

00528
50

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



**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN
SÓLIDO-LÍQUIDO PARA LA OBTENCIÓN DE PIGMENTOS
CAROTENOIDES A PARTIR DEL CEFALOTÓRAX DE CAMARÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA :

MINERVA SELENE JIMÉNEZ ESPINOSA



MÉXICO, D.F.,



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Dra. Amanda Gálvez Mariscal
VOCAL	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
SECRETARIO	M. en C. Rolando Salvador García Gómez
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. María del Carmen Durán Domínguez de B.

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN:

- (I) Laboratorios E-301 al 303 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA)

- (II) Laboratorios 4-A y 4-B de la Facultad de Química de la UNAM

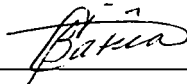
ASESOR DEL TEMA

M. en C. Rolando Salvador García Gómez



SUPERVISORA TÉCNICA


Dra. María del Carmen Durán Domínguez de B.



SUSTENTANTE:

Minerva Selene Jiménez Espinosa



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impres.
contenido de mi trabajo receptor.
NOMBRE: Minerva Selene
Jiménez Espinosa
FECHA: 18/09/03
FIRMA: 

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	2
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos particulares	4
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.1 El camarón	5
2.2 Composición química del camarón	6
2.2.1 Proteínas	8
2.2.2 Sales minerales	9
2.2.3 Quitina y quitosana	9
2.2.4 Pigmentos carotenoides	10
2.2.4.1 Estructura y clasificación de los pigmentos carotenoides	11
2.3 Astaxantina	12
2.3.1 Propiedades químicas de la astaxantina	13
2.3.2 Usos de la astaxantina	15
2.3.3 La astaxantina en la acuicultura	15
2.4 Captura del camarón	16
2.5 Comercialización del camarón	17
2.6 El camarón en México	18
2.7 Extracción sólido-líquido	22
2.8 Aceite de soya	23

ÍNDICE GENERAL

2.8.1 Composición química del aceite de soya	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Obtención de la harina de cefalotórax de camarón	27
3.1.1 Recolección del cefalotórax	27
3.1.2 Lavado	27
3.1.3 Secado	27
3.1.4 Molienda y tamizado	28
3.1.5 Desmineralización	28
3.1.6 Conservación	28
3.2 Caracterización de la harina	29
3.3 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua	30
3.3.1 Purificación e identificación de los pigmentos. Caracterización de la astaxantina	33
3.4 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando aceite de soya	34
3.5 Pruebas de estabilidad	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Obtención de la harina	37
4.2 Caracterización de la harina	38
4.3 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua	41
4.3.1 Purificación y caracterización de la astaxantina.	43
4.3.2 Pruebas de estabilidad de los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes	47

ÍNDICE GENERAL

4.4 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando aceite de soya	48
4.4.1 Pruebas de estabilidad de los pigmentos extraídos con aceite de soya	50
4.5 Rendimiento del proceso de extracción de pigmentos	51
4.6 Estimación preliminar de costos del proceso a nivel de laboratorio	53
4.7 Costo de los pigmentos extraídos	55
4.8 Principales diferencias entre los métodos empleados	57
4.9 Selección del método óptimo para la extracción de pigmentos carotenoides	58
4.9.1 Calidad del producto obtenido	58
(a) Estabilidad	58
(b) Calidad nutrimental	59
(c) Inocuidad de los pigmentos extraídos	59
4.9.2 Rendimiento del producto obtenido	59
4.9.3 Impacto ambiental de los procesos desarrollados	60
5. CONCLUSIONES	61
6. RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO 1. FOTOGRAFÍAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL	70
ANEXO 2. MÉTODOS ESTABLECIDOS PARA REALIZAR EL ANÁLISIS PROXIMAL	72
(a) Determinación de humedad	72
(b) Determinación de cenizas	73
(c) Determinación de fibra cruda	73
(d) Determinación de proteína	75
(e) Determinación de grasa cruda o extracto etéreo	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1 Composición química del camarón	7
Tabla 2-2 Composición de aminoácidos de proteínas provenientes de desechos de camarón	8
Tabla 2-3 Serie histórica de la producción de camarón en peso vivo y peso desembarcado, 1996-2001	19
Tabla 2-4 Serie histórica de la producción de camarón en peso vivo, según entidad federativa, 1996-2001	20
Tabla 2-5 Exportación de productos pesqueros	21
Tabla 3-1 Equipo empleado	26
Tabla 3-2 Reactivos empleados	26
Tabla 4-1 Porcentaje de pérdida de materia en cada etapa del proceso para la obtención de la harina	37
Tabla 4-2 Rendimiento de harina tamizada a partir de 1 Kg de harina	38
Tabla 4-3 Composición de la harina de cefalotórax de camarón malla No.100	39
Tabla 4-4 Cantidad de pigmentos obtenidos empleando la mezcla éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10)	42
Tabla 4-5 Identificación de la astaxantina y otros carotenoides provenientes del extracto etéreo y su comparación con la astaxantina estándar	43
Tabla 4-6 Pruebas de estabilidad en los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes	48
Tabla 4-7 Cantidad de pigmentos obtenidos empleando aceite de soya	49
Tabla 4-8 Pruebas de estabilidad en los pigmentos extraídos con aceite de soya	51
Tabla 4-9 Insumos, tiempo y equipo empleado en cada una de las etapas del proceso de extracción	54
Tabla 4-10 Costo estimado de 100 g de pigmento (extracción con éter de petróleo:acetona:agua)	55
Tabla 4-11 Costo estimado de 100 g de pigmento (extracción con aceite de soya)	56

DEDICATORIAS

DIOS te doy gracias por permitirme concluir satisfactoriamente una de las metas más importantes de mi vida, por estar siempre a mi lado y ayudarme a superar todos y cada uno de los obstáculos presentados.

A mis padres Ma. Esther Espinosa y Gilberto Jiménez por ayudarme a hacer posible un logro más; el cual no será el último pero quizá el más importante. Gracias por la fe que depositaron en mí y por dārmelo todo sin esperar a cambio más que el orgullo de hacer de mí una triunfadora. Gracias porque siempre han estado ahí para apoyarme y han sido un claro ejemplo a seguir. Los amo.

A mis hermanos Ulises, Diana y Alejandro por todo el amor, la paciencia, comprensión y apoyo brindado. Mil gracias.

A mis abuelitos, tíos y primos por su apoyo y amor incondicional.

A tí por todo el apoyo brindado durante gran parte de mi carrera, el amor, la confianza, la paciencia, comprensión y todos los momentos buenos y malos que juntos vivimos, porque siempre estuviste ahí y fuiste un gran aliento e impulso para ver siempre hacia adelante. Gracias por todo.

A mis amigas casi hermanas Karla, Deisy, Perla y Nelly por ser un gran apoyo y ejemplo, por sus consejos y regaños, por estar conmigo en los momentos más difíciles ayudāndome a salir siempre adelante. Gracias por todas las vivencias compartidas, que espero, sigan siendo muchas más. Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química y a la UNAM por su excelente formación académica y porque puedo decir que me siento orgullosa de formar parte de esta gran institución, pues mucho de este logro se lo debo a éstas y a sus profesores de excelente calidad.

Al M. en C. Rolando García Gómez por ser un buen asesor, por su tiempo, paciencia y ayuda brindada en la realización de esta tesis y porque además de ello ha sido como un amigo.

A la Dra.-Ing. Carmen Durán de Bazúa por su apoyo recibido para la realización de esta tesis, así como también, por permitirme trabajar en el PIQAYQA.

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal y a la M. en C. Lucía Cornejo por su tiempo dedicado a la pronta revisión de esta tesis, por sus excelentes recomendaciones y correcciones a este trabajo. Gracias.

A Pavel Castillo por su gran apoyo, tiempo, paciencia, su excelente asesoría en la realización de este trabajo y sobre todo por ser un gran amigo y confidente.

A Miguel Ángel Cruz por su ayuda y asesoría brindada.

Al personal del PIQAYQA en especial a Lorena Núñez, Sra. Irene y Sra. Julia.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de carrera en especial al profesor Carlos Caldera, al Dr. Manuel Stivalet, a las profesoras Rebeca Ugalde y Ma. Elena Villatoro

A los laboratoristas del 4-A y 4-B en especial a la señora Letty por ser una grandísima y bellísima persona.

Al Dr. Britton y a la Dra. Keiko por su asesoría y comentarios.

A Esteban por tu gran amistad y apoyo incondicional, que aunque ya no estemos juntos, siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón. Gracias amigo.

A mis amigos de carrera Deisy, Lucila, Ernesto, Miguel, José Luis, Goyo, Edgar, Violeta, Rocío, Aída, Pilar, Gabriela, Berenice y Adriana por todas las desveladas, alegrías, tristezas e infinidad de experiencias y gratos recuerdos que me llevo de ustedes y de esta facultad, que por cierto, siempre seguirán presentes. Gracias por su gran e incondicional amistad, los quiero mucho.

A todos lo miembros del FOBACHUPE porque todos y cada uno de ustedes han ocupado un lugar muy especial en mi corazón, por todos los momentos vividos y porque han llegado a formar parte importante de mi vida. Gracias en especial a Alfredo, Javier, Chino y Fajardo porque han sido unos grandes amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Sandoval por permitirme trabajar en su laboratorio y contribuir en gran parte con mi formación académica, así como también por darme la oportunidad de vivir experiencias inolvidables. Gracias doctor, es usted una grandísima persona, digna de admirar.

A la familia Hornedo Andrade porque llegaron a formar parte importante de mi vida, por su apoyo y amistad brindada.

A mis amigos Jonathan, Jaime, Genaro y Rocío porque a pesar del poco tiempo que tenemos de conocernos hemos llegado a formar una gran y bonita amistad.

A mis amigos casi hermanos José, Jonathan y Ángel.

A mis amigos Edgar Márquez y Alberto Vázquez. Gracias por estar siempre ahí, los quiero mucho.

A todos los que han llegado a formar parte importante de mi vida y de alguna u otra forma han ayudado a hacer posible este logro.

¡GRACIAS!

Victoria para quienes perseveran

Iniciar una obra es cosa relativamente fácil, basta con avivar un poco la lumbre del entusiasmo.

Perseverar en ella hasta el éxito, es cosa diferente; eso ya es algo que requiere continuidad y esfuerzo.

Comenzar está al alcance de los demás, continuar, distingue a los hombres de carácter.

Por eso la médula de toda obra grande -desde el punto de vista de su realización práctica- es la perseverancia, virtud que consiste en llevar las cosas hasta el final.

Es preciso, pues, ser perseverante, formarse un carácter no sólo intrépido, sino persistente, paciente, inquebrantable.

Sólo es un carácter.

El verdadero carácter no conoce más que un lema: la victoria.

Y sufre con valor, con sinceridad y sin desaliento, la más grande de las pruebas: la derrota.

La lucha tonifica el espíritu, pero cuando falta carácter, la derrota lo reprime y desalienta.

Hemos nacido para luchar.

Las más grandes victorias corresponden siempre a quienes se preparan, a quienes luchan y a quienes perseveran.

Anónimo

RESUMEN

En el mercado nacional e internacional, el camarón es uno de los productos acuícolas de mayor demanda comercial, debido en parte, al gran aporte nutricional y a las características sensoriales que presenta. La fracción no aprovechable del camarón, es el cefalotórax, el cual genera un volumen considerable de desechos, causando graves problemas de contaminación. El cefalotórax de camarón representa un subproducto económicamente aprovechable, ya que posee un alto porcentaje de proteínas de alta calidad, quitina y pigmentos. De estos últimos, las astaxantinas, son las de mayor importancia comercial, debido a su amplio uso en la industria. Por ello, en la presente investigación, se extrajeron pigmentos carotenoides (astaxantinas), a partir de harinas de cefalotórax de camarón, empleándose dos métodos de extracción sólido-líquido. En el primero, se utilizó una mezcla de disolventes orgánicos (éter de petróleo: acetona: agua) en una relación 15:75:10, y en el otro, aceite de soya, con la finalidad de realizar una comparación entre ambos métodos de extracción, evaluándose en cuál de ellos se obtiene la mayor cantidad de pigmentos (astaxantinas), las mejores condiciones de extracción, los costos y la estabilidad que éstos presentan, probándose para esta última finalidad, un antioxidante comercial (Etoxiquin®). Se probaron tres diferentes tamaños de partícula (menores a 0.150 mm, 0.150 a 0.177 mm y 0.177 a 0.250 mm, mallas No. 100, 80 y 60, respectivamente) de harina entera y harina desmineralizada. Los resultados arrojados de esta experimentación, indicaron, que la reducción del tamaño de partícula y la desmineralización de la harina, son factores que benefician e incrementan la extracción de pigmentos carotenoides, independientemente del método de extracción empleado, lo cual se observó en la malla No. 100, donde se extrajo la mayor cantidad de pigmentos, empleando la mezcla de disolventes éter de petróleo: acetona:agua (15:75:10), dando como resultado un rendimiento de 128.71 µg de pigmentos/g de harina sin desmineralizar, mientras que en la extracción realizada con aceite de soya, se obtuvo un rendimiento de 121.79 µg de pigmentos/g de harina sin desmineralizar. Sin embargo, en las pruebas de estabilidad, los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes, fueron poco estables, ya que en el transcurso de ocho semanas, los resultados revelaron que la estabilidad de los pigmentos sin la adición de antioxidante fue de 60.80%, mientras que con el uso del antioxidante fue de 84.16%; a diferencia de lo anterior, en la extracción con aceite de soya, la estabilidad de los pigmentos sin antioxidante fue de 90.60% y de 99.00% para los pigmentos con antioxidante. La astaxantina obtenida fue purificada mediante una cromatografía en capa fina para, posteriormente, realizar un análisis espectroscópico de UV-Vis e IR, en donde se observó, la longitud de onda de máxima absorción en UV-Vis de 468nm para la astaxantina obtenida en esta investigación y de 470 nm para la astaxantina estándar. Mediante espectroscopia de IR, fue posible encontrar bandas características en la región de 3483 cm⁻¹, 1125-1277 cm⁻¹ y 1650 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones O-H ocasionadas por los grupos funcionales de los alcoholes, cetonas y carbonilos, respectivamente. Finalmente, al realizar el análisis de costos, resultó que el gramo de pigmento obtenido con la mezcla de disolventes fue de \$71.83, mientras que con el aceite de soya, fue de \$9.18 que, al compararse con el costo del pigmento comercial (\$1,973/g pigmento), se encontraron muy por debajo de éste. Con ello, se demuestra que la factibilidad económica es mayor al emplearse el aceite de soya para la extracción de los pigmentos carotenoides, quedando por realizar estudios acerca de la asimilación de este pigmento en dietas para especies cultivadas en granjas.

