



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Extracción de pigmentos de residuos de cangrejo azul (*Canellectes sapidus*)
fermentados y no fermentados.**

QUE PRESENTA:

CUAUHTEMOC DE DIOS NARANJO

TUTORA: DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA.

ASESORES: DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA.

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE DE 2002

Índice general

I. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	4
2. Revisión bibliográfica.....	7
2.1. Cangrejo azul.....	7
2.1.1. Características del cangrejo azul.....	7
2.1.2. Composición química.....	10
2.2. Producción de cangrejo azul en el mundo y en México.....	11
2.3. Subproductos de cangrejo y su utilización.....	12
2.3.1. Composteo.....	13
2.3.2. Ensilaje.....	13
2.3.3. Producción de suplemento alimenticio para animales.....	14
2.3.4. Extracción de quitina.....	14
2.3.5. Producción de hidrolizados de proteína.....	15
2.4. Pigmentos.....	15
2.4.1. Pigmentos sintéticos y naturales.....	16
2.4.2. Carotenoides y xantofilas.....	18
2.4.2.1. Fuentes.....	21
2.4.2.2. Carotenoides de origen acuático.....	21
Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4, 4').....	22
Equinona (β , β -caroteno-4 diona).....	23
Cantaxantina (β , β -caroteno-4, 4'-diona).....	23
Zeaxantina (β , β -caroteno-3, 3'-diol).....	24
β -caroteno (β , β -caroteno).....	24
Astaceno (β , β -caroteno-3, 3',4, 4'-tetrona).....	25
2.4.3. Extracción de pigmentos de residuos acuáticos.....	26
2.4.3.1. Extracción por disolventes y aceites.....	26
2.4.3.2. Extracción en residuos fermentados.....	32
2. 5. Color.....	33
2.5.1. Definición de color.....	33
2.5.2. Medición de color.....	36
2.5.2.1. Métodos espectrofotométricos.....	37
2.5.2.1. Métodos colorimétricos.....	37

III. Materiales y métodos.....	39
3.1. Materia prima.....	39
3.2. Preparación de las muestras.....	39
3.3. Extracción de pigmentos.....	40
3.4. Extracción de pigmentos empleando fermentación láctica.....	43
3.4.1. Desmineralización de residuos.....	43
3.4.2. Fermentación láctica.....	45
3.4.2.1. Cultivo iniciador.....	46
3.4.2.2. Condiciones de la fermentación.....	46
3.5. Análisis fisicoquímicos.....	47
3.5.1. pH.....	47
3.5.2. Proteína total.....	47
3.5.3. Lípidos.....	47
3.5.4. Cenizas.....	48
3.5.5. Calcio.....	48
3.5.6. Proteína soluble.....	48
3.5.7. Xantofilas totales.....	49
3.5.8. Color.....	49
3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	50
IV. Resultados y discusión.....	53
4.1. Extracción con disolventes.....	53
4.1.1. Residuo sólido.....	53
4.1.1.1. Secado de materia prima.....	53
4.1.1.2. pH.....	53
4.1.1.3. Proteína total.....	54
4.1.1.4. Lípidos.....	57
4.1.1.5. Cenizas.....	59
4.1.1.6. Carbonato de calcio.....	61
4.1.2. Filtrado.....	63
4.1.2.1. pH.....	63
4.1.2.2. Proteína soluble.....	64
4.1.2.3. Xantofilas totales.....	65
4.1.2.4. Color.....	67
Luminosidad.....	67
Tonalidad.....	69
Cromaticidad.....	71
4.2. Fermentación láctica.....	72
4.2.1. Residuos sólidos.....	72
4.2.1.1. Desmineralización de residuos sólidos.....	72
4.2.1.2. pH.....	74

4.2.1.3. Proteína total.....	75
4.2.1.4. Cenizas.....	76
4.2.1.5. Carbonato de calcio.....	77
4.2.2. Filtrado de la fermentación.....	78
4.2.2.1. pH.....	78
4.2.2.2. Proteína soluble.....	79
4.2.2.3. Xantofilas totales.....	80
4.2.2.4. Color.....	81
Luminosidad.....	81
Tonalidad.....	82
Cromaticidad.....	83
IV. Conclusiones.....	84
Bibliografía.....	85
Anexo 1. Curva de calibración para la determinación de calcio por espectrofotometría de absorción atómica.....	93
Anexo 2. Determinación de proteína soluble por el método biuret.....	94
Anexo 3. Extracción con solventes: análisis de varianza.....	95
Anexo 4. Extracción con solventes: comparación multiple de medias de Duncan: sistemas de disolventes.....	96
Anexo 5. Extracción con solventes: comparación multiple de medias de Duncan: tiempo de extracción.....	97
Anexo 6. Extracción con solventes: análisis de varianza: contenido de calcio.....	98
Anexo 7. Extracción con solventes: comparación múltiple de medias de Duncan: contenido de calcio (sistemas de solventes).....	99
Anexo 8. Extracción con disolventes: comparación múltiple de medias de Duncan : contenido de calcio (etapa de extracción).....	100
Anexo 9. Fermentación láctica. Regresión lineal.....	101
Anexo 10. Fermentación láctica. Regresión lineal: coeficientes de regresión.....	102
Anexo 11. Fermentación láctica. Prueba t de student: contenido de calcio.....	103

Índice de Figuras

Figura 1 . Resumen sistematizado del <i>phylum</i> Artrópoda.....	7
Figura 2. Anatomía del cangrejo azul <i>C. sapidus</i>	8
Figura 3. Producción de jaiba (<i>C. Sapidus</i>) en la República Mexicana.....	12
Figura 4. Cadena isoprenoide de carotenoides.....	18
Figura 5. Estructura química de un carotenoide.....	19
Figura 6. Estructura de una xantofila.....	20
Figura 7. Estructura química de la astaxantina.....	22
Figura 8. Estructura química de la equinona.....	23
Figura 9. Estructura química de la cantaxantina.....	24
Figura 10. Estructura química de la zeaxantina.....	24
Figura 11. Estructura química del β -caroteno.....	25
Figura 12. Estructura química del astaceno.....	25
Figura 13. Diagrama de flujo de obtención del complejo de proteína-pigmento en desechos de camarón y cangrejo según Simpson (1978).....	27
Figura 14. Diagrama de flujo de obtención de pigmentos y quitina a partir de desechos de crustáceos según Shahidi y Synowiecki.(1991).....	29
Figura 15. Diagrama de flujo de la obtención y caracterización de los pigmentos obtenidos del cangrejo de arena (<i>Emerita analoga</i>) según Gilchrist y Lee.....	30
Figura 16. Diagrama de flujo de la obtención de carotenoides a partir de desechos de cangrejo de río según Meyers y Bligh 1981).....	31
Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de extracción enzimática integral de quitina, astaxantina e hidrolizado de proteína según Gildberg y Stenberg (2001).....	32
Figura 18. Representación esquemática de la absorción de luz de sólidos coloridos.....	34
Figura 19. Efectos de cambios de color en pigmentos.....	35

Figura 20. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima.....	39
Figura 21. Diagrama de flujo del proceso de extracción con el sistema de disolventes agua/cloroformo/metanol y éter de petróleo/acetona/agua.....	41
Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de extracción con el sistema etanol/agua.....	42
Figura 23. Diagrama de flujo del proceso de extracción con aceite de soya.....	43
Figura 24. Diagrama de flujo del proceso de desproteinización- desmineralización de los residuos de cangrejo azul.....	44
Figura 25. Diagrama de flujo del proceso de estabilización por fermentación láctica.....	45
Figura 26. Contenido de pH en los residuos sólidos de cangrejo azul en los 4 sistemas de disolventes.....	54
Figura 27. Contenido de proteína total en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes utilizados.....	56
Figura 28. Contenido de lípidos en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.....	58
Figura 29. Contenido de cenizas en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes utilizados.....	60
Figura 30. Contenido de calcio en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes utilizados.....	62
Figura 31. pH en los filtrados de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.....	63
Figura 32. Contenido de proteína soluble en el filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes utilizados.....	64
Figura 33. Contenido de xantofilas totales en el filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.....	66
Figura 34. Luminosidad del filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.....	68
Figura 35. Tonalidad en el filtrado de cangrejo azul bajo los 4 sistemas de disolventes utilizados.....	70
Figura 36. Cromaticidad en el filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.....	71

Figura 37. Porcentaje de proteína en la desmineralización empleando diferentes porcentajes de ácido acético 1N.....	72
Figura 38. Porcentaje de cenizas en la desmineralización de residuos de cangrejo azul empleando diferentes porcentajes de ácido acético 1N.....	73
Figura 39. pH del residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	74
Figura 40. Contenido de proteína total en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	75
Figura 41. Contenido de cenizas en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	76
Figura 42. Contenido de carbonato de calcio en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	77
Figura 43. pH del filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul en fermentado.....	79
Figura 44. Contenido de proteína soluble en el filtrado de cangrejo azul	79
Figura 45. Contenido de xantofilas totales en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	80
Figura 46. Luminosidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	81
Figura 47. Tonalidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	82
Figura 48. Cromaticidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Captura del cangrejo azul en algunos de los Estados en la República Mexicana en 2000.....	4
Tabla 2. Abundancia relativa de carotenoides en extractos de epidermis y caparazón en <i>E. analoga</i>	5
Tabla 3. Análisis químico y valores PER de camarón y cangrejo.....	5
Tabla 4. Composición de la cutícula del cangrejo azul <i>C. Sapidus</i>	9
Tabla 5. Contenido de aminoácidos en la cutícula del cangrejo azul.....	10
Tabla 6. Composición aproximal (%) de cangrejos azules enteros.....	10
Tabla 7. Producción de quitina no aprovechada a partir del <i>C. sapidus</i>	14
Tabla 8. Especificaciones de los pigmentos sintéticos según al Norma Oficial Mexicana.....	16
Tabla 9. Colorantes exentos de certificación para Estados Unidos.....	18
Tabla 10. Acción de reactivos en los carotenoides enlazados a la quitina.	28
Tabla 11. Sistemas utilizados para la extracción de pigmentos.....	40
Tabla 12. Condiciones del proceso de desproteínización-desmineralización de los residuos de cangrejo azul.....	44
Tabla 13. Microorganismo iniciador en la fermentación.....	46
Tabla 14. Variables de respuesta en cada experimento.....	51
Tabla 15. Métodos estadísticos aplicados a los datos obtenidos experimentalmente.....	52
Tabla 16. Composición proximal de residuos secos, y resultados de otros autores.....	53
Tabla 17. Constantes dieléctricas de los disolventes aplicados.....	55
Tabla 18. Contenido de cenizas reportado por diferentes autores en cangrejo azul.....	62
Tabla 19. Xantofilas totales en cangrejo azul y camarón.....	65
Tabla 20. Valores medios obtenidos en la descalcificación-desmineralización de residuos de cangrejo azul a las 24 h de tratamiento.....	73

Resumen.

