., Hutton, R. F. 1960. On the grading and identification of domestic commercial shrimps (Family Penaeidae) with a tentative world list of commercial Penaeids. *Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences*. 23(2):89-118.
- Espinosa, P. A., Bermúdez, A. M. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo*. 2:219-232.
- FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Roma, Italia.
- Farhoosh, R., Hoseini-Yazdi, S. 2014. Evolution of oxidative values during kinetic studies on olive oil oxidation in the Rancimat test. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 91:281-293.

- FIRA. 2009. *Situación Actual y Perspectivas del Camarón en México*. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Boletín Informativo Núm. 3. p. 11. Ciudad de México, México.
- Gildberg, A., Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 46:897-930.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Desamparados-Salvador, M., Fregapane, G. 2004. Oxidation kinetics in olive oil triacylglycerols under accelerated shelf-life testing (25-75°C). *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 106: 369-375.
- Grung, M., D'Souza, F. M. L., Borowitzka, M., Liaaen-Jensen, S. 1992. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.* 4: 165-171.
- Gulzar, S., Benjakul, S. 2018. Effect of pre-treatments on yield and properties of lipid extracted from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ultrasonic assisted process. *Journal of Food Science and Technology*. 100: 106-113.
- Gunalan, B., Nina, T. S., Soundarapandian, P., Anand, T. 2013. Nutritive value of cultured white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. 5(7):166-171.
- Herrera-Andrade, M. H., Sánchez-Manchado, D. I., López-Cervantes, J., Núñez-Gastelum, J.A, Moreno-Ramos, O. H. 2011. Extacción de la astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 7(1): 21-27.
- Hidalgo-Zambrano, M. 1997. *Efecto de la composición nutricional de artemia enriquecida en la reproducción de Penaeus vannamei*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Quito, Ecuador.

- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M. 2006. *Astaxanthin: A review of its chemistry and applications*. Critical Reviews in Food Science. Taylor and Francis Group. Pp. 188. EE.UU.
- James, C. S. 1995. *Analytical Chemistry of Foods*. Londres: Editorial Blackie Academic and Professional. Londres, Inglaterra.
- Kirk, R. S., Sawyer, R., Egan, H. 1996. *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. 2^a ed. Compañía editorial continental. S.A. de C.V. Ciudad de México. México.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*. 45(1):114-122.
- Lim, C., Sessa, D. J. 1995. *Nutrition and utilization in aquaculture*. Capítulo 21. Further utilization of seafood discards. Editorial AOCS. Champaigne, Illinois. EE.UU.
- Luna-Rodríguez, A. 2003. Extracción con lípidos de los pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su evaluación como ingrediente de dietas en larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. Ciudad de México, México.
- Magaña-Gallegos, E. 2018. Valor nutricional del biofloc sobre la historia nutricional y desempeño reproductivo del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y del camarón rojo del Caribe (*Farfantepenaeus brasiliensis*). Tesis de Doctorado en Ciencias. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. Ciudad de México, México.
- Mandeville, S., Yailayan, V., Simpson, B. 1991. Isolation and identification of carotenoid pigments, lipids, and flavor active components from raw comercial shrimp waste. *Food Biotechnology*. 5(2):185-195.
- Manfugás, J. 2007. *Evaluación sensorial*. Editorial Universitaria. La Habana, Cuba.

- Mathur, N. K., Narang, Ch. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J. Chem. Educ.* 67(11):938-942.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., Heredia, F. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 57(2): 109-117.
- Mendes, T., Andrade, J., Andrade, A. H., Oliveira, J. M., da Conceição M. L. 2013. Flour production from shrimp by-products and sensory evaluation of flour based products. *Scientific Electronic Library Online.* 48(8): 962-967.
- Muzarelli, R. A. A. 1977. Chitin. Pergamon Press. Nueva York, NY, EEUU. Pp. 23-31.
- No, H. K., Meyers, S. P. 1992. Utilization of crawfish processing wastes as carotenoids, chitin and chitosan sources. *J. Korean Soc. Food Nutrit.* 21(3):319-326.
- Oryza Oil & Fat Chemical Co., LTD. 2006. Astaxanthin: Natural Antioxidant for Neuroprotection, Vision Enhancement & Skin Rejuvenation. Disponible en: <http://www.oryza.co.jp/html/english/pdf/Astaxanthin%20ver%201.0%20.pdf>. Último acceso: 11/06/2019.
- Pérez, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Marine Science.* 62(1): 299-301.
- Pignitter, M., Somoza, V. 2012. Critical evaluation of methods for the measurement of oxidative rancidity in vegetable oils. *Journal of Food and Drug Analysis.* 20(4):772-777.
- Pu, J., Sathivel, S. 2011 Kinetics of lipid oxidation and degradation of flaxseed oil containing crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 595-601.

- Puga-López, D., Ponce-Palafox, J.T., Barba-Quintero, G., Torres-Herrera M.R., Romero-Beltrán, E., Arredondo-Figueroa J. L., García-Ulloa, G. M. 2013. Physicochemical, proximate composition, microbiological and sensory analysis of farmed and wild harvested white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) tissues. *Journal of Biological Sciences*. 5(3): 130-135.
- Rao, R., Moi, S., Ravi, S., Gokare, R. 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – A review. *Marine Drugs*. 12: 128-152.
- Rao, A. R. Sarada, R., Ravishankar, G. A. 2007. Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *J. Sci. Food Agric*. 87: 957-965.
- Sachindra, N. M., Mahendrakar, N. S. 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*. 96: 1195-1200.
- SAGARPA. 2018. Blog de la SAGARPA. Camarón, producción en crecimiento. Disponible en: <https://www.inforural.com.mx/camaron-produccion-en-crecimiento/>. Último acceso: 10/06/2019.
- Seymour, T. A., Shiao-Jing, L., Morrissey, M. T. 1996. Characterization of natural antioxidant from shrimp shell waste. *J. Food Sci*. 63:491-494.
- Shahidi, F., Brown, J. 1998. Carotenoids pigments in seafood and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science*. 38(1):1-67.
- Sathivel, S., Huang, J., Prinyawiwatkul, W. (2008). Thermal properties and applications of the Arrhenius equation for evaluating viscosity and oxidation rates of unrefined pollock oil. *J Food Eng* 84:187–193.

- Sigma (2002). *Total dietary fiber assay kit*. Product Information. Product codes TDF-100A y TDF-C10. CMH/MAM 4/02. Saint Louis, Missouri, EE.UU.
- Simpson, B. K., Haard, N. F. 1985. *The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes*. *J. Appl. Biochem.* 7(3): 212-222.
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul S., Santoso, J., Trilaksani, W., Nurilmala, M. 2013. Extraction and stability of carotenoid-containing lipids from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Processing and Preservation.* 84: 1-9.
- Tenorio, G. 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 de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México, México.
- Torres, L. 2007. Extracción de caroteno-proteínas de cefalotórax de camarón con aceites comestibles. Tesis de licenciatura de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México, México.
- Yang, S., Zhou, Q., Yang, L., Xue, Y., Xu, J., Xue, C. 2015. Effect of thermal processing on astaxanthin and astaxanthin esters in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oleo Science.* 5: 1-11.
- Young, A., Britton, G. 1993. Carotenoid in photosynthesis. Chapman and Hall. Londres, Inglaterra.