1. INTRODUCCIÓN

El camarón es uno de los productos pesqueros de mayor demanda nacional e internacional, debido principalmente a su excelente valor nutrimental y a sus propiedades sensoriales. Durante 2001, la producción de camarón en México rebasó las 100,000 toneladas, de las cuales, aproximadamente el 65% provinieron de la captura y el 35% restante, de la acuacultura, la cual toma día con día una mayor importancia (SEMARNAT, 2001).

La porción comestible del camarón constituye sólo el 50%, siendo la parte restante el cefalotórax o cabeza de camarón, que es la fracción no comestible y representa aproximadamente 47,000 toneladas anuales de desperdicios, de los cuales, el 5% es empleado para alimentación animal y el resto es arrojado a tiraderos municipales o lechos marinos, causando graves problemas de contaminación. Esta contaminación es debida en parte a la gran cantidad de sólidos en suspensión que son generados (materia orgánica) y a la alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Cañipa, 1994).

Entre los componentes mayoritarios del cefalotórax de camarón, se encuentran las proteínas, la quitina, los minerales y los pigmentos carotenoides. Dentro de este grupo de pigmentos, los que sobresalen comercialmente, son las astaxantinas, debido a su empleo en la industria farmacéutica como agente antioxidante, en la cosmética, como colorante y en la industria alimentaria como suplemento y complemento en la coloración directa e indirecta de diversos productos, como en las dietas de acuacultura de larvas de camarones y de salmones.

En este trabajo se utilizará el término pigmentos carotenoides para referirnos principalmente a la astaxantina, debido a que el 90% del total de carotenoides presentes en el cefalotórax de camarón, corresponden a la astaxantina y sus ésteres (Chen y Meyers, 1982b; Salazar, 1999).

En la presente investigación se extrajeron los pigmentos carotenoides provenientes del cefalotórax de camarón, con la finalidad de obtener pigmentos de un alto valor económico, reduciéndose consecuentemente la generación de desechos contaminantes. Para ello, se propuso el empleo de dos métodos de extracción sólido-líquido, usando en uno de ellos una mezcla de disolventes orgánicos y en el otro aceite de soya, con la finalidad de recuperar al máximo los pigmentos carotenoides, poder evaluar la eficacia entre ambos métodos, evaluar la estabilidad frente a un antioxidante comercial y, posteriormente, hacer un análisis de costos comparativo a nivel de laboratorio.

1.1 Objetivos

A continuación se presentan los objetivos generales y particulares de este trabajo.

1.1.1 Objetivo general

Extraer pigmentos carotenoides a partir de harina de cefalotórax de camarón, empleando dos métodos de extracción sólido-líquido para realizar una comparación entre éstos.

1.1.2 Objetivos particulares

- **Conocer los componentes básicos de la harina de cefalotórax de camarón mediante un análisis bromatológico**
- **Purificar e identificar los pigmentos obtenidos empleando cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés)**
- **Caracterizar la astaxantina obtenida por medio de espectrofotometría de UV-Vis e IR (Ultravioleta visible e infrarrojo)**
- **Evaluar la ventaja de añadir un antioxidante comercial sobre la estabilidad de los pigmentos obtenidos**
- **Determinar de manera preliminar los costos del proceso a nivel de laboratorio y compararlos con el precio de la astaxantina comercial**

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 El camarón

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro, de tamaño y color variable. Su cuerpo es encorvado y se encuentra dividido en dos partes: cefalotórax y abdomen, los cuales son comercialmente conocidos como cabeza y cola, respectivamente. El cefalotórax, que es una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, se encuentra cubierto por un caparazón que contiene a la cabeza, los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. La cresta en la parte superior es rígida, dentada y termina en un rostro alargado por delante de la cabeza. El abdomen se divide en seis segmentos, el último de ellos termina en una punta fina llamada telson y, por debajo, está la cola que le sirve para nadar. Por dentro del abdomen se encuentran los intestinos (Fig.2-1). Los camarones varían en tamaño, forma y número de apéndices; características que se emplean para la identificación preliminar de las especies. Para precisar esta identificación, se recurre a otras características como son las espinas y estrías sobre el caparazón, que son indicativas de la posición de órganos internos adyacentes. El rostro, que asemeja la proa de un barco, está proyectado en punta hacia arriba de los ojos, siendo muy largo en algunas especies y en otras poco diferenciables. Esta cualidad, junto con los patrones de dientes en edades tempranas y adultas del camarón, son otros rasgos útiles en la identificación de éstos (Cañipa, 1994).

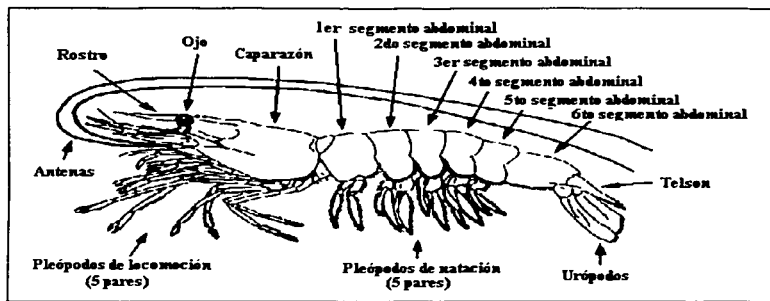


Fig.2-1 Anatomía del camarón (Ramírez, 2003)

Se han descrito en el mundo alrededor de 2500 especies de camarones. En la costa del Pacífico americano (desde México hasta el norte de Perú), existen alrededor de 283 especies, de las 920 especies de crustáceos conocidos en esta amplia región. Los camarones se clasifican en dos grupos: Dendrobranquiata y Caridea. Los Dendrobranquiata comprenden ,entre otros, al género *Penaeus*, que incluye a los más importantes desde el punto de vista comercial, debido a los grandes volúmenes de captura y a la fuerte demanda en los mercados internacionales (Hendrickx, 1996).

2.2 Composición química del camarón

El camarón es excepcionalmente nutritivo, pues es un alimento con alto contenido de proteínas y bajo en grasa. La cantidad limitada de grasas es predominantemente poliinsaturada con cantidades útiles de los ácidos grasos 3-omega, sustancias que aparentemente ayudan a reducir los niveles de colesterol

en sangre y que actualmente se encuentran relacionados con el buen funcionamiento del sistema arterial, la reducción en riesgos de ataques al corazón y algunos tipos de cáncer. Además, se compone de sales minerales, quitina y quitosana (Cañipa y Durán-de-Bazúa, 1997).

En la Tabla 2-1, se observa que después de la humedad, el componente más abundante son las proteínas, que debido a la calidad de las mismas, lo convierten en un alimento altamente valioso desde el punto de vista nutrimental, le sigue la fracción de fibra cruda y el contenido de cenizas. Adicionalmente a la fracción de lípidos se encuentran, además de las sustancias liposolubles responsables del aroma y del sabor típico del camarón, pigmentos de tipo carotenoide, responsables de impartir la coloración del camarón, los cuales se encuentran esterificados, formando complejos con las proteínas, hidratos de carbono y/o algunos ácidos grasos (Coultrate, 1999).

Tabla 2-1. Composición química del camarón (Cañipa, 1994)

Composición	Parte comestible ⁽¹⁾	Cefalotórax ⁽²⁾ (%)
Agua (g)	78.2	8.5
Proteína cruda(g)	18.1	47.70
Grasa cruda(g)	0.8	4.63
Hidratos de carbono(g)	1.5	2.47
Fibra cruda	N.D	19.35
Ceniza (g)	N.D	26.86
Niacina (mg)	3.20	N.D
Calcio (mg)	63.00	N.D
Fósforo (mg)	166.00	N.D
Hierro(mg)	1.60	N.D
Tiamina(mg)	0.03	N.D

(1) Valor reportado por 100g de porción comestible

(2) % en base seca

2.2.1 Proteínas

La secuencia de aminoácidos que conforma las proteínas del cefalotórax de camarón incluye a todos los aminoácidos esenciales, que constituyen aproximadamente el 50% del peso seco del cefalotórax (Tabla 2-2). Estas proteínas son empleadas como una fuente alimenticia y como formulación para preparar medios de cultivo para microorganismos. La extracción química de proteínas del cefalotórax de camarón, implica un tratamiento con hidróxido de sodio y calor o el uso de enzimas proteolíticas que evitan que se dañe a los aminoácidos o a la quitina (Escobedo, 1994).

Tabla 2-2. Composición de aminoácidos de proteínas provenientes de desechos de camarón (Cañipa y Durán-de-Bazúa, 1997)

Aminoácido	Contenido mg/g
Ácido aspártico	63.4
Treonina	25.3
Serina	26.7
Prolina	20.3
Ácido glutámico	91.2
Glicina	25.3
Alanina	31.2
Valina	26.1
Metionina	16.8
Isoleucina	19.2
Leucina	44.6
Tirosina	21.4
Fenilalanina	26.9
Lisina	36.4
Histidina	11.5
Arginina	37.2
Total	523.2

2.2.2 Sales minerales

Las sales minerales, principalmente fosfatos y carbonatos de calcio, constituyen el segundo componente más abundante en el cefalotórax de camarón (27% aproximadamente), ya que se encuentran asociadas a la quitina y a las proteínas, otorgándole una dureza característica al exoesqueleto del crustáceo. Sin embargo, se ha observado que al emplear el cefalotórax directamente en la formulación de las dietas para especies acuícolas, puede causar deficiencias de manganeso en peces, debido al exceso de sales de calcio y, por ello, es recomendable realizar una desmineralización previa. Los niveles de calcio se pueden reducir hasta un 85% y para ello se han utilizado diferentes técnicas, entre las que destacan el empleo del ácido clorhídrico y del ácido acético al 50%, así como también el uso de EDTA 0.5 M (García, 1997).

2.2.3 Quitina y quitosana

La fracción correspondiente a la fibra cruda se encuentra establecida por el biopolisacárido llamado quitina. La obtención de quitina a partir de desechos de camarón, consiste básicamente en dos etapas: desproteínización y desmineralización. La quitosana es el derivado más importante de la quitina y su obtención comercial se realiza mediante una desacetilación alcalina de la quitina con NaOH al 50% a temperatura de ebullición durante 3 horas (Knorr, 1991).

Tanto la quitina como la quitosana, poseen numerosas aplicaciones en el ramo alimentario, médico, farmacéutico, cosmetológico y biotecnológico.

2.2.4 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides son una familia de pigmentos naturales que son propios de las plantas que fotosintetizan, pero también se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, algas, levaduras y animales marinos (crustáceos). Actualmente, se han aislado más de 400 tipos en plantas, animales y hongos (Miki, 1991).

Los crustáceos contienen pigmentos carotenoides, que están unidos a proteínas y tienen una coloración azul o azul grisácea. Cuando el animal es sumergido en agua hirviendo, se rompe el enlace carotenoide-proteína, lo que da como resultado un color "rojo-rosado", proveniente del carotenoide libre.

Dentro de los crustáceos, el pigmento que se encuentra en mayor cantidad es la astaxantina, ya que ciertos crustáceos tienen la capacidad de transformar los carotenos en astaxantina y acumular esta última. Los peces rojos contienen astaxantina, luteína y taraxantina.

Algunas de las funciones que los carotenoides desempeñan en los organismos que los contienen son: La absorción de la luz, la fotoprotección y actuar como precursores de la vitamina A. Adicionalmente, estos pigmentos poseen un gran interés comercial por sus amplias posibilidades de aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Hoy en día, debido a su gran demanda, muchos de los carotenoides se sintetizan comercialmente y se utilizan como colorantes de alimentos (Chien y Jeng, 1992).

2.2.4.1 Estructura y clasificación de los pigmentos carotenoides

Los pigmentos carotenoides son tetraterpenos liposolubles de cuarenta carbonos, formados por la condensación de unidades de isoprenilo, cuya gama de color va del amarillo al rojo. Estructuralmente se dividen en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. El grupo de los carotenos está formado por compuestos de hidrocarburos y su principal exponente es el β -caroteno (Fig. 2-2).

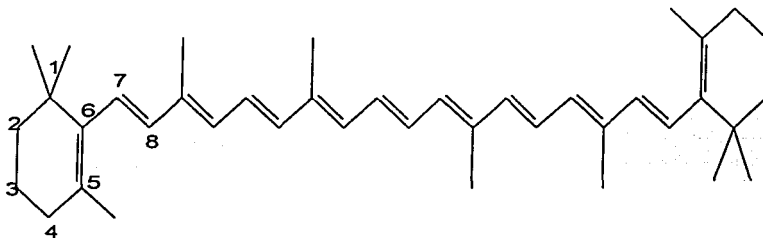


Fig. 2-2. β -caroteno (Coultrate, 1999)

El grupo de las xantofilas, que representa la gran mayoría de los carotenoides, se encuentra formado por derivados de los compuestos de hidrocarburos que se generan por la introducción de funciones oxígeno, especialmente de grupos "hidroxi", "oxo" y "epoxi", que forman los alcoholes, los aldehídos y las cetonas (Fig. 2-3)(Salazar, 1999).

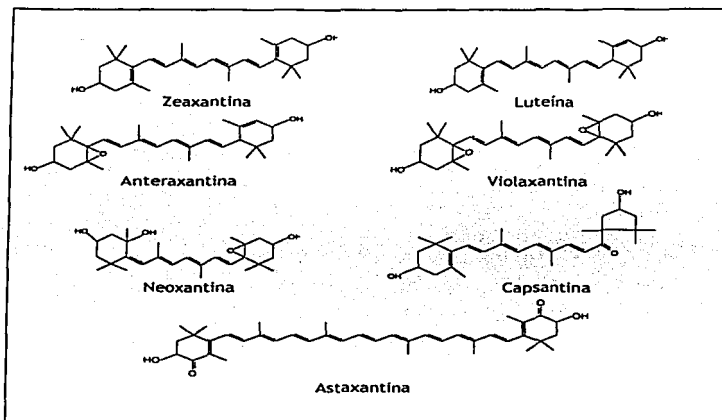


Fig. 2-3. Estructuras de algunas xantofilas (Coultrate, 1999)

2.3 Astaxantina

La astaxantina libre (3,3'-dihidroxi- β , β ,- caroteno-4,4'-diona) es una xantofila de tipo carotenoide (Fig. 2-4), su nombre se deriva del género del cangrejo *Astacus astacus* (Salazar, 1999). Este pigmento es ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en ciertos crustáceos, fitoplacton, algas (*Haematococcus pluvialis*), levaduras (*Phaffia rhodozyma*) y en distintas aves incluyendo al flamínco. En los crustáceos se encuentra presente en tres formas diferentes: La primera, en forma libre, esto es, sin esterificar; la segunda, en forma oxicarotenoidea y la tercera, se encuentra esterificada con una o dos cadenas largas de ácidos grasos, tales como: El ácido palmítico, oleico, esteárico

y linoleico (carotenolipoproteínas) y/o asociada a proteínas (carotenoproteínas). Las formas ésteres generalmente representan la gran mayoría de la astaxantina depositadas en los tejidos (Chien y Jeng, 1992).