La captura de crustáceos en la República Mexicana ha aumentado a través de los años debido a la demanda de consumo nacional e internacional. El aprovechamiento de su pulpa ha generado grandes cantidades de desecho que generalmente no es utilizado y es eliminado al ambiente produciendo una fuente de contaminación. Este es el caso de los desechos de cangrejo azul, la proporción de desechos del organismo fluctúa entre 86-90% de su peso, compuesto de caparazón, piernas, abdomen y vísceras. Este desecho es rico en quitina, quitosano, sales, proteínas y pigmentos. Compuestos que pueden ser aprovechados en la industria. Particularmente, los pigmentos carotenoides son utilizados en áreas alimentarias y farmacéuticas entre otras, en especial los de origen natural van teniendo mayor demanda, específicamente en los mercados europeos ya que la legislación de estos países busca eliminar los pigmentos sintéticos por relacionarlos a problemas de salud. Los crustáceos, como el cangrejo azul, contienen pigmentos enlazados a proteínas que les confiere el color azul, una vez separado este complejo el pigmento cambia a rojizo-anaranjado, que se ha identificado como astaxantina. Este pigmento tiene un alto valor debido a su absorción en tejidos de peces que le confiere un color agradable. Muchos autores han extraído este y otros pigmentos a través de sistemas de disolventes y fermentación láctica que ayuda a estabilizar este complejo pigmento-proteína, particularmente en camarón (*Litopenaeus spp.*). En el presente trabajo, se extrajeron pigmentos carotenoides utilizando tres sistemas de disolventes y aceite de soya en desechos sólidos secos de cangrejo azul. Los sistemas de disolventes estuvieron constituidos de agua/cloroformo/metanol, éter de petróleo/ acetona/agua y etanol/agua. Adicionalmente, se estudió también el efecto de la fermentación láctica para estabilizar los pigmentos contenidos en los desechos sólidos de cangrejo azul. Para la extracción de pigmentos, los residuos sólidos fueron extraídos en condiciones de temperatura ambiente a 24 horas con agitación. Posteriormente fueron filtrados y evaporados a vacío. Los tiempos de muestreo fueron a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas analizándose los residuos sólidos y el filtrado obtenido. Las variables de respuesta para los residuos sólidos fueron: pH, proteína total, lípidos, cenizas y calcio; en el filtrado se le determinó: pH, proteína soluble, xantofilas totales color (Luminosidad, tonalidad y cromaticidad). En la fermentación láctica, los residuos sólidos de desechos de cangrejo fueron desmineralizados y desproteinizados usando el

método ácido-álcali utilizando NaOH 1N durante 24 horas y 4.5% de ácido acético. Posteriormente fueron inoculados con *Lactobacillus spp.* e incubados durante 48 horas. Las variables de respuestas para el residuo sólido y el filtrado obtenido en la fermentación fueron las mismas que en la extracción con sistemas de disolventes, diferenciándose únicamente el tiempo de muestreo: 0, 24, 36 y 48 horas. En los sistemas de disolventes, el filtrado obtenido con agua/cloroformo/metanol obtuvo el más alto contenido de xantofilas totales y color rojo amarillo, seguido del obtenido con éter de petróleo/acetona/agua, aceite de soya y etanol/agua. En todos los tratamientos, la proteína fue alterada por efecto de los solventes llevándose a cabo un efecto hipsocrómico o cambio de color a rojo. Los residuos sólidos presentaron descensos de proteína total, cenizas, calcio; el pH estuvo en intervalos alcalinos. A diferencias de los sistemas de disolventes, el filtrado obtenido por fermentación láctica no modificó o alteró la estructura de la fracción proteica y se mantuvo el color azul-morado estabilizando el complejo pigmento-proteína. La producción de acidez no fue suficiente para solubilizar el carbonato de calcio en el residuo sólido, limitando el descenso de pH en el filtrado hasta un máximo de 6.16. Sin embargo, la fermentación láctica conservó el pigmento al no permitir la degradación de la proteína y consecuentemente su oxidación. En conclusión, los sistemas de disolventes modifican la estructura de la proteína generando el cambio hipsocrómico en el pigmento. El sistema de disolventes agua/cloroformo/metanol fue el mejor sistema de disolventes para la extracción de pigmentos. Por el contrario, la fermentación láctica estabiliza al pigmento carotenoide.

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el aprovechamiento tecnológico en el sector alimentario ha generado bienestar a la población a través de nuevos y variados productos. Sin embargo, el proceso de captura e industrialización de alimentos de origen marítimo deja residuos o subproductos al medio ambiente, los cuales no son aprovechados en su totalidad. Uno de estos casos son los crustáceos como el camarón (*Litopenaeus spp.*) y el cangrejo azul o jaiba (*Canallectes sapidus*). En particular, el cangrejo azul es aprovechado en solo 14% de su peso total en forma de carne para la preparación de platillos gastronómicos o enlatados destinados a la exportación (<http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>; Horst, 1990), dejando sin uso el 86% de su peso en forma de caparazón, abdomen y patas que puede tener valor agregado. Estos desechos están compuesto principalmente de quitina, proteína, pigmentos y carbonato de calcio (Zakaria y col, 1998). Gilchrist y Lee (1972) han reportado que en la composición de desechos de cangrejo de arena (*Emerita analoga*) se encuentra quitina (>40%) y pigmentos, específicamente xantofilas (19%), cantaxantina (11%), equinenona (0.7%) y β -caroteno (0.8%). Por otra parte, está reportado el uso de desechos de cangrejos en la elaboración de compostas, ensilajes y alimentos balanceados (Cato, 1992; Cathart y col, 1984; Abazinge y col, 1993; Dean y col, 1992; Mayer y col, 1989). Este desecho también es utilizado en artesanías de ornato, en especial el caparazón (Anónimo, 1956).

En la República Mexicana, la captura de jaiba se encuentra en el décimo lugar de participación de la producción pesquera, siendo su importancia debida a la pulpa. El caparazón de cangrejo es utilizado en parte como alimento balanceado para ganado de engorda o desechado a zonas cercanas a la planta procesadora o al mar. Según Krantz (1983), muchos de los desechos flotan en el agua causando contaminación no solo superficial, sino también generando una alta demanda de oxígeno en el agua eliminando una parte de la flora y la fauna marina.

Para algunas especies de cangrejos como *Pleuroncodes planipes*, se ha reportado el uso de desechos a través de una extracción por solventes obteniendo carotenoides para dietas alimenticias en salmónidos (Spinelli y Mahnken, 1978). Otros autores reportan el

uso de desechos de camarón (Torrinsen y col, 1981) a través del ensilaje y han demostrado que la astaxantina es estable en condiciones semiácidas (pH=4.0), ya que los ácidos inorgánicos retrasan la conversión a monoéster. Armenta (2002a) indica que el uso de técnicas de extracción apoyadas por la fermentación láctica constituye una forma viable y económica para lograr la extracción del complejo proteína-quitina y la disolución de las sales de calcio en el camarón (*Litopenaeus. spp*).

Justificación

Muchos trabajos han sido llevados a cabo en los últimos 25 años con el fin de extraer pigmentos, en especial a partir de desechos de camarón y cangrejos. Sin embargo, no hay información sobre la extracción de pigmentos de cangrejo azul (*C. sapidus*), ya que este organismo es ampliamente comercializado en nuestro país y en el extranjero, como Estados Unidos y Japón, debido a su carne. Sin embargo, el alto porcentaje de desechos que ocasiona su procesamiento provoca problemas de contaminación en las zonas de captura. Los métodos de extracción reportados en la literatura indican la posibilidad de extraer pigmentos carotenoides, material de alto valor agregado. El uso de métodos de conservación no agresivos al medio ambiente como la fermentación láctica ayudan a evitar contaminación al estabilizar los residuos a la vez que evita la degradación de los pigmentos.

Hipótesis

Los pigmentos carotenoides presentes en los residuos de cangrejo azul pueden ser eficientemente extraídos por sistemas de solventes orgánicos, a partir de residuos no fermentados. Sin embargo, la fermentación láctica permite estabilizar a los residuos para la posterior extracción de los pigmentos.

Objetivo general.

Explorar la posibilidad y eficiencia de extracción de pigmentos carotenoides a partir de residuos de cangrejo azul (*C. sapidus*) fermentados y no fermentados.

Objetivos específicos:

1. Determinar la eficiencia de extracción de pigmentos carotenoides empleando sistemas de solventes orgánicos.
2. Comparar la eficiencia de extracción de pigmentos carotenoides a partir de residuos fermentados y no fermentados.
3. Determinar el efecto del tratamiento alcalí-ácido en la descalcificación de los residuos.

I.1 Antecedentes.