A principios de 1980, la cantaxantina sintética (β , β -caroteno-4,4'-diona) fue el pigmento que alcanzó mayor demanda, pero diversos estudios han demostrado que la astaxantina es superior como pigmento, además de ser el de mayor preferencia en la acuicultura (Johnson y Gil-Hwan, 1991).

Para extraer el pigmento, el principal obstáculo lo constituye la unión covalente con las proteínas. Por ello, si esta unión se debilita o se rompe, por ejemplo, en el secado, se favorece la extracción de pigmentos (Chen y Meyers, 1982b).

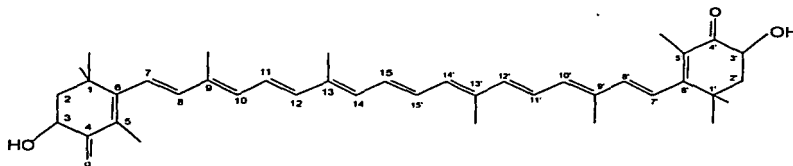


Fig. 2-4. Estructura química de la astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β - caroteno-4,4'-diona) (Coulate, 1999)

2.3.1 Propiedades químicas de la astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β - caroteno-4,4'-diona) es un oxicarotenoide derivado del β -caroteno, tiene como fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ y un peso molecular de 596.86 g/mol. La astaxantina cristalina aislada tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 224°C. Es insoluble en soluciones

acuosas y en muchos disolventes orgánicos, pero a temperatura ambiente puede disolverse en éter de petróleo (-50 g/L), diclorometano (-30 g/L), cloroformo (-10 g/L), acetona (-0.2 g/L), dimetilsulfóxido (DMSO) (-0.5 g/L) y en otros disolventes no polares. Su absorción en el espectro, representa una estructura de polienos conjugados, la longitud de onda de absorción máxima es de 468-470 nm en éter de petróleo, de 489 nm en cloroformo, 478 nm en etanol y 480 nm en acetona. Las astaxantinas contienen una gran cantidad de dobles enlaces conjugados, por lo cual, son menos estables que otros isoprenoides y se deben tomar muchas precauciones para evitar su degradación, pues son sensibles a la luz, al calor, al oxígeno, a los ácidos y álcalis (Miki, 1991).

La astaxantina posee dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3', los cuales pueden existir en cuatro configuraciones, incluyendo los enantiómeros idénticos (3S, 3'S; 3R, 3'R) y las formas *meso* (3R, 3'S; 3'R, 3S) (Johnson y Gil-Hwan, 1991).

La espectrofotometría es una de las herramientas analíticas que se emplea para determinar de manera cuantitativa la astaxantina. Para determinar la concentración de muchos carotenoides, se utiliza un coeficiente de extinción específico, el cual está determinado por la ecuación siguiente:

$$[A(1\%/1\text{cm}) = E (1\%/1\text{cm})]$$

donde :

A = absorbancia

E = Coeficiente de extinción

2.3.2 Usos de la astaxantina

El carotenoide astaxantina es de gran interés científico y comercial, ya que es una molécula activa de origen natural que tiene un alto valor agregado y que representa, en la actualidad, grandes perspectivas de aplicación, como por ejemplo, en la industria farmacéutica donde se utiliza como marcador en el seguimiento de células, como agente antioxidante, anticancerígeno y antitumoral. En la industria de cosméticos, como colorante en diversos productos y como antioxidante. En la industria de los alimentos se usa como suplemento y complemento en la coloración directa e indirecta de diversos productos, como en la dieta de las aves de corral con la finalidad de incrementar la coloración en la yema del huevo; en la acuicultura como fuente de pigmentación en la dieta de crustáceos (camarón, langosta), de peces en la fijación del colorante en el músculo de la trucha arcoíris y principalmente del salmón, dependiendo de la etapa de desarrollo del pez, así como del estado de maduración sexual y de la forma libre o esterificada del pigmento, lo que incrementa el valor comercial de los productos a través de la bioacumulación y metabolismo de las diferentes formas de astaxantina en los músculos, piel y exoesqueleto (Salazar, 1999).

2.3.3 La astaxantina en la acuicultura

La producción de salmones criados en cautiverio se ha venido incrementando significativamente. En 1991 se calculó que el 30% de los salmones consumidos en el mundo provenían de granjas acuícolas (Johnson y Gil-Hwan, 1991).

Los salmones en su hábitat natural obtienen la astaxantina contenida en el fitoplancton y en ciertos crustáceos que adquieren de su ambiente natural, por lo

que su carne siempre tiene la tonalidad característica de dicha especie; sin embargo, se ha demostrado que los salmones criados en ambientes no naturales con alimento o piensos que no contienen astaxantina ni cantaxantina, crecen de forma normal, pero la tonalidad de su carne es blanca, color que confunde y desagrada a los consumidores. De esta manera, la astaxantina se vuelve un componente indispensable en la formulación del alimento para salmones criados en granjas acuícolas. Tanto la astaxantina como la cantaxantina se usan en grandes cantidades en dichas "granjas", llegándose a utilizar niveles de 35 a 75 miligramos de astaxantina por cada kilogramo de alimento. Así, la astaxantina representa del 10% al 15% del costo total del alimento.

Johnson y Gil-Hwan, en 1991 reportaron que, durante 1986, más de 6,000 kg de pigmentos carotenoides fueron empleados en la alimentación de salmones cultivados y de acuerdo a las tendencias se pronosticaba para el año 2000 un mercado mundial de 100,000 kg de carotenoides o de 100 millones de dólares para la astaxantina.

2.4 Captura del camarón

Los pescadores que conocen el ciclo de vida de los camarones, capturan a estos crustáceos en aguas marinas con "redes de arrastre" y "chinchorros", o en las salobres de las lagunas con diferentes tipos de artes de pesca como "tapos", "nasas", "atarrayas" o "esparavelos" y "redes atravesadas". Para la captura de las especies de alta mar se utiliza el llamado barco camaronero; generalmente, su casco es de madera, aunque cada vez más, éste se ha ido sustituyendo por cascos de metal o de ferrocemento; la bodega lleva hielo en escama para estibar

al camarón con su cabeza hacia adelante, aunque también estas bodegas de hielo están siendo sustituidas por las de congelación. La caseta de mando y los camarotes se encuentran colocados a proa, con la finalidad de dejar libre la popa para la maniobra de pesca y descabezado del producto. La maniobra de pesca la realizan de 4 a 6 tripulantes, el patrón, el motorista, el cocinero y de 1 a 3 pescadores. Cuando se cobran las redes, la captura se deposita en la cubierta y los tripulantes separan el camarón y otras especies de valor comercial, colocándolas en las bodegas; el resto de la "fauna acompañante" y las cabezas de camarón, son regresadas nuevamente al mar, lo que causa un impacto ecológico que altera el ambiente. Sólo en contadas ocasiones se lleva a puerto para transformarlas en harina (Sanz, 1998).

2.5 Comercialización del camarón

Los camarones son comercializados de diferentes formas; aunque generalmente se congelan en bloques de hielo. Posteriormente a los días de trabajo en el mar, el barco regresa al puerto con la captura conservada en frío, ésta se saca de las bodegas por medio de extractores que pasan a los camarones a un carril de plástico, en donde se deslizan por agua mezclada con antisépticos, para evitar la contaminación con bacterias y, finalmente, llegan a un tanque que contiene una solución azucarada que permitirá la congelación posterior sin que el tejido se vuelva quebradizo. De ahí pasan a máquinas que, de manera automática, los seleccionan por tamaño. Una vez que se seleccionaron, pasan a través de charolas de congelación y, por último, al congelador por placas, donde permanecen durante 30 minutos a temperaturas menores de 4°C, hasta alcanzar

su congelación total. Uno de los principales países consumidores de este producto es Estados Unidos de América, el cual importa alrededor de medio millón de toneladas, principalmente de México, India, Brasil, Panamá y Venezuela. Las tallas pequeñas de camarón, que reciben el nombre de pacotilla, son aprovechadas para el enlatado y el secado. Los camarones enlatados, son conservados en salmueras y, en ocasiones, se les agrega jugo de tomate. El secado se hace al sol, con o sin el caparazón, empacándose en bolsas de plástico para emplearse en preparaciones de caldos y sopas (Bertullo, 1995).

2.6 El camarón en México

En las costas mexicanas, el recurso camaronero es uno de los más importantes y de los que más divisas aporta al país, ya que es base de una de las pesquerías mejor establecidas y de las más grandes en cuanto a flota. Esta pesquería se realiza principalmente sobre la plataforma continental, desde 3 hasta 200 metros de profundidad, donde se captura el camarón de alta mar, pero también se pesca en aguas protegidas como bahías, esteros y lagunas, en el litoral del Océano Pacífico, Golfo de México y del Mar Caribe. La pesquería del camarón se inició desde 1922 en el Pacífico mexicano y en 1947 en el litoral del Golfo de México, pero puede considerarse que a partir de 1940 es considerada como una pesquería industrializada. A partir de 1941 se estableció la primera compañía y desde estos años, el número de plantas que procesan camarón ha aumentado considerablemente. En algunos países como México, se piensa que se ha llegado a la producción máxima, por lo que se han iniciado programas de cultivo de camarones, para poder aumentar la oferta y así satisfacer esta demanda

que cada día es mayor (Hendrickx, 1996). En el año 2001 se registró una producción de camarón de 100,000 Ton provenientes de la pesca y 33,480 Ton, de la acuacultura, lo que en términos monetarios equivalió a 5,247 millones de pesos (SEMARNAT, 2001) (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Serie histórica de la producción de camarón en peso vivo y peso desembarcado, 1996-2001 (SEMARNAT, 2001)

Año	Total peso vivo (Ton)	Total peso desembarcado (Ton)	Cultivo peso vivo (Ton)	Valor de la producción (millones de pesos)
1996	78,879	61,235	13,114	2,255
1997	88,489	70,144	17,570	3,537
1998	90,335	71,609	42,173	4,112
1999	95,611	78,234	29,120	4,524
2000	95,077	79,974	33,480	5,247
2001	104,957/p	**	47,449/p	**

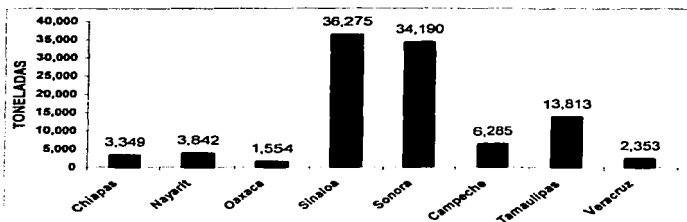
/p Cifras preliminares

Las entidades de mayor captura de camarón, en el litoral del Pacífico mexicano, son los estados de Sonora y Sinaloa, con una producción de camarón en peso vivo de 24,837 Ton y 35,069 Ton respectivamente. En el litoral del Golfo de México y del Caribe, el área camaronera principal es el estado de Tamaulipas (12,588 Ton), seguido por el estado de Campeche (6,014 Ton) (Tabla 2-4 y Gráfica 2-1), que tiene una plataforma con una pendiente de poca profundidad: los 200 metros se alcanzan a más o menos 200 millas náuticas de la costa y, como el fondo es arenofangoso, resulta ideal para la pesca del camarón (SEMARNAT, 2001).

Tabla 2-4. Serie histórica de la producción de camarón en peso vivo, según entidad federativa, 1996-2001 (SEMARNAT, 2001)

Entidad	1996 (Ton)	1997 (Ton)	1998 (Ton)	1999 (Ton)	2000 (Ton)	2001/p (Ton)
Total	78,879	88,489	90,335	95,611	95,077	104,957
Litoral del Pacífico	57,430	66,505	66,243	74,069	71,750	80,725
Chiapas	6,337	4,330	4,051	4,385	3,784	3,349
Nayarit	3,172	6,730	6,932	6,630	4,719	3,842
Oaxaca	5,733	2,268	2,635	2,965	1,863	1,554
Sinaloa	25,520	30,821	31,924	32,740	35,069	36,275
Sonora	15,231	19,504	18,560	25,538	24,837	34,190
Litoral del Golfo y Caribe	21,450	21,984	24,092	21,541	23,327	24,332
Campeche	6,857	6,262	5,963	5,561	6,014	6,285
Tamaulipas	10,907	12,529	14,433	11,667	12,588	13,813
Veracruz	1,994	1,938	1,998	2,098	2,670	2,353

/p Cifras preliminares



Gráfica 2-1. Principales entidades productoras de camarón en el 2001

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En México los camarones de mayor importancia comercial son: El "camarón rosado" (*Penaeus duorarum*), el "camarón café" (*Penaeus californiensis*), el "camarón blanco" (*Penaeus vannamei*) y el "camarón rojo" (*Penaeus brevisrostris*). El producto es distribuido en el mercado internacional, de diversas formas: congelado, enlatado y empanizado, mientras que en el mercado nacional, es distribuido fresco, congelado, enlatado, descabezado, seco, en polvo. De la producción de camarón, se exportan 32,835 Ton a Canadá, España, Estados Unidos, Honduras y Japón, los cuales aportan divisas por más de 405 millones de dólares (Tabla 2-5). En el mercado nacional son comercializadas 46,301 Ton, siendo sus principales plazas de distribución el Distrito Federal, Guadalajara, Monterrey, Puebla y las zonas turísticas de la costa (SEMARNAT, 2001).

Tabla 2-5. Exportación de productos pesqueros (SEMARNAT, 2001)

Concepto	Volumen (Ton)	Valor (miles de dólares)
Saldo		475,564
Exportación	184,679	659,748
Algas y sargazos	15,076	643
Atún y similares ^{1/}	17,473	20,248
Calamar	9,604	9,791
Camarón	32,835	405,078
Langosta	1,586	29,794
Pulpo	5,671	13,179
Sardina y macarela	39,285	17,591
Crustáceos y moluscos en conserva	14,691	57,258
Otros comestibles ^{2/}	39,094	101,807
Otros no comestibles ^{3/}	9,365	4,359

^{1/}Incluye las descargas en puertos extranjeros; ^{2/}Pescados y mariscos en diversas presentaciones; ^{3/}Animales y vegetales acuáticos diversos, subproductos o desechos

2.7 Extracción sólido-líquido

Muchas de las sustancias biológicas y compuestos orgánicos e inorgánicos, existen en mezclas de diferentes componentes en un sólido. El proceso de *extracción sólido-líquido*, sirve para poder separar el constituyente deseado de la fase sólida, la cual se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido (Gean Koplis, 1993).

El proceso de extracción puede resumirse en los siguientes pasos: El disolvente debe difundirse desde la solución general hasta la superficie del sólido; posteriormente, dicho disolvente debe penetrar o difundirse en el sólido, por lo que enseguida el soluto es disuelto en el disolvente y difundido a través de la mezcla hasta la superficie de la partícula, para que finalmente, el soluto sea transferido a la solución general. La velocidad de transferencia del disolvente desde la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida, lo mismo sucede con la velocidad ejercida hacia el interior del sólido. Sin embargo, en la mayoría de los casos no son éstas las etapas que limitan la velocidad del proceso total de extracción. Esta transferencia de disolventes suele ocurrir al principio, cuando las partículas se ponen en contacto con el disolvente; aún así, la disolución del soluto en el disolvente, en el interior del sólido, puede ser un simple proceso físico de disolución o una verdadera reacción química que libera al soluto para la disolución (Gean Koplis, 1993).

En seguida se describe las características primordiales del aceite de soya, el cual será utilizado como disolvente, en uno de los dos métodos empleados en esta investigación, para recuperar los pigmentos contenidos en el cefalotórax de camarón, los cuales son solubles en aceites, así como en disolventes orgánicos.

2.8 Aceite de soya

El aceite bruto de soya, tiene un ligero color ambarino, que después de la neutralización alcalina, presenta el mismo color amarillo que presentan los demás aceites vegetales. Cuando el aceite se ha obtenido de habas verdes, puede contener suficiente clorofila como para presentar un tinte verdoso, sin embargo, no se hace evidente hasta que se reducen por hidrogenación los pigmentos rojo-amarillos (Bailey, 1979). Al hidrogenar un aceite, se disminuye el grado de instauración de los pigmentos carotenoides, lo suficiente como para conseguir una reducción significativa del color.

2.8.1 Composición química del aceite de soya

El aceite de soya se encuentra compuesto por 61% de ácidos grasos poliinsaturados, 24% de monoinsaturados y 15% de ácidos grasos saturados. Gracias a esta composición, este aceite se identifica como uno de los idóneos para tener una dieta balanceada en cuanto composición de ácidos grasos. Contiene mayor cantidad de ácidos grasos esenciales como el linoleico (49%) y el linolénico (11%) también conocidos como (omega-6 y omega-3 respectivamente). Las funciones de estos ácidos grasos, incluyen la regulación de las contracciones musculares, la regulación de la presión sanguínea y el crecimiento de células

nuevas. El aceite de soya, también contiene fosfolípidos (1.5-4%) como la lecitina, la cual, forma parte esencial en la alimentación de los crustáceos, sobre todo, para el desarrollo y sobrevivencia de las larvas, facilitándose la absorción de los pigmentos (Grundy y Abrams, 1995). Los tocoferoles son otro componente importante del aceite de soya (0.8%). Algunos tipos de tocoferoles actúan como vitamina E y otros como antioxidantes, los cuales, protegen al aceite de la oxidación. Por último, cabe mencionar que el aceite de soya está libre de colesterol y no contiene compuestos dañinos en comparación con aceites como el de canola, que puede contener ácido erúxico, el cual inhibe la absorción de ciertos nutrimentos (Alava et al., 1993).

Con base en estos fundamentos a continuación se presenta la metodología.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general realizada en esta investigación se describe en el siguiente diagrama:

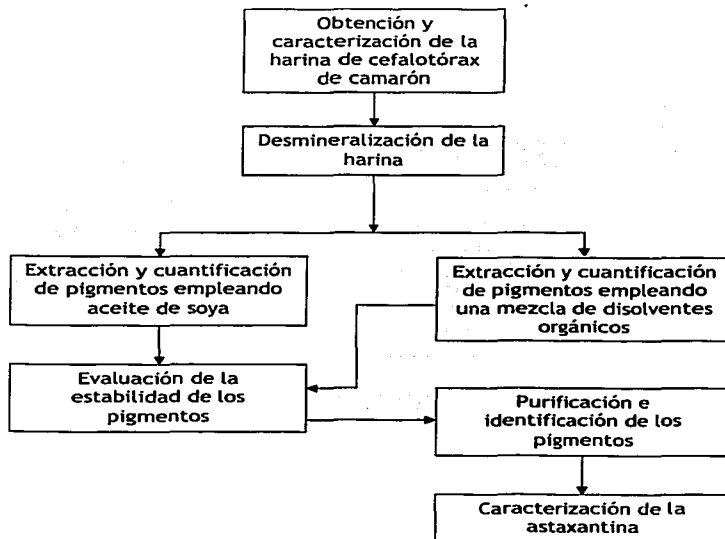


Diagrama 3-1. Esquema general del desarrollo experimental

A continuación se describe cada una de las etapas del desarrollo experimental seguido en esta investigación.

En las Tablas 3-1 y 3-2 se presenta un listado del equipo y reactivos empleados durante el desarrollo experimental de esta investigación.

Tabla 3-1. Equipo empleado

Equipo	Marca	Modelo
Cuarto de secado	Kinet	53874
Molino de cereales	CeCeCo tipo S	1245
Tamizador eléctrico	Steve-Shaker de W.S.Tyler Co., Ohio	RX-24
Balanza	Sartorius	1303MP
Balanza analítica	OHAUS	GA200
Parilla de agitación	Thermolyne II	NE
Horno	Rios Rocha S.A.	HS-4835
Rotavapor	Büchi	461
Espectrofotómetro	Milton Roy	Spectronic 21d
Baño agitador con termostato	Exacal	NE
Centrífuga	Rotixa	50RS

NE= No se especifica

Tabla 3-2. Reactivos empleados

Reactivo	Especificaciones
EDTA	J.T.Baker. Reactivo analítico
Éter de petróleo	J.T.Baker . Grado reactivo
Acetona	J.T.Baker . Grado reactivo
Na ₂ SO ₄	J.T.Baker. Reactivo analítico
Etoxiquin	Sigma- Aldrich
Astaxantina	Sigma- Aldrich
Aceite de Soya	Tolteca

3.1 Obtención de la harina de cefalotórax de camarón

3.1.1 Recolección del cefalotórax

El cefalotórax de camarón o cabeza de camarón, fue adquirido gratuitamente en el mercado de pescados y mariscos de "La Nueva Viga" en la Ciudad de México, donde se transportaron al Laboratorio E-301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA) de la Facultad de Química de la UNAM, en bolsas negras y cubiertos con hielos. Cabe mencionar que debido a que el estudio se enfocó al uso de un subproducto de bajo valor agregado, no fue seleccionada alguna especie en especial, ya que en el mercado, el descabezado es una práctica cotidiana y sin importar la especie, todos estos desechos son colocados en canastos grandes de plástico, en los que son transportados al basurero (Anexo 1, Fig.1).

3.1.2 Lavado

Las cabezas de camarón se colocaron en cubetas de plástico y se lavaron bajo el chorro de agua de la llave, hasta que el agua salió limpia (Anexo 1, Fig. 2 y 3). Posteriormente, se dejaron escurrir por aproximadamente 15 minutos.

3.1.3 Secado

El cefalotórax previamente lavado y escurrido, se distribuyó en capas delgadas sobre charolas de aluminio y se secaron a $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un día (Anexo 1, Fig. 4). El objetivo de esta operación fue la de disminuir la actividad del agua y, con ello, retardar la descomposición microbiológica y enzimática.

3.1.4 Molienda y tamizado

Las cabezas secas se molieron y tamizaron, con lo que se obtuvo harina de cuatro diferentes tamaños de partícula: menores a 0.150 mm (malla No. 100), de 0.150 a 0.177 mm (malla No. 80), de 0.177 a 0.250 mm (malla No. 60) y mayores a 0.250 mm (malla sin número).

3.1.5 Desmineralización

La desmineralización se realizó según lo determinando por García (1997), empleando una disolución de EDTA disódico 0.5 M en una relación (1:6 W/V), con agitación constante durante dos horas. Posteriormente, la harina fue sometida a varios lavados con agua destilada, a temperatura ambiente, hasta que el agua del filtrado quedó lo más clara posible. Tras filtrar la muestra con un papel Whatman No. 1, la harina se secó a una temperatura de 65°C durante 15 horas y se almacenó, para la realización de los ensayos posteriores.

3.1.6 Conservación

La harina entera y la desmineralizada se almacenaron en varios frascos color ámbar, etiquetados y cerrados herméticamente, cubiertos con "papel" polimérico (parafilm), para de esta forma impedir en lo posible el paso de la luz, del O₂ y evitar así la degradación prematura de los pigmentos. Posteriormente, fueron mantenidos en congelación a -5°C con la finalidad de conservar mejor la muestra (García, 1997). En el Diagrama 3-2, se aprecian las operaciones unitarias requeridas en la obtención de la harina a partir del cefalotórax de camarón.

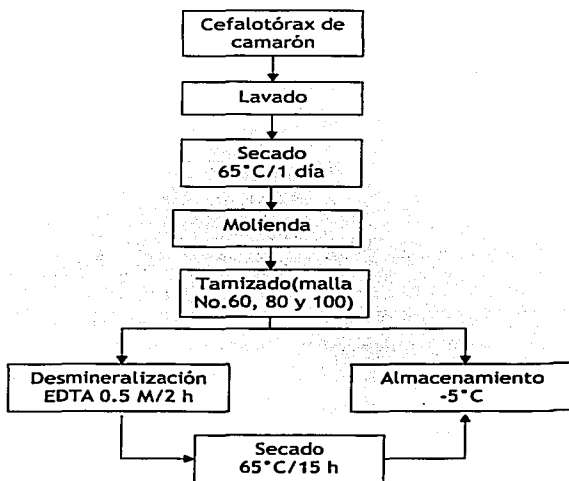


Diagrama 3-2. Obtención de la harina de cefalotórax de camarón

3.2 Caracterización de la harina

La harina entera y la desmineralizada de malla No. 100 (tamaño de partícula de 0.150 mm), se caracterizaron realizando un análisis bromatológico (Determinación de humedad, cenizas, proteína, grasa cruda, hidratos de carbono y fibra), según lo establecido en el manual de la AOAC (1990). En el anexo 2 se presenta una descripción de ellos.

3.3 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua

Estudios previos hechos por Cañipa (1994), han demostrado que, en la extracción de pigmentos carotenoides, el empleo de una mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua en las proporciones 15:75:10, es una de las más eficientes; por ello se seleccionaron estas condiciones para realizar el presente estudio.

Para la extracción y cuantificación de pigmentos se colocaron 2 g de harina en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se añadieron 22.5 mL de acetona, 4.5 mL de agua y 3.0 mL de éter de petróleo. Se taparon con papel aluminio y se agitaron durante 3 horas, al abrigo de la luz (Anexo 1, Fig. 5). Finalizada la extracción, se filtró al vacío con papel filtro Whatman del No.1, esto con el fin de separar la harina del extracto (Anexo 1, Fig. 6). Las muestras se lavaron sobre el papel filtro con una pequeña porción de éter de petróleo, hasta claridad y así dejar la menor cantidad de pigmentos en la harina. El filtrado se lavó con éter de petróleo en un embudo de separación y posteriormente, se separaron las fases, quedando los pigmentos en la fase etérea, debido a que los carotenoides como las astaxantinas, son altamente solubles en éter de petróleo, poco solubles en acetona e insolubles en agua (Anexo 1, Fig. 7) (Miki, 1991). Las fases etéreas se colectaron en otro embudo de separación. Este proceso se repitió dos veces y posteriormente, la fase etérea se lavó con agua destilada con la finalidad de remover restos de acetona y se añadió sulfato de sodio anhidro para remover los restos de agua. El filtrado se dejó así toda la noche. Posteriormente, se filtró en un embudo de porcelana con una capa de sulfato de sodio anhidro y con vacío; el

filtrado se evaporó a sequedad con rotavapor (Anexo 1, Fig. 8 y 9). Finalmente el residuo se diluyó con un volumen conocido de éter de petróleo y se leyó en el espectrofotómetro de UV-Vis a 470 nm, que es la longitud de onda, en la cual, la astaxantina en éter de petróleo tiene su absorción máxima en el espectro.

El contenido de pigmentos en $\mu\text{g/g}$ de muestra se determinó con la ecuación propuesta por Kelley y Harmon (1972), empleando un coeficiente de extinción de 2400, tal como lo proponen Kanemitsu y Aoe (1958), para el éter de petróleo a 470 nm:

$$\mu\text{g pigmentos/g muestra} = \frac{(A) (D) (10)^6}{100 (G) (d) (E)}$$

donde:

A = absorbancia de la muestra a 470nm

D = mL de disolvente empleado

10^6 = Constante para expresar los carotenoides en μg

G = g de muestra

d = ancho de la celda en cm

E = Coeficiente de extinción (para este caso , E= 2400)

100 = Constante para eliminar el factor de porcentaje

En el Diagrama 3-3 se muestra todo el proceso para la extracción y cuantificación de pigmentos.

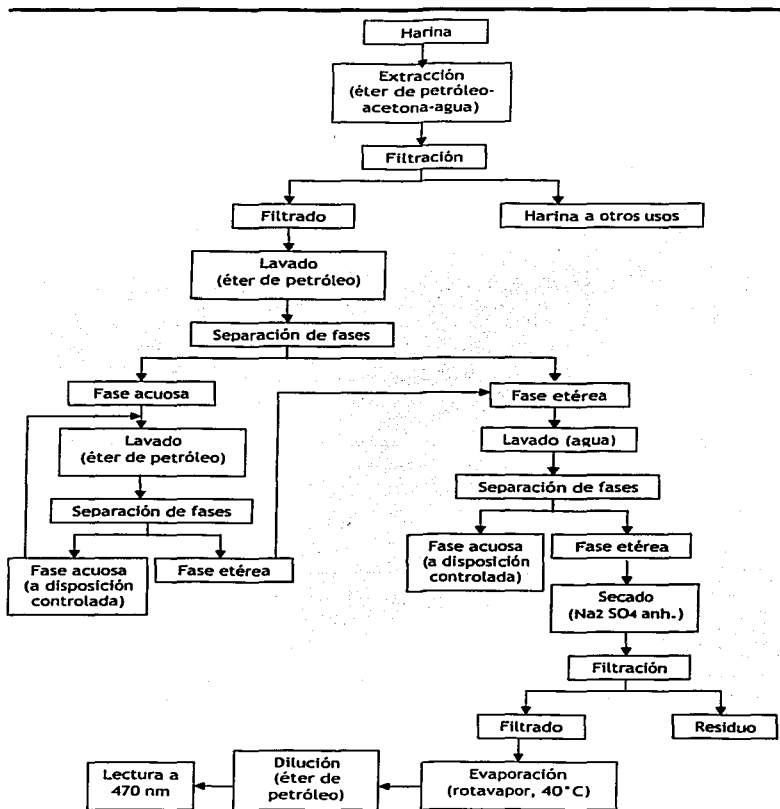


Diagrama 3-3. Extracción y cuantificación de pigmentos empleando la mezcla éter de petróleo:acetona:agua

3.3.1 Purificación e identificación de los pigmentos. Caracterización de la astaxantina

La técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó para la separación de la astaxantina de los otros pigmentos carotenoides y así poder identificar mediante su R_f a los carotenoides presentes, además de caracterizar a la astaxantina por medio de Espectrofotometría de UV-Vis e IR. Se utilizó un estándar puro de astaxantina Sigma-Aldrich® como patrón de referencia.