La captura de cangrejo azul en México en los cuatro principales Estados productores se muestra en la Tabla 1. Según cifras de la demanda en el mercado extranjero, las

presentaciones de pulpa enlatada y mudada o blanda van en aumento por lo que los países productores buscan llevar a cabo inversiones en este rubro (<http://www.oaxaca.gob.mx>). La pulpa es empacada, enlatada o congelada, o vendida en fresco, su mayor producción va a mercados internacionales, (<http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>), mientras que el caparazón es desechado. Este mercado, tan solo en Estados Unidos en 1995, representó 8840 TM de pulpa con un valor de 74.6 millones de dólares (Oesterling, 1998). Considerando que la pulpa comprende 14 a 20% del organismo, los desechos representaron alrededor de 7300 TM (caparazón, abdomen y patas). Químicamente, el desecho consiste de CaCO₃, quitina y pigmentos que pueden ser aprovechados.

Tabla 1. Captura del cangrejo azul en algunos de los Estados de la República Mexicana en 2000.

Estado	Producción de captura de cangrejo azul (TM)
Sinaloa	4157
Veracruz	3209
Campeche	2709
Tabasco	1208

Fuente: SAGARPA, 2000

No existen reportes sobre los pigmentos contenido en *C. sapidus*, pero sí en otras especies de cangrejos. Gilchrist y Lee (1972) reportaron el contenido de carotenoides en extractos de epidermis y caparazón en *E. analoga* (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia relativa de carotenoides en extractos de epidermis y caparazón en *E. analoga* (%*).

Muestra	Otros carotenoides	Equinenona	Cantaxantina	Xantofila	Astaxantina
Epidermis	4.5	1	5	24	64
Caparazón	0.8	0.7	11	19	69

* % en peso

Fuente: Gilchrist y Lee (1972)

Shahidi y Botta (1994) compararon el análisis básico del cangrejo con el del camarón, así como el contenido de carotenoides en los desechos de ambas especies (Tabla 3). En el cangrejo la cantidad de carotenoides varía según la región anatómica: la espaldilla contiene 139.90 ± 2.00 µg/g y las tenazas, piernas, hombros y extremidades 16.4 a 34.3 µg/g.

Tabla 3. Análisis químico y valores de tasa de eficiencia proteica (PER) de camarón y cangrejo.

Componentes	Camarón	Cangrejo
Humedad (%)	72.10 ± 0.20	42.50 ± 0.31
Proteína cruda (%)	44.12 ± 0.79	19.08 ± 0.21
Lípidos (% m.s. ^a)	8.39 ± 0.80	0.85 ± 0.06
Cenizas (% m.s.)	29.03 ± 0.43	30.68 ± 0.31
Quitina (%m.s. caparazones Desproteinizados)	40.40 ± 0.48	29.60 ± 39.10^b
Carotenoides (µg/g)	147.70 ± 2.50	139.90 ± 2.00
Valor PER ^c	2.79-2.88	2.30-2.42

^a Materia seca.

^b Dependiendo de la sección del cuerpo del cangrejo.

^c Tasa de eficiencia proteica.

Fuente: Shahidi y Botta, 1994.

Otwell y Koburger (1985) reportaron que los caparazones del *C. sapidus* contienen de 20-50% de quitina, el resto esta compuesto de proteína (10.91%) y carbonato de calcio (309.14 mg/100 g), más no reportan contenido de pigmento. En base a estos datos, se pone de manifiesto el posible potencial en la extracción de pigmentos a partir del caparazón del *C. sapidus*. Sin embargo, el contenido de calcio hace a este subproducto muy duro, requiriendo mayor energía para la molienda.

Uno de los pigmentos más apreciados en el mercado es la astaxantina debido a sus propiedades de coloración. Los carotenoides son utilizados en varios procesos relacionados con alimentos y productos farmacéuticos (Torrinsen y col, 1989; Badui, 1999; Shahidi y Synowiecki, 1991). Este pigmento es de importancia comercial ya que en la actualidad el único proveedor de pigmento sintético es Hoffman-La Roche,^{MR} que lo vende a un precio aproximado de 2,500 dólares el kilogramo (Mc Coy, 1999). Por otra parte la tendencia mundial es el uso de aditivos de origen natural (Badui, 1999), por

lo cual ha desplazado mucho a los pigmentos sintéticos y se requiere de fuentes alternativas para la demanda de mercado.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. Cangrejo azul *Canellectes sapidus*.

2.1.1. Características del Cangrejo Azul

El cangrejo azul (*C. sapidus*) o jaiba, es un crustáceo perteneciente al orden de los decápodos, familia que incluye a las langostas y los camarones. Su *Phylum* (Figura 1) es el de los artrópodos y están ampliamente distribuidos en el Atlántico desde Cabo Cod, E.U.A, hasta Brasil (Schultz, 1969; Williams, 1974). Su importancia recae en el comercio de la pulpa, que provee un canal importante de comercialización pesquera a través de la costa de Norteamérica e inclusive hasta Japón (Millikin y Williams, 1984; DuPaul, 1985).

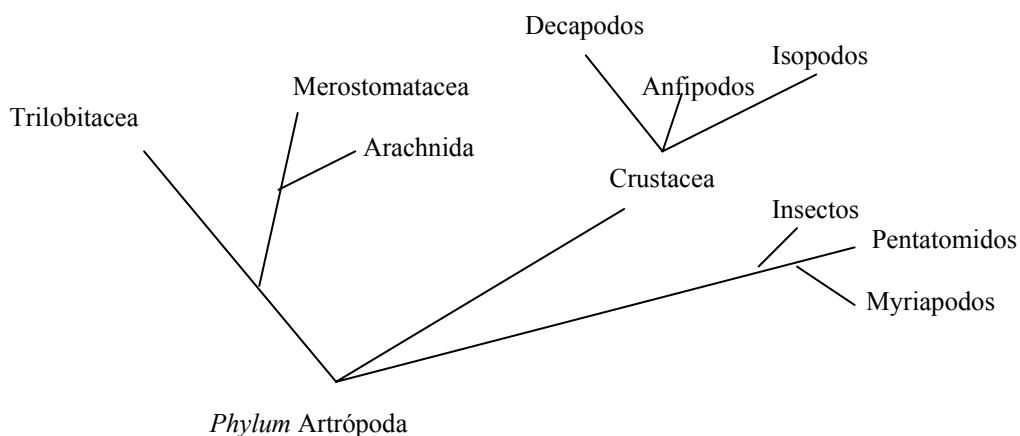


Figura 1 . Resumen sistematizado del *Phylum* Artrópoda.

Fuente: Meglitsch, 1985.

Los cangrejos macho se distinguen de las hembras por la forma de su abdomen. El macho tiene un abdomen en forma de T el cual se mantiene apretado al cuerpo hasta la madurez. La hembra inmadura tiene un abdomen en forma de triángulo sellado con el cuerpo. El abdomen de la hembra se vuelve redondo y puede ser fácilmente separado del cuerpo en la etapa de pelecheo, es decir durante los cambios del caparazón. Los cangrejos machos generalmente tienen tenazas y piernas brillantes, mientras que las hembras tienen tenazas de color naranja (Figura 2).



Extremidad notoria

Figura 2. Anatomía del cangrejo azul *C. sapidus*.

Fuente: <http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>; Barnes, 1980.

Los cangrejos machos son mayores que las hembras en su dimensión máxima, alcanzando de 177.8 a 203.2 mm (<http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>). Los cangrejos hembras producen hasta dos millones de huevos, pero solamente cerca de un millón sobrevivirá para llegar a la etapa adulta. Aparecen de Abril a Agosto o Septiembre, cuando los huevecillos se rompen y surgen las larvas. Durante el siguiente mes hay seis o más etapas larvales antes de alcanzar la etapa megalopal e iniciar la migración a aguas de estuarios ricas en nutrientes. Posteriormente, en las ciénegas saladas, el megalopal se transforma en cangrejo de primera etapa.

Durante la ecdisis deben de mudar el exoesqueleto duro para poder crecer, el primer cambio de concha se denomina apólisis, después de la cual el exoesqueleto formado tiene mayor dureza debido a que se inicia la calcificación en la epicutícula y la exocutícula vía los canales de poros. La calcificación detiene la expansión de la cutícula y permite la actividad muscular. Posteriormente, se forma la endocutícula.

La Tabla 4 muestra la composición de la cutícula del cangrejo azul. La exocutícula y la endocutícula están compuestas de capas de microfibrillas de quitina-proteína formadas

por monocapas paralelas a la superficie de la cutícula. En el interior de la exocutícula existen depósitos de melanina. La exocutícula y la endocutícula son estructuras muy resistentes debido a la alta calcificación dentro de la matriz de quitina-proteína (Warner, 1977).

Tabla 4. Composición de la cutícula del cangrejo azul *C. sapidus*.

Componentes*	Cutícula antes de mudar	12 Horas después de mudar
Hexosamina	72	30
Proteína	24	59
Azúcar	0.8	1.9
Ceniza	5	4

* % en peso

Fuente: Horst, 1990

Horst (1990) determinó la ruta de la síntesis de quitina de *C. sapidus in vivo* antes y después de mudar la cutícula, irradiando aminoácidos y descubriendo que dicha síntesis en crustáceos incluye un complejo de proteína-polisacárido en la superficie apical de las células epiteliales. Los aminoácidos predominantes son el ácido aspártico, alanina, treonina, ácido glutámico y arginina. La Tabla 5 muestra el contenido de aminoácidos en la cutícula del cangrejo azul.

Tabla 5. Contenido de aminoácidos en la cutícula del cangrejo azul.

Aminoácidos*	Antes de Mudar	15 horas después de mudar.
Aspartato	87	116
Glicina	118	122
Serina	14	21
Histidina	89	100
Arginina	156	132
Treonina	80	58
Alanina	102	91
Tirosina	50	34
Metionina	18	3
Valina	74	58
Fenilalanina	36	53
Isoleucina	29	23
Leucina	44	50
Lisina	31	51

* Moles/1 000 residuos

Fuente: Horst, 1990

2.1.2. Composición química.

Otwell y Koburger (1985) reportan el contenido de proteína, grasa y ceniza en dos tipos de cangrejos azules, uno de caparazón duro y el otro de caparazón suave (Tabla 6).