Las cromatografías se realizaron sobre placas de gel de sílice 60 (Kiesel DC-alufolien sin indicador fluorescente) de 20 X 20cm X 0.2mm.

El desarrollo de las cromatografías se realizó con una mezcla de éter de petróleo:acetona (75:25) en una cámara sobresaturada (García, 1997).

La identificación de la astaxantina se llevó a cabo mediante la contrastación del R_f de la muestra, con el R_f del estándar. Una vez identificada la astaxantina, se procedió a aislarla, mediante un raspado de la mancha, posteriormente se disolvió en una pequeña cantidad de éter de petróleo, se filtró y se evaporó el disolvente para su posterior caracterización por UV-Vis e IR.

La identificación de los otros pigmentos se llevó a cabo mediante la contrastación del R_f experimental con lo reportado en la literatura.

Cabe mencionar que esta parte experimental solo se llevó a cabo con el extracto en éter de petróleo, ya que el extracto en aceite de soya no se puede purificar mediante esta técnica sino que se requiere del empleo de otra técnica, la cual no ha sido estudiada.

3.4 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando aceite de soya

La extracción y cuantificación de pigmentos con aceite de soya se basó en trabajos hechos por Chen y Meyers (1982a), pero con algunas modificaciones, por lo que la metodología que se siguió fue la siguiente:

Se colocaron 2 g de harina en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se añadieron 20 mL de aceite (1:10 W/V) y se taparon con papel aluminio. Se calentó a una temperatura de 80°C durante 15 minutos, con agitación constante y al abrigo de la luz. Finalizada la extracción, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, a una temperatura de 0°C, para así poder separar el aceite pigmentado de la harina. Posteriormente, se trasvasó el aceite pigmentado a una probeta graduada, en la cual, se fue colectando; la harina se colocó nuevamente en el matraz Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 20 mL más de aceite, para nuevamente realizar la extracción. Se calentó y se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas, hasta realizar tres extracciones. Finalmente, se midió el volumen total de aceite colectado y se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis. a 485 nm, que es la longitud de onda, en la cual, la astaxantina en aceite de soya tiene su absorción máxima en el espectro.

El contenido de pigmentos en $\mu\text{g/g}$ de muestra se determinó con la misma ecuación utilizada en la extracción con la mezcla de disolventes, la única variante fue el coeficiente de extinción, que para el aceite de soya es de 2155, como fue propuesto por Chen y Meyers (1982a), (Diagrama 3-4):

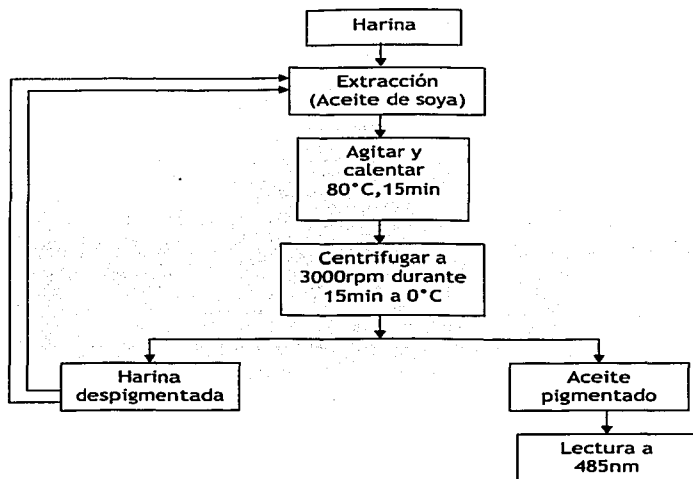


Diagrama 3-4. Extracción y cuantificación de pigmentos carotenoides empleando aceite de soja

3.5 Pruebas de estabilidad

Estas pruebas se realizaron para aumentar la estabilidad de los pigmentos y fue evaluada añadiendo Etoxiquin® (6-etoxy-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina), en una concentración del 0.5% (500 ppm), pues estudios previos han demostrado la eficacia que tiene este antioxidante a esa concentración (Chen y Meyers, 1982b).

La evaluación de la estabilidad de los pigmentos en ambos métodos, se realizó con los extractos, en los cuales, se obtuvo la mayor cantidad de carotenoides. El antioxidante, se añadió antes de comenzar la extracción y el resto del procedimiento fue el mismo que el descrito en ambas metodologías. La evaluación de la estabilidad, se realizó con base en la cuantificación espectrofotométrica del contenido de pigmentos a lo largo de un lapso de ocho semanas.

Para el caso de la extracción con la mezcla de disolventes (éter de petróleo: acetona:agua), se evaporó el disolvente en el rotavapor y el pigmento se diluyó en una cantidad conocida de éter de petróleo; posteriormente, se leyó en el espectrofotómetro a 470 nm, con el fin de cuantificar los pigmentos.

Para el método con aceite de soya, sólo se agitó el aceite pigmentado (con equipo vórtex) y posteriormente, se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 nm. Cabe mencionar que en ambos métodos se realizó una comparación con un control, es decir, pigmento sin antioxidante. Las muestras se conservaron a 4°C, en frascos de color ámbar y perfectamente tapados.

El contenido de pigmentos en µg/g de muestra se determinó con la ecuación propuesta por Kelley y Harmon (1972), empleando el coeficiente de extinción que según corresponda. El porcentaje de retención de pigmentos, se determinó empleando la siguiente relación matemática propuesta por Chen y Meyers (1982):

$$\% \text{ Retención} = \frac{\mu\text{g pigmentos/g muestra (semana X)}}{\mu\text{g pigmentos/g muestra (semana 0)}} \times 100$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de la harina

En la Tabla 4-1, se presenta el porcentaje de materia que se perdió o se transformó en cada una de las etapas del proceso para la obtención de la harina, observándose que durante el secado y la desmineralización hubo una mayor pérdida (78.4 y 70%, respectivamente), esto puede originarse principalmente, por el porcentaje tan alto de agua que posee el camarón, ya que de los 15 kg que se tenían inicialmente de cefalotórax, 11.76 kg era agua, obteniéndose tras secarse la muestra, 3.24 kg de camarón seco. En la desmineralización, también se presentaron muchas pérdidas, pues como se verá más adelante, el cefalotórax de camarón, posee un gran contenido de minerales, que son los que se eliminan en esta parte del proceso.

Tabla 4-1. Porcentaje de pérdida de materia en cada etapa del proceso para la obtención de la harina

Muestra	Cantidad inicial (kg)	Etapas del proceso	Cantidad final (kg)	Pérdidas (%)
Cefalotórax de camarón fresco	15	Secado	3.24	78.40
Cefalotórax de camarón seco	3.24	Molienda	3.19	1.54
Harina de camarón	3.19	Tamizado	3.14	1.45
Harina tamizada*	3.14	Desmineralización	0.94	70.00

*La harina tamizada se refiere a la sumatoria de las harinas de cada malla (60, 80, 100 y sin número,

En esta misma tabla, se aprecia que las pérdidas obtenidas durante la molienda y el tamizado fueron mínimas (1.54% y 1.45%, respectivamente) y fueron originadas principalmente debido a la adhesión en el equipo utilizado. Como resultado del tamizado de la harina, se encontró que las fracciones mayoritarias correspondieron a las partículas de tamaño mayor a 0.250 mm (malla S/N) y menor a 0.150 mm (malla No. 100) con un 37.31% y 36.35% respectivamente, del total de las harinas. En la Tabla 4-2, se presenta el rendimiento de la harina tamizada a partir de 1 kg de harina.

Tabla 4-2. Rendimiento de harina tamizada a partir de 1 kg harina

Tamaño de partícula (mm)	No. Tamiz	Peso (g)	% de harina tamizada
< 0.150	100	363.50	36.35
0.150-0.177	80	117.40	11.74
0.177-0.250	60	146.00	14.60
> 0.250	SN	373.10	37.31
Total	-----	1000	100

S/N = Sin número

4.2 Caracterización de la harina

Una vez obtenida la harina entera y la desmineralizada de malla No. 100, fueron caracterizadas, con la finalidad de comparar los valores obtenidos experimentalmente con respecto a los reportados en la literatura, pues se ha observado, que éstos, pueden variar entre lotes y especies.

En la Tabla 4-3 y en la Gráfica 4-1, se presentan la composición química de la harina entera, tanto la reportada por García (1997), como la obtenida experimentalmente; así como la composición de la harina desmineralizada obtenida experimentalmente.

Al realizar la comparación entre ambas harinas se observó que la composición de la harina entera y la presentada en los datos bibliográficos, fueron muy similares. Las pocas diferencias pueden atribuirse principalmente a que se trabaja con distintas especies de camarón. Adicionalmente, se observó que el contenido de grasa rebasó los datos reportados en la literatura, sin embargo, el de proteínas fue menor, quizás, debido a que la determinación de proteínas para el caso del cefalotórax de camarón, es un punto muy polémico por no haber un factor para transformar directamente el nitrógeno total a nitrógeno proteínico. En este caso, se reportó un factor de 5.4, el cual resulta de restar el nitrógeno quitínico del nitrógeno total (Cañipa, 1994).

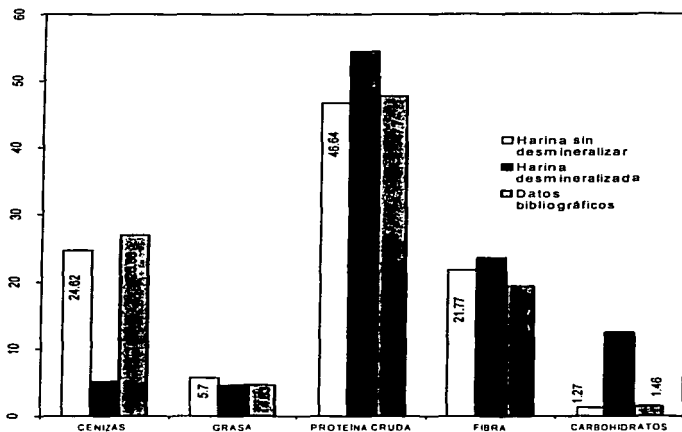
Tabla 4-3. Composición de la harina de cefalotórax de camarón malla No.100 (% en b.s.)

Composición	Datos bibliográficos (1)	Harina entera (2)	Harina desmineralizada (2)
Proteína cruda ⁽³⁾	47.70	46.64 ^{σ±0.2148}	54.43 ^{σ±0.1119}
Cenizas	26.86	24.62 ^{σ±0.0451}	5.09 ^{σ±0.124}
Fibra cruda	19.35	21.77 ^{σ±0.104}	23.50 ^{σ±0.305}
Grasa cruda	4.63	5.70 ^{σ±0.358}	4.55 ^{σ±0.0501}
Hidratos de carbono (por diferencia)	1.46	1.27 ^{σ±1.43}	12.43 ^{σ±1.84}
TOTAL	100	100	100

(1) García (1997)

(2) Datos experimentales. Promedio de tres determinaciones

(3) Factor de conversión = 5.4 (Cañipa, 1994)



Gráfica 4-1. Composición de la harina de cefalotórax de camarón malla No. 100 (% base seca) (García, 1997)

Por otra parte y observando los valores anteriores, es posible destacar que el cefalotórax de camarón es un subproducto que se encuentra compuesto mayoritariamente de nitrógeno, proteínico y no proteínico lo cual lo hace altamente valioso, debido a que la parte proteínica posee un buen perfil de aminoácidos esenciales y la otra complementa la quitina (Cañipa, 1994). Las cenizas y la fibra cruda, son los siguientes componentes en abundancia. Ambas fracciones presumiblemente corresponden a las sales minerales y a la quitina, sustancias que conforman el caparazón del camarón. En la harina que se desmineralizó, la cantidad de cenizas decreció en aproximadamente el 80% de su valor inicial, esto indica que la desmineralización fue efectiva, a pesar de que

aún se tenga una cantidad considerable de cenizas. Por su parte, después de la desmineralización, los hidratos de carbono se incrementaron en gran medida. Estos valores son calculados por diferencia, sin embargo, se ha estudiado la determinación del contenido de hidratos de carbono totales por la técnica de Fenol-Sulfúrico (F-S) y la de reductores por la técnica del Ácido Dinitro Salicílico (DNS), observándose que el contenido de hidratos de carbono, es casi insignificante, dando valores de 0.103% y 0.147%, respectivamente; por lo que se infiere, que parte de la cantidad de hidratos de carbono calculados por diferencia, corresponde a materia insoluble, tal como lo es la fibra y la quitina (Ramírez, 2003).

En este trabajo se mencionarán las principales diferencias entre los dos métodos de extracción sólido-líquido empleados, pero antes se hablará de los resultados obtenidos para cada uno de los métodos.

4.3 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10)

En la Tabla 4-4, se presenta la cantidad de pigmentos extraídos del cefalotórax de camarón, de los tres diferentes tamaños de malla para la harina entera y desmineralizada, observándose que, en ambas harinas, se obtuvieron cantidades mayores de pigmentos a medida que el tamaño de partícula disminuyó. Otro factor importante que intervino en la extracción de pigmentos, fue la desmineralización, pues se observó que en la harina desmineralizada se extrajo una cantidad mayor de pigmentos, que de la harina sin desmineralizar, lo cual se constata con los resultados obtenidos, en especial, con la malla No. 100, que fue

donde se extrajo la mayor cantidad de pigmentos, 128.71 ± 0.99 μg pigmentos/g de muestra, que equivale a un 40% más de pigmentos que en la extracción con la harina entera. Este efecto puede producirse por la presencia de los minerales, como el carbonato de calcio, que impiden o retardan la penetración del disolvente en la harina y por lo consiguiente la extracción de los pigmentos. Por otro lado, un exceso de sales de calcio, pueden causar deficiencias de manganeso en peces al emplear el cefalotórax directamente en la formulación de las dietas para especies acuícolas, por ello, es recomendable realizar una desmineralización previa (Spinelli, 1974).

En cuanto a la cantidad obtenida de pigmentos, los resultados de este trabajo fueron muy superiores a los reportados por Cañipa (1994). Este autor mencionó un contenido de pigmentos de 20.5 ± 4.5 μg pigmentos/g de muestra bajo las mismas condiciones de extracción. Esto puede deberse a varios factores entre los que destacan los siguientes: a) La especie de cefalotórax de camarón empleada, b) El tamaño de partícula de la harina, c) El tiempo de almacenamiento de la misma y d) Los cuidados con los que se haya trabajado en el momento de la extracción.

Tabla 4-4. Cantidad de pigmentos obtenidos empleando la mezcla éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10)

Número de malla (Tamaño de partícula en mm)	Harina entera (μg pigmentos) (g de harina*)	Harina desmineralizada (μg pigmentos) (g de harina*)
60(0.177 a 250)	48.24 \pm 0.56	88.27 \pm 0.42
80(0.150 a 177)	57.24 \pm 1.05	113.09 \pm 0.67
100(\leq 0.150)	76.53 \pm 0.38	128.71 \pm 0.99

* Los resultados son el promedio de tres determinaciones

4.3.1 Purificación y caracterización de la astaxantina

En la Tabla 4-5, se reportan los valores de R_f del estándar de astaxantina y de los pigmentos obtenidos en esta investigación, así como, la identificación tentativa de éstos. También se muestran las longitudes de onda de máxima absorción de la astaxantina estándar y de la astaxantina extraída, resultado del barrido de UV-Vis.

Tabla 4-5. Identificación de la astaxantina y otros carotenoides provenientes del extracto etéreo y su comparación con la astaxantina estándar

Muestra	R_f	(λ) máxima nm	Identificación tentativa
Estándar de astaxantina	0.41	470	Astaxantina
Muestra del camarón	0.41	468	-Astaxantina
	0.63	ND	-Ésteres de astaxantina
	0.36	ND	-Astaceno

ND = No se determinó experimentalmente

En la cromatoplaque se apreciaron tres manchas características, la primera que corrió paralelamente con el estándar, cuyo R_f fue de 0.41, la cual, según la literatura es la correspondiente a la astaxantina, otra mancha, que presentó un R_f de 0.63, la cual podría identificarse con base en datos bibliográficos, como ésteres de astaxantina y, por último, una con un R_f de 0.36, que podría ser la forma oxidada de la astaxantina (Astaceno) (García, 1997).

Por otra parte, al hacer un barrido de UV-Vis para las muestras que presentaron un R_f de 0.41, se encontró que la astaxantina estándar presentó una longitud de onda de máxima absorción a 470 nm, mientras que para la muestra que se obtuvo experimentalmente, fue de 468 nm, por lo que se corrobora que se trata de astaxantina, pues la literatura indica que la longitud de onda de máxima absorción para la astaxantina en éter de petróleo es de 468-470 nm (Meyers y Bligh, 1981) (Figs. 4-1, 2).

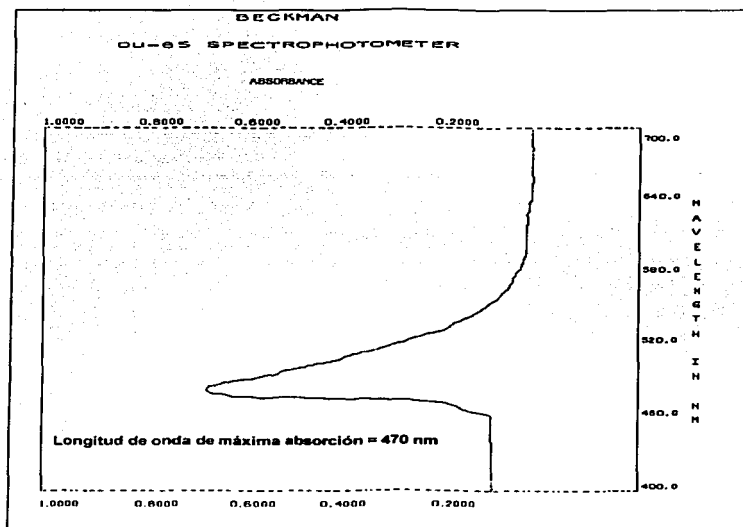


Fig.4-1. Barrido de UV-Vis de la astaxantina estándar SIGMA®

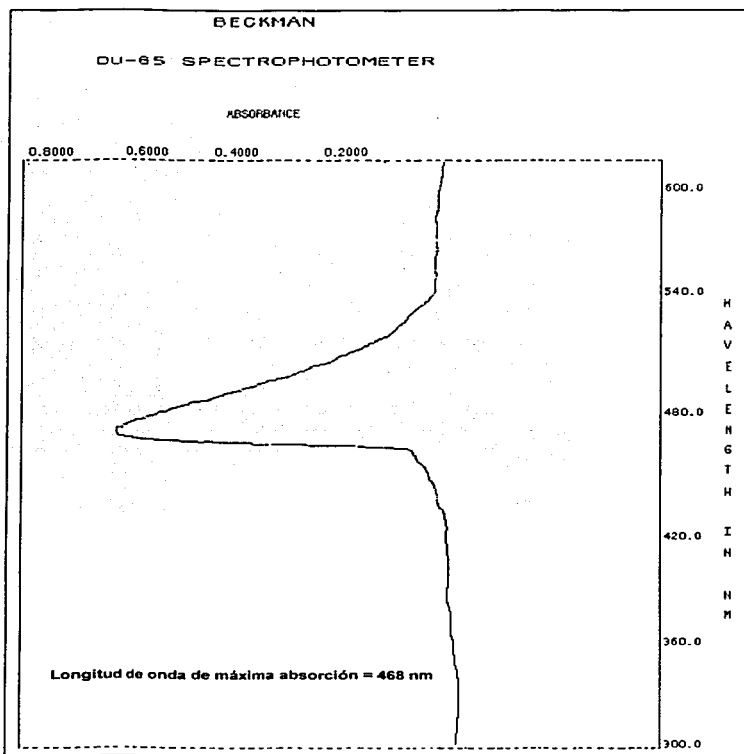


Fig.4-2. Barrido de UV-Vis de la astaxantina obtenida a partir del cefalotórax de camarón

Así mismo, al obtener los espectros de IR, tanto del estándar, como de la muestra obtenida en esta investigación, se observaron en ambos casos, las mismas bandas, características de la astaxantina, teniendo intensidades de bandas máximas en las regiones cercanas a 3480 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} y 1270 cm^{-1} , constatando con ello la presencia de grupos hidroxilo, de metilos y metilenos, del grupo carbonilo y de cetonas, respectivamente. En las Figuras 4-3 y 4-4 se aprecian los espectros de IR para la astaxantina estándar SIGMA® y para la astaxantina obtenida en esta investigación.

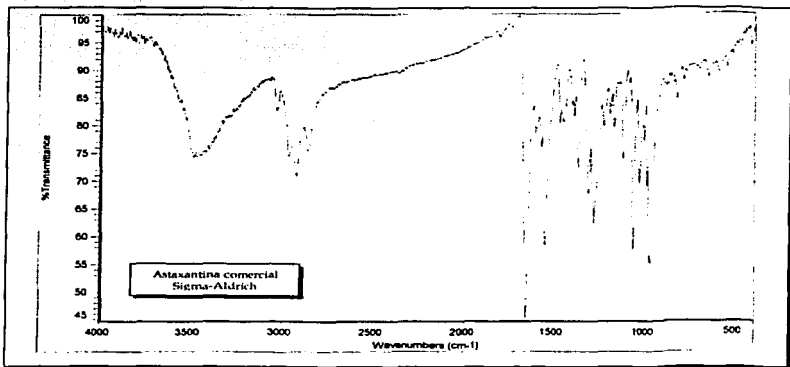


Fig.4-3. Espectros de IR para la astaxantina comercial SIGMA®

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

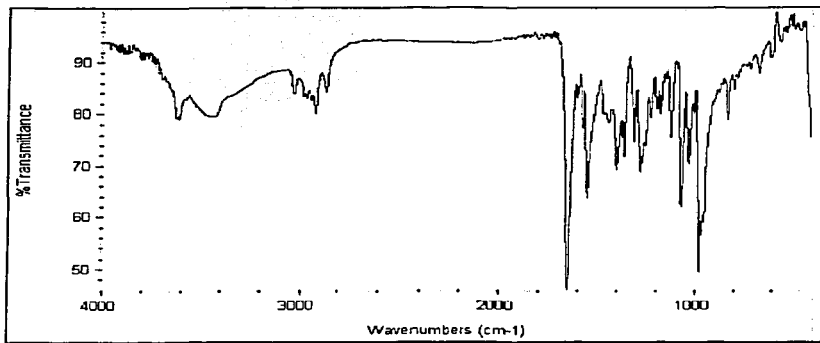


Fig.4-4. Espectros de IR para la astaxantina obtenida en esta investigación

4.3.2 Pruebas de estabilidad de los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes

La estabilidad de los pigmentos extraídos es buena, en comparación con los resultados obtenidos por Cañipa (1994). Este autor reporta que la adición de una mezcla de antioxidantes, BHA (butil-hidroxianisol) y BHT (butil-hidroxitolueno) al 0.1%, disminuyen la velocidad de oxidación en un 80% en el transcurso de cuatro semanas; sin embargo, en este trabajo se logró casi el mismo porcentaje (84.16%), en ocho semanas. Estos resultados favorables, se deben principalmente al empleo del antioxidante Etoxiquin®, que como se observa en la Tabla 4-6, presenta un efecto protector apreciable, pues en la muestra adicionada con el antioxidante, la estabilidad de los pigmentos fue un 20% mayor que en la muestra control (sin antioxidante).

La eficacia del Etoxiquin® (1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetilquinolina), se debe principalmente a la estructura de la molécula, ya que ésta, a diferencia del BHA y BHT, puede experimentar una gran variedad de reacciones dando lugar a productos más estables, retardando con ello, la velocidad de oxidación.

Es importante mencionar que, a pesar de ser buenos los resultados, la oxidación del pigmento es alta, ya que como se observa en la Tabla 4-6, desde la segunda semana, los pigmentos empezaron a oxidarse en un 3.75% y en la octava semana la oxidación fue del 15.84%.

Tabla 4-6. Pruebas de estabilidad en los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes

Semana	Control (μg pigmentos) (g de harina)	Control Retención (%)	MA (μg pigmentos) (g de harina)	MA Retención (%)
0	128.71	100	128.71	100
2	113.15	87.91	123.89	96.25
4	96.57	75.03	118.74	92.25
6	83.07	64.54	113.47	88.16
8	78.26	60.80	108.32	84.16

MA= Muestra con 0.5% de antioxidante (Etoxiquin)

4.4 Extracción y cuantificación de pigmentos empleando aceite de soya

En cuanto a la cantidad de pigmentos extraídos con el aceite de soya, se observó la relación existente entre el efecto del tamaño de partícula y la desmineralización. A diferencia del sistema de disolventes (Tabla 4-4), donde se observa una diferencia apreciable entre la extracción de harina entera y de harina desmineralizada (76.53 \pm 0.38 Vs 128.71 \pm 0.99), para partículas \leq 0.150mm,

los resultados obtenidos en la extracción con aceite, la harina desmineralizada y la harina entera presentan diferencias menores (Tabla 4-7).

Tabla 4-7. Cantidad de pigmentos obtenidos empleando aceite de soya

Número de malla (Tamaño de partícula en mm)	Harina entera (μg pigmentos) (g de harina*)	Harina desmineralizada (μg pigmentos) (g de harina*)
60 (0.177 a 250)	56.19 \pm 0.25	58.70 \pm 0.15
80 (0.150 a 177)	71.72 \pm 0.62	93.41 \pm 0.10
100 (\leq 0.150)	105.80 \pm 0.81	121.79\pm0.71

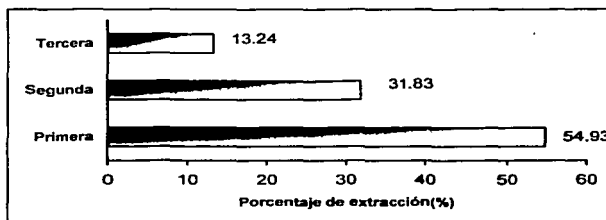
*Los resultados son el promedio de tres determinaciones

Cabe mencionar que no se pudo evitar que la harina desmineralizada tuviera una humedad mayor a la de la harina entera, ya que si ésta se exponía a temperaturas más altas o a tiempos más prolongados, los pigmentos se hubieran degradado con mayor rapidez. Tal vez la presencia del agua redujo la penetración del aceite en la harina y, por consecuencia, la extracción de pigmentos fue ligeramente menor (Tabla 4-7). Estos resultados pueden dar la pauta para iniciar una nueva línea de investigación.

La mayor cantidad de pigmentos extraídos se logró con la harina desmineralizada de malla No. 100, de la cual se extrajeron 121.7 \pm 0.71 μg de pigmentos/g de harina. Los resultados de esta parte experimental fueron inferiores a los encontrados por Chen y Meyers (1982a), quienes reportaron haber encontrado una cantidad de 161.5 μg pigmentos/g de harina, empleando al aceite de soya como medio extractor. Esto se debe principalmente a las diferencias existentes en la técnica de extracción, ya que ellos emplearon adicionalmente, una enzima

proteolítica, la cual favoreció la extracción de los pigmentos; además, como se mencionó anteriormente, la composición del cefalotórax de camarón, es un factor que también influye en la cantidad de pigmentos extraídos.

En la Gráfica 4-2, se presenta el porcentaje de pigmentos extraídos en cada una de las etapas de extracción (harina desmineralizada de malla No. 100), así como también se aprecia, que en la primera etapa de extracción, se obtiene más del 50% del total de los pigmentos obtenidos, mientras que en la tercera, solamente se obtuvo el 13.24%; sin embargo, esta última extracción aporta 16.12 μg pigmentos/g de harina.



Gráfica 4-2. Porcentaje de pigmentos obtenidos en cada una de la etapas de extracción

4.4.1 Pruebas de estabilidad de los pigmentos extraídos con aceite de soya

En la Tabla 4-8, se aprecia la cantidad de pigmentos retenidos en un transcurso de ocho semanas, para las muestras con y sin antioxidante. Se puede observar que durante las ocho semanas, la oxidación de los pigmentos fue de 9.4% en la muestra control y de 1.0% en la muestra con antioxidante. Para la muestra con antioxidante fue evidente su efecto, ya que como se observa en esta tabla, la

estabilidad de los pigmentos fue del 100%, hasta la segunda semana. Este efecto se debió principalmente al antioxidante adicionado, pero también se le atribuye al empleo del aceite de soya, debido a que el Etoxiquin es altamente soluble en el aceite, lo que aumenta su eficacia. Además de ello, el aceite de soya contiene tocoferoles, antioxidantes naturales que retardan la oxidación de los pigmentos.

Tabla 4-8. Pruebas de estabilidad en los pigmentos extraídos con aceite de soya usando "Etoxiquin"

Semana	Muestra sin antioxidante		Muestra con 0.5% de antioxidante	
	µg pigmentos por g de harina	Retención (%)	µg pigmentos por g de harina	Retención (%)
0	121.79	100	121.79	100
2	117.36	96.36	121.79	100
4	116.19	95.40	121.23	99.54
6	112.19	92.12	120.98	99.33
8	110.34	90.60	120.57	99.00

4.5 Rendimiento del proceso de extracción de pigmentos

En el Diagrama 4-1, se presenta un esquema en el que se describe todo el proceso de extracción del pigmento, a partir de 1000 g de cefalotórax de camarón fresco, así como el rendimiento entre cada una de las etapas. Este diagrama se basa en los datos experimentales obtenidos, por lo que es importante mencionar que la cantidad de harina desmineralizada es sólo la que se obtuvo en la malla No. 100, ya que en los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, se observó que para este tamaño de partícula, como era esperado, se obtuvo la mayor cantidad de pigmentos. Si se realizara el supuesto de que toda la harina obtenida fuera de malla No. 100 (que ocurre al llevar una remolienda de las otras fracciones), se obtendrían 8.09 g de pigmento para la

extracción con la mezcla de disolventes y 7.65 g para la extracción con aceite de soya, por lo que el rendimiento aumentaría en un 63.64%.