Tabla 6. Composición proximal (%) de cangrejos azules enteros.

	Cangrejo azul suave ¹	Cangrejo azul duro
Humedad	84.68 ± 0.25	80.3 (77.4 - 86.79)
Proteína	10.91 ± 0.53	15.9 (8.6 - 19.8)
Grasa	1.40 ± 0.06	1.3 (0.4 - 2.2.)
Cenizas	2.84 ± 0.10	1.9 (1.3 - 2.7)
Total	99.83	99.4

¹ Media y desviación estándar de 8 repeticiones

Fuente: Otwell y Koburger, 1985.

La pigmentación *in vivo* de *C. sapidus* está reportada por Brouwer y col. (1982); el principal pigmento es la hemocianina. Este es un complejo de proteína y cobre que se encuentra extracelularmente en el hemolinfa de artrópodos y moluscos.

Químicamente, la hemocianina es un oligómero ensamblado en unidades hexoméricas de 450,000 Da y funciona como transportador reversible de oxígeno (Herskovits y col, 1981). Gilchrist y Lee (1972) reportan los cambios de color en la sangre y huevos del cangrejo de arena (*Emerita analoga*) indicando que la mayor parte de los pigmentos del caparazón corresponde a hemocianina (69%), xantofila (19%), cantaxantina (11%) y en menor cantidad equinenona (0.7%) y β-caroteno (0.8%).

2.2. Producción de cangrejo azul en el mundo y México.

Según la FAO México se encuentra a nivel mundial en el décimo lugar de pesca y producción acuícola (SAGARPA, 2000; FAO, 2000). El manejo de los desechos de la industria pesquera, en especial de los crustáceos, ha sido documentado en Estados Unidos, donde se reporta que al menos en el Estado de Lousiana, las plantas procesadoras del langostino dejan más de 5000 TM de residuos cada año (Freeman y Perry, 1984). En México no se tienen estadísticas de desechos, sin embargo, en base a la producción de pulpa de jaiba exportada y en el rendimiento promedio de la misma

mencionada por Horst (1990), se puede estimar que se produjeron más de 8000 toneladas en el 2000 (Tabla 1).

Como se mencionó, la importancia de la captura del cangrejo azul (*C. sapidus*) reside en el mercado de su pulpa, la cual es apreciada en países como Estados Unidos y Japón (DuPaul, 1985). Esta es exportada en forma procesada bajo la norma del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Según SEMARNAP (1998), ese año se procesó en México cangrejo azul enlatado, deshidratado y congelado en cantidades de 3828, 2860 y 3851 TM, respectivamente. Otro factor de importancia en la producción de cangrejo azul constituye el incremento de captura desde 1987 hasta 2000 con una ligera disminución posterior (Figura 3).

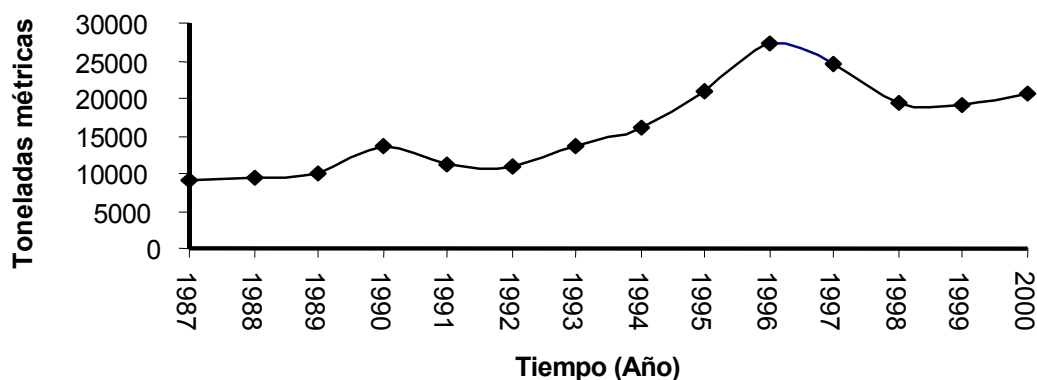


Figura 3. Producción de cangrejo azul (*C. Sapidus*) en la República Mexicana

Fuente: SAGARPA, 2000.

La pulpa constituye solamente el 14% de peso vivo del cangrejo azul, en promedio cada animal contiene cerca de 57 g de carne. Esta es una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales como fósforo, zinc, cobre, calcio y hierro (Tabla 6). Es baja en grasas saturadas, aunque es alta en colesterol. La Sociedad Americana del Corazón recomienda un consumo diario límite de 300 mg de carne (<http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>). La extracción por procesos de vapor permite únicamente obtener un 10% debido a que partes de la pulpa se sobrecalienta, por lo que es más común la extracción manual debido a que se obtiene entre 15 y 20% de carne (Gates y Parker, 1992).

2.3. Subproductos y su utilización.

Como se mencionó, el 86-90% del peso del cangrejo azul no es utilizado, ya que sólo se aprovecha 10-14% (<http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>;

Brown y Otwell, 1980). El subproducto es vendido a productores de alimentos balanceados para animales, fermentado a través de composta o ensilaje o simplemente eliminado al medio, representando una fuente de contaminación. A continuación se describen brevemente algunos usos de subproductos de cangrejo azul.

2.3.1 Composteo.

El composteo es una fermentación aeróbica de desechos vegetales y/o animales, el producto obtenido sirve como abono para las plantas. Cato (1992) menciona que es viable el composteo del cangrejo azul y otros desechos de procesadoras de productos marinos como método alternativo para las compostas de cosechas. Cathart y col (1984), determinaron el uso de este subproducto y la viabilidad económica de la mezcla de los desechos junto con polvo de aserrín en una fermentación de 21 a 35 días obteniendo productos sin aroma alguno, con 40% de humedad y pH 8.0. Rich y Hodge (1991) reportaron el uso de la composta de desechos del *C. sapidus* con la finalidad de suprimir al nemátodo *Meloidogyne javanica* en la producción de tomates.

2.3.2. Ensilaje.

El ensilaje es un método de conservación de productos alimenticios y agrícolas a través de la acción de un ácido, generalmente acético, láctico, fórmico o propiónico, aunque también se pueden usar ácidos minerales. La producción de ácidos orgánicos puede lograrse a través de acción microbiana. Abazinge y col. (1993) determinaron el uso de los desechos del *C. sapidus* ensilando junto con paja de trigo y utilizando diferentes aditivos. Adicionaron 10 a 20% de melaza seca a la mezcla de desecho de cangrejo-paja de trigo antes del ensilaje generando cantidades altas de ácido láctico comparados con un tratamiento en el cual sólo incluía la melaza. Evers y Carroll (1996) reportan el uso de desechos de cangrejo y de camarón en la elaboración de ensilajes para ganado vacuno usando diferentes proporciones de melaza y sal. Dentro de estos tratamientos, al combinar mayores concentraciones de sal disminuyó el porcentaje de proteína cruda, la concentración de amonio, de ácido láctico y de ácidos grasos volátiles, mientras que el incremento del pH mejoró la aceptabilidad de los aromas. En otro trabajo, Evers y Carroll (1998), reportaron el uso de desechos de camarón en ensilaje de residuos, melaza y NaCl. Reportaron que empleando un alto contenido de desechos de camarón y bajo contenido de melaza, no alcanzaron pH menor de 4.5 para limitar el crecimiento de

bacterias patógenas, debido al efecto bufer del carbonato de calcio presente. Sin embargo, sí se obtuvieron altos niveles de ácido láctico y bajos niveles de ácido butírico. Velez y col. (1991), reportaron el uso de desechos de cangrejo y de langostilla, así como soya, en la formulación de dietas peletizadas para ganado vacuno, comparando la degradación de estos a través de un estudio de digestión ruminal en vacunos. Es probable que debido al mayor contenido del exoesqueleto y el bajo contenido de vísceras en el cangrejo, resulta más difícil para el rumen poder degradar las dietas.

2.3.3. Producción de suplemento alimenticio para animales.

Dean y col (1992) reportaron el uso de derivados del cangrejo azul como ingredientes alimenticios en la preparación de alimentos balanceados para dietas de bagre. Compararon dietas a base de desechos de pescado con los desechos de cangrejo y determinaron las ganancias de peso y eficiencia alimenticia en los peces, no observando ninguna diferencia con el grupo control. Brown y Otwell (1980) mencionaron que 80% de desechos es reducido a 65% por secado a 10% de humedad para alimento balanceado para pollos.

2.3.4. Extracción de quitina.

La quitina en los crustáceos incluye el depósito de un complejo de proteína-polisacárido en la superficie apical de las células epiteliales secretadas en el exoesqueleto. Esta estructura es un polisacárido consistente de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -(1-4). El 40% del exoesqueleto del cangrejo azul (*C. sapidus*), corresponde a quitina (Horst, 1990). Con este dato se puede estimar que en la zona Sureste de México se desecharon 4172.4 TM de quitina durante el año de 1997 (Tabla 7).

Tabla 7. Producción de quitina no aprovechada a partir del *C. sapidus*.

Estado	Producción en 1997 ¹ TM	Producción de quitina ² TM
Veracruz	6420	2568
Tabasco	2414	965.6
Campeche	5461	2184.4

¹ Fuente: SAGARPA 2000.

² Datos obtenidos a partir de promedio de quitina en el *C. sapidus* (Horst, 1990)

La quitina y su derivado desacetilado, el quitosano (β -1,4'-N-acetil-D-glucosamina) tienen numerosas aplicaciones en cosméticos, fármacos y en la agricultura. En cosméticos, se usa como componente de cremas de manos y del cuerpo, así como en champú. En los fármacos se utiliza como inmovilizador de enzimas y de células, vehículo de fármacos, material para la producción de lentes de contacto, etc. En el área agrícola es un componente de los pesticidas para la eliminación de nemátodos. En la industria alimentaria se utiliza como clarificador de jugos; en tratamiento de aguas como intercambiador de aniones, y en la producción de empaques biodegradables (Mayer y col, 1989; Weiner, 1991; Georgiew Lalov y col, 2000).