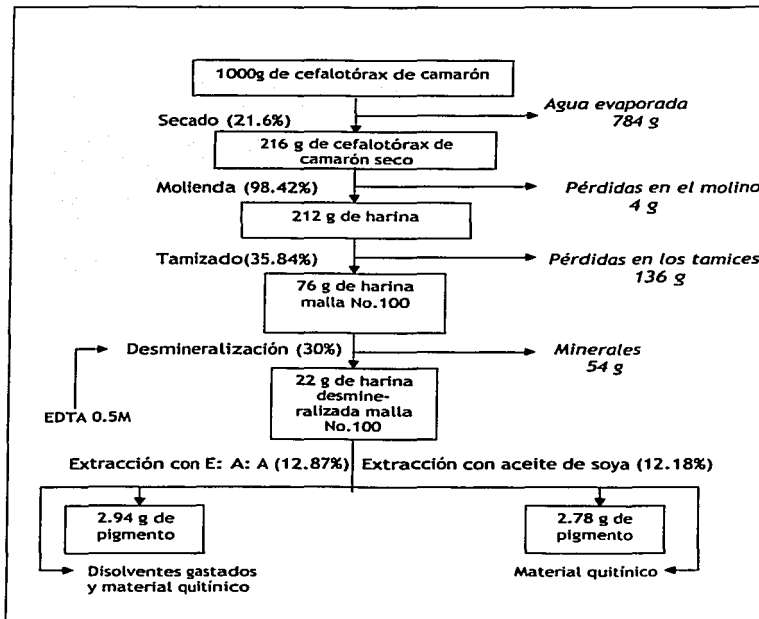


Diagrama 4-1. Rendimiento de pigmento a partir de 1000 g de camarón fresco

(En paréntesis se encuentra el porcentaje recuperado en cada etapa del proceso con respecto a la cantidad inmediata anterior)

En el Diagrama 4-1, se puede apreciar que la mayor merma de materia se presenta en el secado y que el rendimiento del pigmento obtenido a partir del cefalotórax de camarón fresco fue de 0.294%, mientras que partiendo de la harina desmineralizada, el rendimiento fue de 12.87% empleando la extracción con la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10). Para el caso de la extracción con aceite de soya el rendimiento fue de 0.278% a partir de cefalotórax fresco y de 12.18% a partir de harina desmineralizada.

4.6 Estimación preliminar de costos del proceso a nivel de laboratorio (Insumos, tiempo, gasto energético y equipo empleado)

A continuación se presenta una relación de los rendimientos, materiales, reactivos y tiempo necesarios para la obtención de los pigmentos carotenoides para ambos métodos de extracción. Es importante señalar, que en esta estimación de costos, únicamente se tomó en cuenta el gasto energético y el gasto por reactivos utilizados, por lo que todavía faltaría considerar varios rubros para obtener una evaluación preliminar en forma (Peters y Timmerhaus, 1991).

En la Tabla 4-9, se presentan el material, los reactivos, el equipo, el gasto energético y el tiempo, requeridos en cada una de las etapas del proceso, con lo cual se obtuvo el gasto energético total para ambas extracciones.

Tabla 4-9. Insumos, tiempo y equipo empleado en cada una de las etapas del proceso de extracción

Etapa del proceso	Material y reactivos	Equipo	Gasto energético (W)	Tiempo (horas)
Recolección y transporte de la muestra	NA	NA	NA	2
Lavado	Agua de la llave	NA	NA	1
Secado	NA	Cuarto de secado	11,196.48	24
Molienda	NA	Molino para cereales	1,880	1
Tamizado	NA	Tamizador eléctrico	2,913	0.45
Desmineralización	EDTA	-Parrilla de agitación	230	2
		-Estufa para secado	3471.44	8
Extracción con éter de petróleo:acetona:agua	-Éter de petróleo -Acetona -Agua -Na ₂ SO ₄ .anh	-Parrilla de agitación	345	3
		-Rotavapor	400	1
Extracción con aceite de soya	Aceite de soya	-Baño agitado	862.5	0.45
		-Centrífuga	2,845.5	0.45
Total extracción mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua			20.43kW/h	45.45
Total extracción con aceite de soya			23.40kW/h	42.35

NA = No se aplicó ningún método de evaluación o estimación

En el gasto energético ya se tiene contemplado el tiempo de uso del equipo, que es el que se indica en la Tabla 4-9 como tiempo (horas).

4.7 Costo de los pigmentos extraídos

En las Tablas 4-10 y 11 se indican los costos de los insumos y del consumo energético empleados para la obtención de 100 g de pigmento, con precios vigentes a la fecha de la realización del estudio (febrero, 2003). En la Tabla 4-10, se observa que el éter de petróleo representó un rubro importante en cuanto al costo, por lo que cabe señalar que este disolvente, junto con la acetona, deberían recuperarse mediante una destilación, para reducir costos y evitar problemas de contaminación ambiental. Además, deberán evaluarse *in vivo* los efectos de la presencia de residuos de estos disolventes en el pigmento.

Tabla 4-10. Costo estimado de 100 g pigmento (extracción con éter de petróleo:acetona:agua)

Insumo	Cantidad	Precio de referencia ⁽¹⁾	Total
Cabeza de camarón	33.99 kg	\$0.00	\$0.00
EDTA	2.89 kg	\$196.00/kg	\$566.83
Éter de petróleo ⁽²⁾	33.11 L	\$155.25/L	\$5606.07
Acetona ⁽²⁾	8.74 L	\$83.75/L	\$731.97
Na ₂ SO ₄	3.88 kg	\$46.00/kg	\$178.57
Antioxidante	0.016 L	\$39.00/L	\$62.91
Energía eléctrica	20.43 kWh ⁻¹	\$1.79/kWh ⁻¹	\$36.61
Total			\$7,182.97

(1) Precios en M.N. vigentes en el mercado al 15 de febrero del 2003

(2) Solventes recuperables

Tabla 4-11. Costo estimado de 100g pigmento (extracción con aceite de soya)

Insumo	Cantidad	Precio de referencia ⁽¹⁾	Total
Cabeza de camarón	35.91 kg	\$0.00	\$0.00
EDTA ⁽²⁾	3.05 kg	\$196.00/kg	\$598.98
Aceite de soya ⁽²⁾	25.48 L	\$9.25/L	\$235.70
Antioxidante ⁽²⁾	0.010 L	\$3914 /L	\$41.63
Energía eléctrica	23.40 kWh ⁻¹	\$1.79/kWh ⁻¹	\$41.93
Total			\$918.25

(1) Precios en M.N. vigentes en el mercado al 15 de febrero del 2003

El costo de 100 g de pigmento obtenido mediante el método de extracción con la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua, sería de \$7,182.97 (\$71.82/g pigmento), lo que parecería ser un costo muy elevado, pero que si se compara con el precio de la astaxantina comercial marca Sigma-Aldrich (\$1,973 por gramo de pigmento), es un costo mucho menor; sin embargo, es importante mencionar que para estos costos no se tomaron en cuenta horas-hombre, costos de materiales y equipos, gastos administrativos, etc., solamente, se consideraron los costos de los reactivos y el gasto energético. Para el caso de la extracción empleando aceite de soya, el costo del pigmento fue de \$9.18 por gramo de pigmento, casi diez veces menor que el obtenido por medio de disolventes, con la ventaja de tener un disolvente inocuo para seres vivos.

4.8 Principales diferencias entre los métodos empleados

Las diferencias básicas entre los dos métodos estudiados fueron las siguientes:

- Los tiempos empleados en la extracción de pigmentos fueron notoriamente diferentes. Se requiere un proceso más largo y, por ende, más costoso si se utiliza la extracción con éter de petróleo:acetona:agua.
- La cantidad de reactivos utilizados fue mayor para la extracción con la mezcla de disolventes, lo que implica, como en el caso anterior, un proceso más costoso.
- En cuanto a la estabilidad, los carotenoides aislados en la extracción con la mezcla de disolventes, requieren forzosamente de la adición de antioxidantes para mantenerlos estables durante un periodo de ocho semanas. En cambio, en la extracción con aceite de soya, el antioxidante fue necesario, mas no fundamental y tal vez podría utilizarse una menor concentración de antioxidante, pues como se observó en los resultados, gracias a las propiedades del aceite y del antioxidante, el pigmento se conservó estable.
- En el método que emplea la mezcla de disolventes, se presenta el riesgo de que el pigmento quede con pequeñas trazas de éstos, además del manejo de solventes inflamables y explosivos.

-
- En el método de extracción con aceite de soya, el pigmento podría emplearse directamente en la formulación de dietas para especies acuícolas. Con el otro método se requiere, además de una purificación por la posible presencia de trazas de disolvente, resuspenderlo para formulaciones específicas.

4.9 Selección del método óptimo para la extracción de pigmentos carotenoides

Para poder definir cuál de los dos métodos es el más conveniente desde el punto de vista económico y de calidad, debe hacerse un análisis de las ventajas y las desventajas de cada uno de ellos. Por consiguiente a continuación se muestran los aspectos que se deben considerar.

4.9.1 Calidad del producto obtenido

a) Estabilidad

La diferencia básica entre los dos métodos de extracción es el tipo de producto que se obtiene. En el caso del método con aceite de soya, el pigmento ya no se separa del aceite, el cual le da estabilidad al pigmento, por la presencia de antioxidantes naturales como los tocoferoles y, si además se le adiciona el etoquin, la estabilidad aumenta en gran medida. En cambio, en la extracción con disolventes, no se cuenta con la presencia de antioxidantes naturales, por lo que en este caso es necesaria la adición de un antioxidante, a pesar de que el producto se encuentre almacenado al abrigo de la luz y a una temperatura de 4°C.

b)Calidad nutrimental

Otro aspecto que se considera dentro de la calidad, es el valor nutrimental que aporta el producto. En ambos casos se logró la extracción del pigmento, que al ser del grupo de los carotenoides, es precursor de la vitamina A, la cual es esencial para el buen funcionamiento del organismo. Adicionalmente, en el método de extracción con aceite de soya, el aceite contiene los principales ácidos grasos esenciales como lo son el linoleico y el linolénico (Bailey, 1979).

c)Inocuidad de los pigmentos extraídos

Las astaxantinas son pigmentos que son aceptados como aditivos no tóxicos, que se pueden emplear tanto en alimentación animal como en la humana. Sin embargo, se debe considerar el método que se utilizó, para así garantizar la inocuidad del producto. En el proceso por extracción con la mezcla de disolventes, se elimina la acetona y se evapora el éter de petróleo; sin embargo, existe la posibilidad de que queden trazas del o de los disolventes, los cuales son tóxicos.

4.9.2 Rendimiento del producto obtenido

En el método de extracción con aceite de soya, la mayor cantidad de pigmentos que se obtiene es de 121.79 μg pigmentos/g harina, que está por arriba de la cantidad de pigmentos extraídos por otros autores, como Cañipa (1994), el cual obtuvo 20.57 μg pigmentos/g harina empleando una mezcla de disolventes, al igual que Ramírez (2003), que obtuvo cerca de 100 μg pigmentos por g harina empleando una enzima quitinolítica que, aunque es un valor cercano al obtenido

en esta investigación implica un aumento en los costos por el proceso enzimático involucrado.

4.9.3 Impacto ambiental de los procesos desarrollados

Por otra parte, si el objetivo de la utilización de los desechos de la industria camarónica es evitar el daño al ambiente, la selección del proceso que permita aprovechar dichos residuos, debe utilizar un método que no genere residuos tóxicos o difíciles de tratar. En uno de los métodos, la desventaja es que se utilizan disolventes químicos que generan daños al ambiente durante su evaporación y estos son muy volátiles, lo que puede causar explosiones o incendios. Para su recuperación y reutilización se requieren cantidades importantes de energía y el equipo apropiado. En ambos casos se obtiene harina despigmentada, la cual puede aprovecharse para la obtención de quitina y su derivado desacetilado, la quitosana. Naturalmente, debe considerarse para el proceso posterior de obtención de quitina, la problemática asociada a tener cualquiera de los dos residuos de disolventes, aceite o disolventes químicos. Actualmente, se están estudiando estas opciones (Flores, 2003).

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de este trabajo son las siguientes:

- La reducción del tamaño de partícula y la desmineralización de la harina, son factores que benefician e incrementan la extracción de pigmentos carotenoides independientemente del método de extracción empleado.
- El método de extracción con la mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), en una relación masa:volumen de 1:10, durante 3 horas, a temperatura ambiente, agitación constante y al resguardo de la luz para las tres granulometrías (mallas 60, 80 y 100), dio la mayor cantidad de pigmentos (128.71 µg de pigmentos/g harina desmineralizada y 76.53 µg de pigmentos/g harina sin desmineralizar con la malla No. 100).
- El mejor método para la extracción de pigmentos, fue el método de extracción empleando aceite de soya, que se usó con una relación masa:volumen 1:10, ya que se obtuvo casi la misma cantidad de pigmentos que empleando la mezcla de disolventes (121.79 µg de pigmentos/g harina desmineralizada malla No.100); pero además de requerir un menor tiempo y un menor costo, los pigmentos presentaron una estabilidad mayor, un posible mayor valor nutrimental potencial, con la ventaja de que pueden emplearse directamente en la formulación de dietas para especies acuícolas (Luna, 2003).

-
- Por medio de cromatografía en capa fina (TLC), espectroscopia UV-Vis e IR se logró evaluar la presencia de la astaxantina en el pigmento obtenido con la mezcla de disolventes.
 - El empleo del Etoxiquin®, en una concentración de 500 ppm, retardó la oxidación de pigmentos en un lapso de ocho semanas, en hasta un 99.0% para el caso de la extracción con aceite de soya y en un 84.16% para la extracción con la mezcla de disolventes, por lo que es recomendable el empleo de este antioxidante, una vez probada su inocuidad con seres vivos.
 - La estabilización de los pigmentos en la extracción con aceite de soya, fue mucho mayor que en la extracción con la mezcla de disolventes orgánicos, debido a que el aceite de soya contiene también antioxidantes naturales, los cuales presentan un efecto sinergista con el Etoxiquin .
 - El rendimiento del pigmento a partir de harina desmineralizada empleando la malla No. 100 fue de 12.87% para la extracción con la mezcla de disolventes y de 12.18% para la extracción con el aceite de soya; es decir, que a partir de 100 g de harina desmineralizada se obtuvieron 12.87 g de pigmento en la extracción con la mezcla de disolventes y 12.18 g de pigmentos en la extracción con el aceite de soya.

-
- El costo de los pigmentos obtenidos, para el caso de la extracción con la mezcla de disolventes y para el aceite de soya, fue de \$71.83 y \$9.18 por gramo de pigmento, respectivamente, los cuales se encuentran muy por debajo del costo del pigmento comercial (\$1,973 por gramo de pigmento), por lo que se considera un proceso factible para la obtención de astaxantina.

El cefalotórax de camarón es un subproducto que puede y debe ser aprovechado. Se cuenta con las ventajas de que proviene de un recurso renovable, es una materia prima que no tiene ningún costo, ya que es considerada como un desperdicio y, además, posee un potencial industrial muy grande especialmente como fuente de pigmentos, quitina, quitosana y proteínas. A esto, debe agregarse que se evitaría el problema de estos residuos contaminantes, tanto en altamar como en tierra.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer la separación del pigmento en el aceite, para así poder analizar e identificar los componentes presentes y las proporciones en las que éstos se encuentran.
- Se sugiere hacer un análisis de costos más detallado, en el cual se involucren aspectos como mano de obra y gastos administrativos, para así poder hacer una mejor comparación, en cuanto costos, con el producto comercial.
- Adicionalmente, se recomienda hacer un estudio *in vivo* con dietas en especies acuícolas para probar la asimilación de este pigmento y comprobar de esta forma la efectividad del pigmento en relación a la coloración impartida en los tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- **Alava, V; Kanazawa, S; Teshima y Koshio, S.** 1993. "Effect of Dietary Phospholipids and n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids on Ovarian Development of Kuruma Prawn". *Agric. Food Chem.*, 59(2):345.
- **AOAC.** 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. EEUUA.
- **Bailey, A.** 1979. Aceites y grasas industriales. Tercera edición. Editorial Reverté, S.A. Pp.183-239. Barcelona, España.
- **Bertullo, V.** 1995. Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos. Editorial Limusa. Pp. 643-654. México D.F., México.
- **Bickoff, E; Thompson, C; Livingst, A; Van Atta,G y Guggolz, E.** 1955. "Effect of Added Animal Fats and Vegetable Oils on Stability of Carotene in Dehydrated Alfalfa Meal". *Agric. Food Chem.*, 3(1):67-69.
- **Cañipa, J y Durán-de-Bazúa, C.** 1997. "Reaprovechamiento del cefalotórax de camarón, un proyecto exitoso". *Industria Alimentaria*, 19:105-112.
- **Cañipa, J.** 1994. Estudio químico sobre el aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Tesis de maestría. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
- **Chen, H. M y Meyers, S. P.** 1982a. "Extraction of Astaxanthin Pigment from Crawfish Waste Using a Soy oil Process". *J. Food Sci.*, 47:892-896.
- **Chen, H. M y Meyers, S. P.**1982b. "Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract". *J. Agric. Food Chem.*, 30:469-473.

-
- Chien, Y; Jeng, S. 1992. "Pigmentation of Kuruma prawn, *Peneaus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes". *Aquaculture*, 102:333-346.
 - Colgate, M. y Molyneux, R. 2000. "Detection, isolation and structural determination of asthaxantin". *J. Food Sci.*, 25:229-233.
 - Coultate, T. 1999. *Food. The chemistry of its components. Third Edition.* Royal Society of Chemistry. Pp. 106-125. London, UK.
 - Escobedo, G. 1994. Obtención de quitina por métodos enzimáticos a partir del cefalotórax de camarón. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
 - Flores, R. 2003 Bioplásticos de quitina: Desarrollo de contenedores desechables para la industria alimentaria. Tesis de maestría (en desarrollo). UNAM, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, México D.F., México.
 - García, R. 1997. Extracción enzimática de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón empleando una proteasa comercial. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
 - Gean Koplis, C. 1992. *Procesos de transporte y operaciones unitarias.* Editorial CECSA. Pp. 612-617. México, D.F., México.
 - Gildberg, A. y Stenberg, E. 2001. "A new process for advanced utilisation of shrimp waste". *Process Biochem.*, 36:809-812.

-
- Grundy, S. y Abrams, J. 1995. Comparison of actions of soy protein and casein on metabolism of plasma lipoproteins and cholesterol in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38:245-252.
 - Hendrickx, M. 1996. Los camarones *Penaeoidea bentónicos* del Pacífico mexicano. Editorial CECSA. Pp. 120-140. México, D.F., México.
 - Holland, C. D. 1981. Fundamentos y procesos de separación: Absorción, destilación, evaporación y extracción. Editorial Prentice /Hall international. Pp. 173-174. Nueva York, EUUAA.
 - John, M. 1990. Principles of food chemistry. Second edition. Plenum Press. Nueva York, EUUA. Pp. 217-233.
 - Johnson, E.A y Gil-Hwan, A. 1991. "Astaxantin from Microbial Sources". *Critical Reviews in Botechnology*, 11:297-326.
 - Kanemitsu, T. y Aoe, H. 1958. "Studies on the carotenoids on salmon. Identification of the muscle pigments. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 24:209-215.
 - Kelley, C.E. y Harmon, A.W. 1972. "Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products". *Fish. Bull.*, 70(1):111-113.
 - Knorr, D. 1991. "Recovery and utilization of chitin and chitosan in food procesing waste management". *Food Technol.*, 45(1):14-17.
 - Lovell, T.; Lafleur, R.; Hoskins, H. 1968. "Nutritional Values of Freshwater Crayfish Waste Meal". *J. Agr. Food Chem.*, 16(2):204-207.

-
- Luna, A. 2003. Extracción con lípidos de los pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su evaluación como ingrediente de dietas en larvicultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
 - Meyers, S.P. y Bligh, D. 1981. "Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste". J. Agric. Food Chem., 29:505-508.
 - Miki, W. 1991. "Biological functions and activities of animal carotenoids". Pure Appl. Chem., 63(1)141-146.
 - Naguib, M. 2000. "Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids". J. Agric. Food Chem., 48:1150-1154.
 - No, H.; Meyers, S. y Lee, K. 1989. "Isolation and Characterization of Chitin from Crawfish Shell Waste". J. Agric. Food Chem., 37:575-581.
 - Peters, M. y Timmerhaus, K. 1991. Plant design and economics for chemical engineers. 4a. Ed. Mc Graw-Hill. Nueva York, EUUAA.
 - Ramírez, M.A. 2003. Empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de carotenoproteínas a partir del cefalotórax del camarón. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México D.F., México.
 - Rutledge, J.E. 1971. "Decalcification of Crustacean Meals". J. Agric. Food Chem., 19(2):236-237.
 - Salazar, M. 1999. "La astaxantina y su biosíntesis". Depto. de Biotecnología. UAM-I. México, D.F., México.

-
- Sanz, M. 1998. Artes y tecnología pesquera. Editorial Limusa. Pp.203-209. México, D.F., México.
 - SEMARNAT. 2001. Estadístico de pesca (Enero-Abril). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Poder Ejecutivo Federal. México D.F., México.
 - Shahidi, F. y Synowiecki, J. 1991. "Isolation and Characterization of Nutrients and Value- Added Products from Snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards". J. Agric. Food Chem., 39:1527-1532.
 - Spinelli, J. 1974. "Composition, processing and utilization of red crab (*Pleuronectes planipes*) as an acuacultural feed ingredient". J. Fisheries Research Board of Canada, 31(6):1025-1029.

ANEXO 1

FOTOGRAFÍAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

Fig.1 Obtención del cefalotórax de camarón



Fig.2 Lavado del cefalotórax de camarón



Fig.3 Cabezas de camarón escurriéndose



Fig.4 Cuarto de Secado



Fig.5 Extracción con la mezcla de disolventes

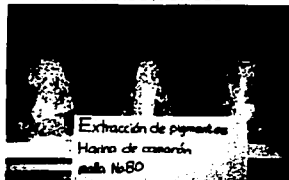


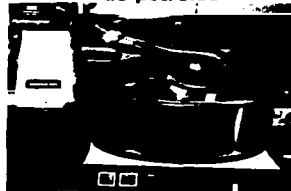
Fig.6 Filtración



**Fig.7 Separación de fases
(Pigmentos en la fase etérea)**



**Fig. 8 Evaporación del éter
de petróleo**



**Fig.9 Pigmentos extraídos
con la mezcla de disolventes**



**Fig.10 Extracción con
aceite de soja**



**Fig.11 Después de la
centrifugación en aceite**



Fig.12 Aceite pigmentado



ANEXO 2

MÉTODOS ESTABLECIDOS PARA REALIZAR EL ANÁLISIS PROXIMAL (AOAC, 1990)

a) Determinación de humedad

Método de secado en la estufa

Es un método basado en la eliminación del agua del alimento y su medida por la pérdida de peso o la cantidad de agua separada.

Es aplicable a todos los productos alimenticios excepto los que puedan contener volátiles o los que son susceptibles a la descomposición a 100°C.

Procedimiento

Pesar de 2 a 3 g de la muestra en un pesafiltro con tapa, que ha sido previamente pesado después de ponerlo a peso constante 2 h aproximadamente a 130°C. Secar la muestra 2 h en la estufa a 100-110°C. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto se equilibre con la temperatura ambiente. Calcular el porcentaje de humedad.

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

donde:

A = Peso del pesafiltro + muestra húmeda

B = Peso del pesafiltro + muestra seca

m = Peso de la muestra en gramos

b) Determinación de cenizas

Pesar de 3 a 5 g de muestra en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado, después de ponerlo a peso constante 2 h. En la mufla a 600°C, calcinar la muestra, primero con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos y después meter a la mufla 2 h cuidando de que la temperatura no sobrepase los 550°C. Repetir la operación anterior si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar. Calcular el porcentaje de cenizas.

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

donde:

A = Peso de la cápsula + cenizas

B = Peso de la cápsula vacía

m = Peso de la muestra en gramos

c) Determinación de fibra cruda

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico y sosa hirvientes al 1.25%. El compuesto más abundante de este residuo es la celulosa y en menores cantidades hemicelulosas, ligninas y pentosanas.

Procedimiento

Pesar 2 gramos de muestra desengrasada y seca (se utiliza la muestra que quedó en el cartucho de la determinación de grasa cruda). Colocar la muestra en el vaso digestor, añadir 1 g de asbesto preparado, 200 mL de solución de H₂SO₄ al

1.25% (0.255 N) hirviendo y antiespumante. Calentar de inmediato (debe empezar a hervir antes de 1 minuto), llevar a reflujo durante 30 minutos, rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se pegan en la pared del vaso. Filtrar a través de papel seda especial, usando vacío, lavar con cuatro porciones de 50 mL de agua de la llave caliente hasta que no se dé reacción ácida con rojo de metilo. El residuo que queda en el filtro se pasa por medio de una espátula al vaso digestor, ya limpio, y se repite la operación con 200 mL de NaOH al 1.25% (0.313 N) hirviendo. Después de realizar el reflujo durante 30 minutos, se filtra sobre el mismo papel seda, se lava con 25 mL de H₂SO₄ al 1.25% y con tres porciones de 25 mL de agua de la llave caliente y, finalmente, con 25 mL de alcohol. Pasar cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua y filtrar sobre un crisol gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado durante una hora a 600°C. El crisol gooch con el residuo se lleva a la estufa a 130°C, se deja enfriar y se pesa. Llevar a la mufla y calcinar a 600°C durante 30 min, enfriar y pesar.

El cálculo para conocer el porcentaje de fibra cruda se realiza aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{(A-B) \times 100}{m}$$

donde:

A = Peso del gooch después de 2 h a 130°C

B = Peso del gooch después de calcinar 30 min a 600°C

m = Peso de la muestra en gramos

d) Determinación de proteína

Método de Macro-Kjeldahl

Es un método cuantitativo que determina la cantidad de nitrógeno total. Se divide principalmente en tres etapas : 1) Digestión, 2) Destilación y 3) Titulación.

Procedimiento

Se pesan de 0.5 a 1 g de muestra en un papel delgado, con todo y papel se introduce en un matraz Kjeldahl de 800 mL, se agrega 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y un pedazo de plato poroso o perlas de vidrio. El matraz es colocado en el digestor del equipo Kjeldahl y se calienta hasta la destrucción total de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido quede transparente, con una coloración azul-verdosa. La muestra se deja enfriar hasta temperatura ambiente, y se diluye con 350 mL de agua destilada fría, por último se enfría sobre hielo.

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se adicionan 50 mL de HCl 0.1N y unas gotas del indicador de rojo de metilo o bien 50 mL de ácido bórico al 4% (40 g de ácido bórico, 35 mL de fenolftaleína al 0.1%, 10 mL de mezcla de verde de bromocresol 0.33% y rojo de metilo 0.66 % aforar a 1 L). El matraz es colocado en el aparato de destilación asegurándose de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

Se añade lentamente y resbalando por la pared del matraz Kjeldahl 40 mL de una solución concentrada de hidróxido de sodio (1:1), que también ha sido enfriada sobre hielo y se adiciona polvo de zinc. Se conecta inmediatamente el matraz en

La trampa Kjeldahl y agita hasta mezclar las dos capas. Destilar aproximadamente hasta un volumen de 150 mL, retirando posteriormente el matraz Erlenmeyer, lavando la alargadera con especial cuidado de recoger sobre el destilado las aguas de lavado. Se titula el exceso de ácido, en el caso de recibir el destilado en HCl, con una disolución de NaOH 0.1 N y en el caso de recibir con ácido bórico, se emplea una solución de HCl 0.1 N. Efectuar una prueba en blanco empleando la misma cantidad de papel y el % de proteína es calculado empleando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de proteína cruda} = \frac{(V_b - V_m) \times \text{meq} \times N \times 100 \times F}{m}$$

donde:

V_b= Volumen gastado en el blanco
V_m= Volumen gastado en la muestra
meq= miliequivalentes de nitrógeno (PM/1000 = 0.014)
N= Normalidad de la solución de NaOH (exactamente valorada)
m= gramos de muestra
F= factor de conversión (5.4)

e) Determinación de grasa cruda o extracto etéreo

Método de Goldfisch

La grasa se extrae con éter de petróleo a partir del residuo desecado. El disolvente se elimina por evaporación y se pesa el residuo de grasa.

Procedimiento

Poner un vaso para Goldfisch a la estufa a 100°C hasta peso constante (aproximadamente 2 horas). Pesar de 4 a 5 gramos de muestra sobre un papel,

enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón. Posteriormente se coloca el cartucho en un sostén o recipiente con el fondo perforado y se coloca en el equipo. Se adicionan en el vaso para Goldfisch 40 mL de éter de petróleo y se colocan en el equipo mediante un anillo metálico con empaque. Posteriormente se sube la parrilla girando hacia un lado y posteriormente hacia el otro. Calentar hasta la extracción completa de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, teniendo en cuenta que al evaporarse el éter no debe haber residuo de grasa. Al finalizar la extracción, cambiar el sostén del cartucho por un recipiente sin perforación y calentar de nuevo para recuperar el éter del vaso. Quitar el vaso del equipo y secar el extracto a 100°C por 30 min, enfriar y pesar. Calcular el porcentaje de grasa.

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

donde:

A = Peso del vaso con grasa

B = Peso del vaso vacío

m = Peso de la muestra en gramos