Además de las funciones industriales que tiene el quitosano, también se ha encontrado propiedades antimicrobianas contra microorganismos como *Pseudomonas* al ser utilizado en la preservación de camarón (Simpson y col., 1997). Dentro del área médica, existen reportes que indican que el quitosano inhibe la digestión de grasas y de minerales como el calcio (Deuchi y col, 1995).

2.3.5. Obtención de proteína, lípidos y pigmentos.

Otra posibilidad de uso de los residuos de cangrejo azul es la obtención de varias fracciones. Según reportes de Manu-Tawaih y Haard (1987) se puede extraer la fracción carotenoprotéica de desechos de cangrejo de nieve (*Chionocetes opilio*) usando el método de extracción descrito por Simpson y Haard (1985) a través de hidrólisis con tripsina, obteniendo carotenos, lípidos y proteína.

2.4. Pigmentos.

Zollinger (1991) define a los pigmentos como un tipo de colorantes, separándolos de los tintes. Los pigmentos se caracterizan por ser prácticamente insolubles en el objeto al que se se le aplica y por unirse al sustrato por compuestos de adición (polímeros en pinturas, plástico o alimentos), mientras que los tintes son aplicados a varios sustratos (materiales textiles, piel, papel, cabello, etc.) a partir de un líquido en el cual son solubles. Los pigmentos naturales son sustancias colorantes o extractos naturales que proporcionan un color menos intenso que sus equivalentes sintéticos y son inestables cuando se exponen a la luz o al calor. Ante la presencia de oxígeno, los pigmentos son susceptibles a oxidarse debido a que contienen estructuralmente dobles enlaces

conjugados (Hugles, 1984). El pH alcalino produce isomerización trans-cis, así como también los solventes diclorometano, cloroformo, acetona, metanol y acetonitrilo (Hendry y Houghton, 1996; Yuan y Chen, 1999).

2.4.1. Pigmentos sintéticos y naturales.

Los pigmentos sintéticos son colorantes que no se generan por la naturaleza y son producidos por síntesis química. Los más conocidos comercialmente son cristalinos y contienen una alta pureza, son comercializados como suspensiones micronizadas de aceite y como formulaciones dispersables en agua (Hendry y Houghton, 1996). Los usos que se le dan a estos pigmentos sintéticos en alimentos dentro de la Norma Oficial Mexicana se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Especificaciones de los pigmentos sintéticos según la Norma Oficial Mexicana.

Nombre oficial	Clasificación	Color	Productos
Rojo No. 3 Eritrosina	Xantana	Rosa-azul	Salsas, bebidas carbonatadas, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Rojo No. 40	Monoazo	Rojo-amarillo	Gelatinas, Salsas, bebidas carbonatadas, bebidas secas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Amarillo No. 5 (tartrazina)	Pirazolona	Verde-amarillo	Gelatinas, bebidas secas, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Azul No. 1	Trifenilmetano	Verde-azul	Bebidas carbonatadas, bebidas secas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Azul No. 5 Verde No. 3	Indigo Trifenilmetano	Azul intenso Verde-azul	Confitería, gelatinas, emulsiones aceite/agua Gelatinas, bebidas secas, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Naranja B	Pirazolona	Rojo-amarillo	Helados

Fuente: <http://www.ssa.gob.mx/nom/038ssa13.html>

Entre los colorantes sintéticos destacan los compuestos azo y las antraquinonas como los de mayor venta. Los pigmentos azo son la clase química más grande e importante de los compuestos coloridos sintéticos, su versatilidad es tal que están disponibles en casi todos los colores, se caracterizan por poseer un grupo cromóforo $-N=N-$. Entre los

colores más importantes están los amarillos 5 y 6, los rojos 2, 4 y 40, y el naranja B (Francis, 1999).

La segunda clase más importante de compuestos sintéticos son las antraquinonas. Su característica principal es la de poseer uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, al menos con tres anillos condensados. Las antraquinonas se dividen en tres grupos:

1. Ácidos sulfonados solubles en agua como el verde 5.
2. Colorantes no sulfonados solubles en aceite que pueden ser convertidos al tipo ácido por sulfonación, como el verde 6.
3. Hidroxiantraquinonas con dos miembros en la lista certificada: violeta 2 y violeta 20, de aplicación externa.

Aunque estos tipos de pigmentos son más firmes en color, contienen mayor intervalo de tinte, menor costo, ausencia de aroma o sabor y una alta efectividad, muchos están relacionados con daños menores a la salud, como alergias, asma, rinitis e hiperactividad en niños (Castenmiller y West, 1997).

Los pigmentos naturales por el contrario, son generados por microorganismos, vegetales, animales o minerales. Sin embargo, la Secretaría de Salud (<http://www.ssa.gob.mx/nom/038ssa13.html>) reporta que aunque no requieren de certificación, deben cumplir especificaciones del orden químico y toxicológico:

- a) No deber tener más de 3 mg de arsénico/kg.
- b) No más de 10 mg de plomo/kg.
- c) Máximo de contenido de mercurio de 1mg/kg.
- d) En su desecación debe haber menos de 0.2 % de pérdidas.
- e) Sea determinable por espectrofotometría de absorción.
- f) Sea determinable por medio de cromatografía.

La Tabla 9 muestra los colorantes exentos de certificación para los Estados Unidos.

Tabla 9. Colorantes exentos de certificación para Estados Unidos.

Extracto de anato (Achiote)	Beta-caroteno
Betabel deshidratado	Harina de semilla de algodón parcialmente tostada
Azul ultramarino	Acido carmínico (Extracto de cochinilla)
	Glutamato de hierro
Cantaxantina	Extracto de cáscara de uva (enocianina)
Caramelo	Aceite de endospermo de maíz
Beta-apo-8-carotenol	Paprika
Oxido de hierro sintético	Oleorresina de paprika
Jugo de frutas	Riboflavina
Jugo de vegetales.	Azafrán
Harina de algas secas	Dióxido de titanio
<i>Tagetes erecta</i> (cempasúchil)	Oleorresina turmérica
Aceite de zanahoria	Turmérico

Fuente: Francis 1999.

2.4.2. Carotenos y xantofilas.

Los hidrocarburos carotenoides se llaman genéricamente carotenoides. La estructura química básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades isopreno, cuyo arreglo se hace inverso a partir del centro (Figura 4); pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos, lo cual hace que esta estructura sea la responsable del color.

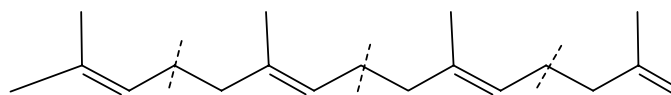


Figura 4. Cadena isoprenoide de carotenoides.

Fuente: Liaaen-Jensen y Storebakken, 1998.

Según Britton y col. (1998), los carotenoides pueden ser acíclicos, como el licopeno, aunque con más frecuencia contienen anillos terminales de 6 átomos de carbono, y en pocos casos de 5 átomos de carbono (Figura 5). Son solubles en éter de petróleo y poco solubles en etanol (Badui, 1999). Según el grado de sustitución, los carotenoides pueden

ser altamente insaturado ($C_{40}H_{56}$) y se caracterizan por no tener moléculas de oxígeno, ser de color de amarillo a naranja o rojo y solubles en éter. Estos incluyen a los α , β y ϵ -carotenos y al licopeno (Shaihidi y col, 1998; Badui, 1999; Wong, 1989).

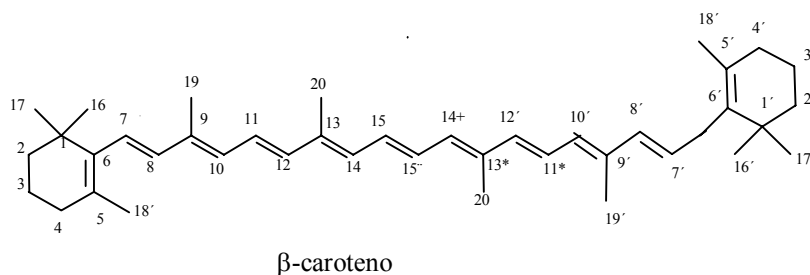


Figura 5. Estructura química de un carotenoide.

Fuente: Badui, 1999.

Muchos pigmentos carotenoides tienen la característica de estar enlazados a otros grupos macromoleculares, que les imparten mayor estabilidad. Estos grupos son las proteínas, lípidos y glucósidos. Al proporcionar calor a estos complejos, en especial si contienen proteínas, estos se desnaturalizan cambiando las propiedades espectrofotométricas y visuales del pigmento. Las xantofilas por el contrario, no presentan este cambio de color. Tanto los carotenoides como las xantofilas están unidos a otra molécula a través de enlaces ésteres (Fennema, 2001).

Los derivados que contienen funciones oxígeno (grupos hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o carboxilo) son llamados xantofilas (Britton y col., 1998) (Figura 6 a 9 y 11). Son la forma oxidada de los carotenoides, se presentan como ácidos, aldehídos, alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo (Badui, 1999). En estado natural, sus insaturaciones están en configuración trans, aunque en algunos casos se presentan isomerizaciones cis (Badui, 1999). Los isómeros cis se encuentran en la naturaleza en cantidades pequeñas (Hendry y Houghton, 1996). Una excepción es el caso del alga *Dunaliella* que produce cantidades considerables de 9-cis- β -caroteno (den Berg y col, 2000).

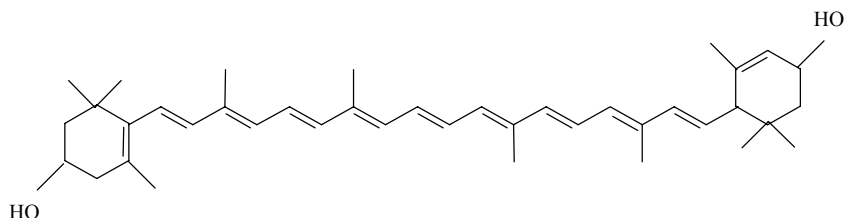


Figura 6. Estructura de una xantofila.

Fuente: Wong, 1989.

A partir de esta clasificación, Ikan (1991) hace una subclasificación de las xantofilas:

1. Carotenoides hidroxilados. Pueden existir en forma libre o esterificada como la criptoxantina, luteína y zeaxantina.
2. Carotenoides metoxilados. Son licopenos derivados sustituidos en la posición 1, entre estos se encuentra la rhodovibrina.
3. Oxicarotenoides. Tales como la capsantina y la rhodoxantina.
4. Epoxicarotenoides. Existen en forma natural como 5, 6- y 5, 8-epóxidos, tales como la violaxantina, flavoxantina, y luteocromo.
5. Carboxicarotenoides. Tales como la bixina y la crocetina.

Una de las características más importantes de los carotenoides es su papel protector contra daños por luz excesiva, además de participar en las reacciones químicas de óxido- reducción de la energía solar. Otra cualidad importante es su capacidad antioxidante en todo organismo no fotosintético, aunado a que algunos carotenoides son agentes anticancerígenos. La astaxantina, cantaxantina y β -caroteno pueden reducir la cantidad de células cancerígenas (Chew-Boon y col, 1999; Castenmiller y West, 1997). Kritchevsky (1999), reportó el posible efecto del β -caroteno en la disminución de las enfermedades coronarias. También funcionan como antioxidantes inhibiendo daños oxidativos de radicales libres en los tejidos, los cuales han sido relacionados con enfermedades crónicas incluyendo cáncer, cataratas y desordenes neurológicos (Diplock, 1992).

2.4.2.1. Fuentes

Badui, (1999) reporta la identificación de más de 420 tipos de carotenoides en la naturaleza cuyo color varía de amarillo, a anaranjado y rojo. Aunque otros autores

reportan más de 600 diferentes carotenoides en fuentes naturales principalmente de plantas y organismos menores con una producción de 1000, 000, 000 toneladas anuales (Ausich, 1997; Castenmiller y Clive, 1997; Akon y Min, 1998; Francis, 1999). Una gran proporción de estos pigmentos se encuentran en hojas verdes, vegetales, granos y cereales, además de que algunos microorganismos tienen la capacidad de generarlos (Badui, 1999). En la naturaleza la producción total de carotenoides o pigmentos se ha estimado en 100 millones de toneladas por año, esto significa una amplia fuente de obtención en residuos de organismos de fauna y flora (Zollinger, 1991; Fennema, 2001). En el mundo acuático existen muchos organismos que contienen pigmentos carotenoides y xantofilas. En los crustáceos se ha reportado la existencia de astaxantina, cantaxantina, zeaxantina y β -caroteno entre otros carotenoides (Gilchrist y Lee 1972; Armenta 2002a).

2.4.2.2. Carotenoides de origen acuático

La astaxantina es el pigmento más abundante en la mayoría de los crustáceos, se presentan en formas esterificadas y como complejos proteínicos (Katsuyama y col., 1987). El origen de la fuente de pigmentos en camarón de agua fría son principalmente bacterianos, según reporta Négre-Sadargues y col. (2000). Hinostroza y col. (1997), mencionan que los crustáceos son ricos en astaxantina, pudiendo utilizar sus desechos en forma íntegra en la elaboración de dietas alimenticias para los salmónidos. Sin embargo, el alto contenido de quitina y sales minerales los limita a tener una buena digestibilidad. Al extraer los pigmentos de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para elaborar dietas, estos autores encontraron que la mayor concentración de pigmentos correspondía a la astaxantina en su forma esterificada (145 mg/kg en peso húmedo). Saito y Regier (1971) reportan que los tejidos musculares de las truchas alimentadas con dos diferentes dietas que contenían 20% de desechos de camarón y en 20% de desecho de cangrejo, respectivamente, contenían principalmente astaxantina y una mezcla de luteína-astaceno. En crustáceos como el camarón (*Litopenaeus japonicus*) se ha determinado el contenido de pigmento dentro del caparazón, encontrándose 52.7% de astaxantina, 25.5% de foenicoxantina (25.5%), 4.9% de β -caroteno, 2.4% de tetrahidrohipirardixantina, 1.8% de tetradihidroxantina, 1.4% de equinona, trazas de cantaxantina, dihidroastaxantina, trihidrato piradixantina y 10% de pigmentos no identificados (Muriana y col., 1993). A continuación se describen los carotenoides más abundantes en el medio acuático.

Astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β β -caroteno-4, 4'-diona).

En la naturaleza, la astaxantina se encuentra en forma de ésteres de ácidos grasos, donde ambos grupos hidroxilo están esterificados (Figura 7). Este es el caso en el que se encuentra en los crustáceos (Liaaen-Jensen y Storebakken, 1988).

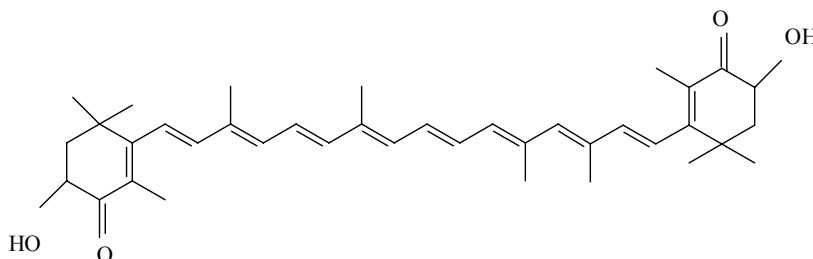


Figura 7. Estructura química de la astaxantina.

Fuente: Careri y col., 1999.

La astaxantina es un carotenoide bicíclico de color naranja-rojizo que comprende una carotenoproteína con peso molecular de cerca de 265,000 Da (Armenta, 2002b). La astaxantina existe como tres isómeros: (3R, 3'R), (3R, 3'S) y (3S, 3'S). Químicamente, la astaxantina es el cromóforo más abundante en los crustáceos, conjugada con proteínas esterificadas en uno o ambos anillos ciclohexénicos terminales (Britton y col., 1998).

En el caso de los crustáceos la proteína es llamada crustacianina, formando un complejo azul-gris como en el caparazón de la langosta *Homarus vulgaris* (Britton, 1997).

La oxidación de este carotenoide se lleva a cabo por medio del oxígeno el cual causa el rompimiento de los dobles enlaces de la cadena poliénica y en consecuencia la pérdida de color (Liaaen-Jensen y Storebakken, 1988). La empresa Hoffman-La Roche (Suiza) produce una astaxantina sintética denominada Carophyl pink^{MR} que consiste en una mezcla racémica de tres estereoisómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S meso) y (3R, 3'R) en una relación de 1:2:1 (Liaaen-Jensen y Storebakken, 1988).

Equinenona (β , β -caroteno-4-diona)

Es un cetocarotenoide con un grupo carbonil conjugado, generando un pico amplio no simétrico a 458 nm y un hombro a 482 nm en solución en éter de petróleo. Tiene un peso molecular de 558,087 Da. La equinenona tiene 54% de actividad como vitamina A

en comparación con otros carotenoides. Reacciona con benceno más metanol formando cristales de color rojo-naranja. Es soluble en disulfuro de carbono, cloroformo y benceno. La reducción con hidruro de boro sódico genera la monohidroxicriptina, que produce un espectro de 3 picos (Rodríguez-Amaya, 1999). Es ligeramente soluble en piridina y éter de petróleo e insoluble en metanol (Merck, 1980). La característica principal de este pigmento es que contiene 9 grupos metilos y un átomo de oxígeno (Figura 8).

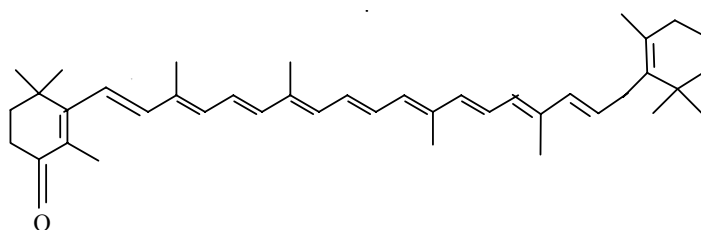


Figura 8. Estructura química de la equinenona.

Fuente: den Berg y col., 2000.

Cantaxantina (β , β -caroteno-4, 4'-diona).

La cantaxantina está formada por ocho unidades de isoprenos invertidos en el centro de la molécula y dos anillos con sustituyentes oxígeno (Figura 9). Contiene dos grupos carbonilos y tiene un espectro máximo a 466 nm con un pico amplio en solución en éter de petróleo, produciendo color rojo. Se genera un dihidroxicarotenoide, la isozexantina, por reducción con hidruro de boro sódico desplegando el pico de absorción espectral en tres (Rodríguez-Amaya, 1999). Es soluble en cloroformo y en aceites (Merck, 1980).

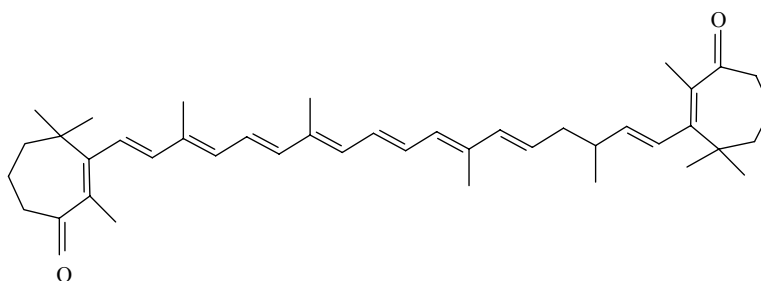


Figura 9. Estructura química de la cantaxantina.

Fuente: Careri y col., 1999.

Zeaxantina (β, β , caroteno-3, 3' -diol).

La zeaxantina, según Britton y col. (1998), se puede obtener químicamente por isomerización de la luteína. Contiene en su estructura dos grupos hidroxilos en sus extremos (Figura 10). No contiene actividad provitamínica y es prácticamente insoluble en agua y soluble en éter de petróleo, metanol, disulfuro de carbono, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y etilacetato. También es soluble en ácido acético glacial. Sus bandas de absorción máxima están a 483 y 451 nm (Merck, 1980).

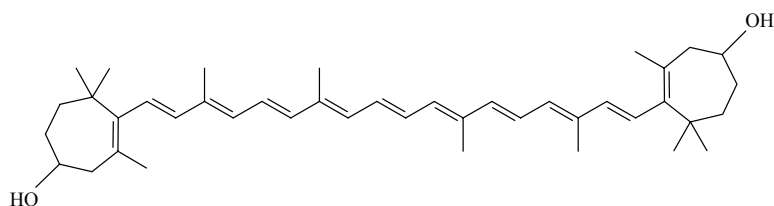


Figura 10. Estructura química de la zeaxantina.

Fuente: Careri y col., 1999.

β -caroteno (β, β , caroteno).

El pigmento β -caroteno contiene una estructura β -ionona en cada extremo de la molécula, enlazada por un sistema de dobles enlaces conjugados (Francis, 1999) (Figura 11). Este carotenoide es soluble en éter de petróleo con una absorbancia máxima de 425, 450 y 475 nm y en cloroformo a 497 y 466 nm (Rodríguez-Amaya, 1999; Merck, 1980). El β -caroteno es una potente provitamina A con 100% de actividad ya que estructuralmente se forman dos vitaminas A (Rodríguez-Amaya, 1999).

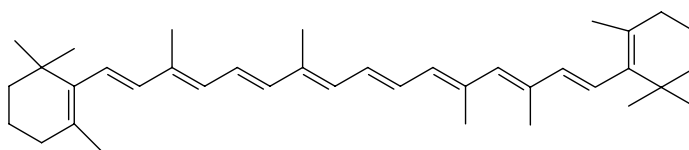


Figura 11. Estructura química de la β -caroteno.

Fuente: Careri y col., 1999.

Astaceno (β, β , caroteno-3, 3', 4, 4'-tetrona).

El astaceno es un pigmento carotenoide rojo-café que resulta de la oxidación de la astaxantina. Estructuralmente se diferencia de la astaxantina por tener dos dobles enlaces en los carbonos 4, 5 y 4', 5' de los anillos β -ionona y contener más grupos éster y ningún grupo hidroxilo (Figura 12). Se ha aislado de caparazón de crustáceos, algas,

esponjas, pescado y reptiles. Prácticamente es insoluble en agua pero es soluble en cloroformo, piridina, dioxano, disulfuro de carbono y soluciones de álcali. Es ligeramente soluble en benceno, etilacetato, ácido acético glacial y poco soluble en éter de petróleo y metanol (Merck, 1980).

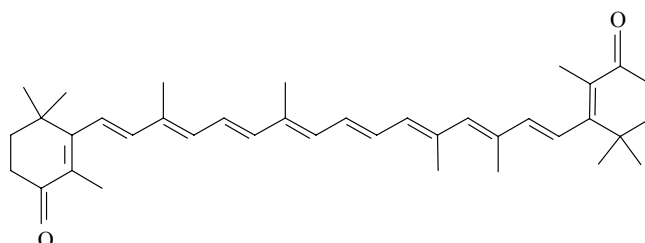


Figura 12. Estructura química del astaceno.

Fuente: Britton y col, 1998

2.4.3. Extracción de pigmentos

2.4.3.1 Extracción por disolventes y aceites.

La extracción de pigmentos de crustáceos se puede llevar a cabo a través de disolventes (Muzarelli, 1977) o fermentación láctica, la cual a la vez imparte estabilidad al pigmento (Armenta, 1998). El uso de disolventes proporciona la separación de los pigmentos debido a un efecto de disolución (Rodríguez-Amaya, 1999). De este modo, los sistemas de disolventes tales como el metanol, agua y éter de petróleo separan los carotenoides en hidrocarburos, monoles, dioles, dioles epóxido, cetodioles y polioles. Los complejos de proteína y carotenoides deben ser extraídos con alcohol debido a su baja solubilidad en los disolventes anteriores. Después de la extracción y purificación preliminar por lavado, la mezcla puede ser analizada por cromatografía en columnas de óxido de magnesio y filtrado con alúmina, almidón, azúcar, etc. Si la mezcla del pigmento es compleja, esta puede ser fraccionada en grupos de acuerdo a su polaridad por separación líquido-líquido. Finalmente, la identificación se basa en valores de R_f , localización en cromatografía y datos espectrales en intervalos ultravioleta, visible e infrarrojo (Fennema, 2001).

En el proceso de extracción, los pigmentos deben ser protegidos por medio de la adición de antioxidantes, como BHA, BHT, palmitato ascórbico o α -tocoferol los cuales proveen estabilidad al producto (Wong, 1989).

Otros procesos de extracción incluyen el uso de aceites de soya, algodón, pescado, etc. La extracción de la astaxantina con aceite contribuye al incremento de la estabilidad del pigmento, debido a que este es una buena barrera al oxígeno, previniendo la oxidación. Chen y Meyers (1982), además de identificar los pigmentos separados con aceite compararon la eficiencia de dos tipos de antioxidantes en la solución obtenida de carotenoide-aceite de soya: Etoxiquin^{MR} y Endox^{MR}. Los resultados con Endox^{MR} fueron mejores, ya que este producto es una combinación de BHA (antioxidante), monol y diglicéridos (emulsificantes), ácido fosfórico (sinergista) y ácido fosfórico dietil disódico (secuestrador de metales); el antioxidante Etoxiquin^{MR} fue 11.4% menos efectivo.

Simpson (1978) llevó a cabo una separación de proteínas de desechos de procesamiento de camarón y de cangrejo como componente alimenticio para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y caracterizó el contenido de carotenoides. El autor empleó ácido acético como agente coagulante que permitió mantener la astaxantina sin deterioro hasta su uso, ya que a pH alto se oxida a astaceno. Los pigmentos identificados fueron astaxantina (7.18 $\mu\text{g/g}$), astaceno (55.4 $\mu\text{g/g}$), éster de astaxantina (66.1 $\mu\text{g/g}$), zeaxantina (trazas), luteína (trazas), 4-ceto-4'-hidroxi- β -caroteno (0.74 $\mu\text{g/g}$) y equinenona (0.25 $\mu\text{g/g}$). Este método se resume en la Figura 13.

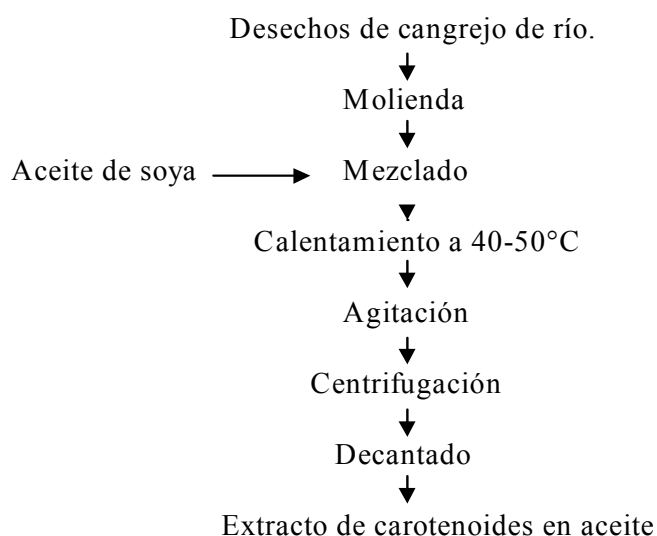


Figura 13. Diagrama de flujo de obtención del complejo de proteína-pigmento en desechos de camarón y cangrejo según Simpson (1978).

Muzarelli (1977) menciona que se puede recuperar pigmento a partir de material quitinoso de crustáceos utilizando solventes y/o desnaturalizantes de proteínas solamente si las conchas han sido descalcificadas. El ácido cítrico acuoso, las sales de ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y el ácido clorhídrico disuelven el carbonato de calcio pero dejan todos los pigmentos firmemente asociados con la quitina. Los pigmentos en el caparazón descalcificado se extraen con acetona o etanol y con ácido acético tibio. Otra forma de extraer los carotenoides es tratando el caparazón con ácido fórmico frío, seguido de la adición sulfato de amonio y ácido sulfúrico (Muzarelli, 1977). La Tabla 10 resume el uso de algunos reactivos empleados en la extracción de pigmentos.

Tabla 10. Acción de reactivos en los carotenoides enlazados a la quitina.

Reactivo	Quitina	Pigmento
NaOH acuoso	Ninguna	Ninguna
Ácido clorhídrico diluido	Disuelve el carbonato	Ninguna
Ácido clorhídrico concentrado caliente	Disuelve el carbonato y quitina	Libera como solución rojiza.
Ácido nítrico concentrado caliente	Disuelve	Destruye
Ácido sulfúrico con sulfato de amonio	Ninguno	Libera
Piridina caliente	Ninguna	Blanquea y disuelve.
Etanol o acetona tibia	Ninguna	Disuelve si esta descalcificado.
Borohiduro de potasio	Ninguna	Ninguna.

Fuente: Muzarelli, 1977

Shahidi y Synowiecki (1991) extrajeron quitina y pigmentos, principalmente astaxantina y sus ésteres, a partir del camarón (*Pandalus borealis*) y del cangrejo de nieve (*Chionoecetes opilio*) calentando a 60°C, usando aceite de bacalao y desmineralizando los caparazones de ambos crustáceos. El procedimiento utilizado se resume en la Figura 14.

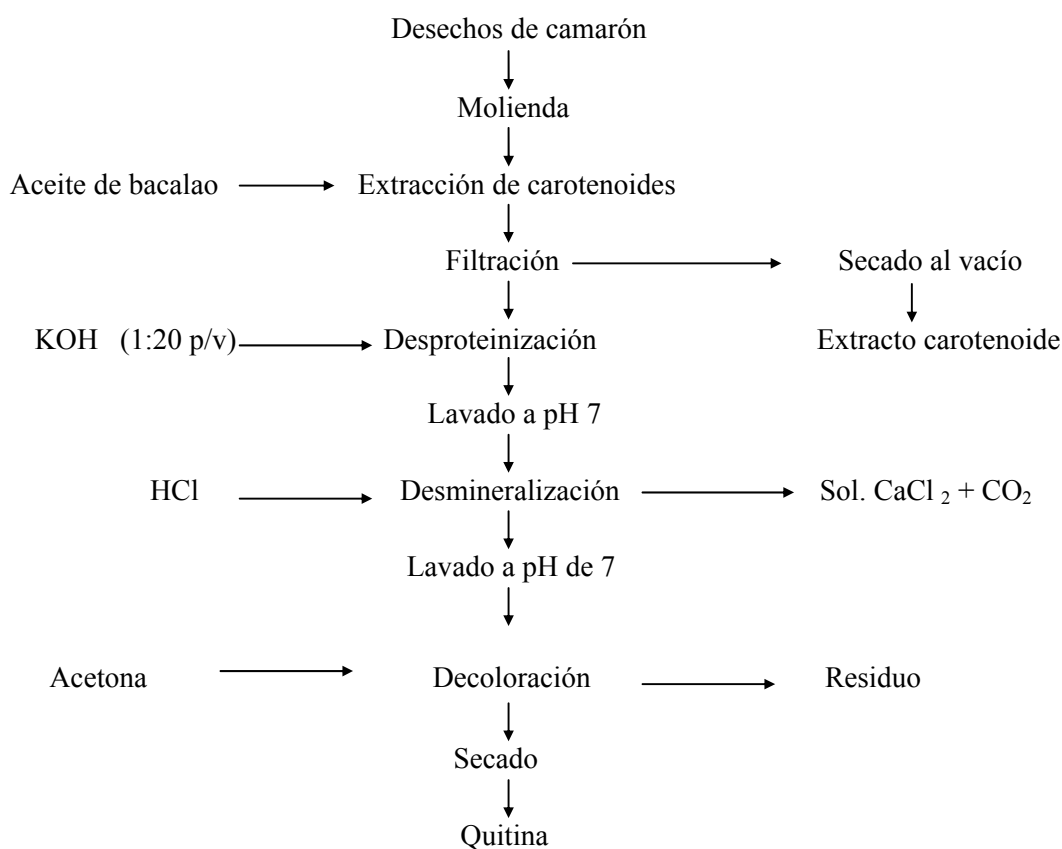


Figura 14. Diagrama de flujo de obtención de pigmentos y quitina a partir de desechos de crustáceos según Shahidi y Synowiecki (1991).

Gilchrist y Lee (1972) utilizaron un sistema múltiple de extracción e identificación de pigmentos en cangrejo de arena (*E. analoga*) manejando tres tipos de disolventes, acetona, dietil éter y éter de petróleo, y descalcificando con hidróxido de potasio metanólico, identificando pigmentos carotenoides en el tejido y el caparazón. Estos pigmentos fueron β -caroteno, astaxantina, zeaxantina y cantaxantina. El proceso empleado por este autor se describe en la Figura 15.

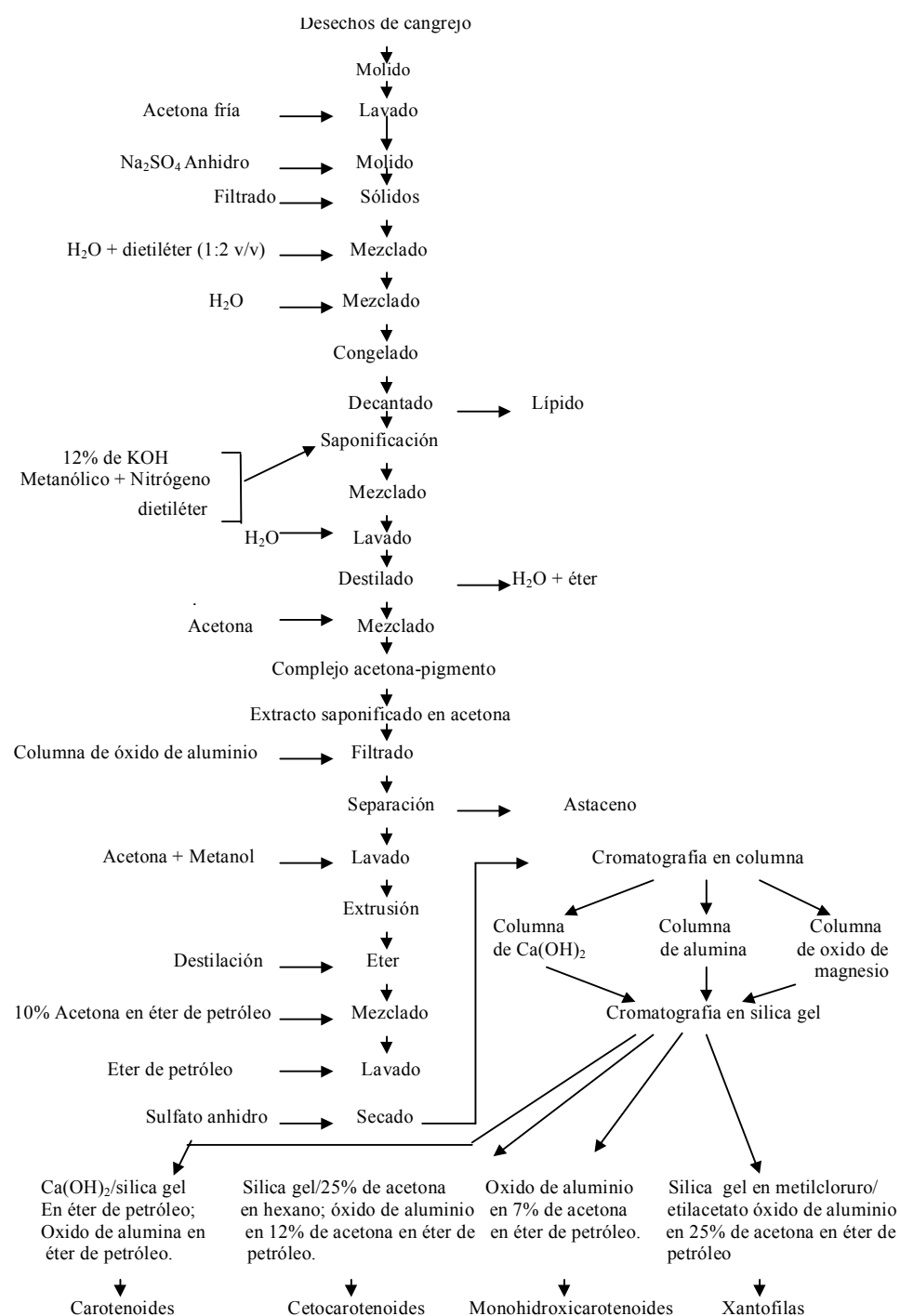


Figura 15. Diagrama de flujo de la obtención y caracterización de los pigmentos obtenidos del cangrejo de arena (*E. analoga*) según Gilchrist y Lee (1972).

Meyers y Bligh (1981) caracterizaron las astaxantinas en los desechos del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) obteniendo concentraciones de 153 $\mu\text{g/g}$ de pigmentos totales identificandos como ésteres de astaxantina, astaxantina y astaceno en 49.4, 40.3 y

10.3% respectivamente, utilizando previamente un método de descalcificación con ácido acético y extracción por el sistema éter de petróleo/acetona/agua (15:75:10 v/v/v) (Figura 16).

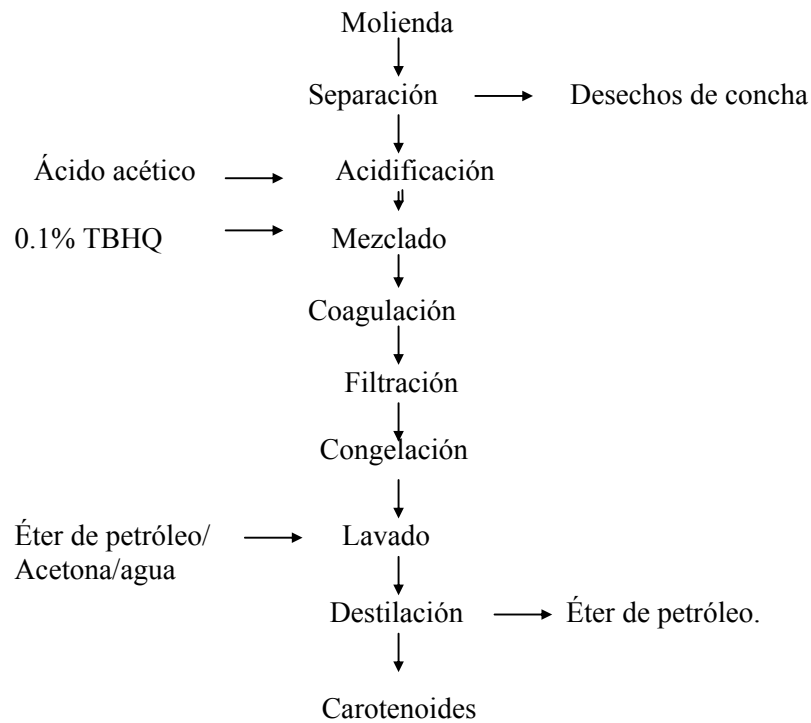


Figura 16. Diagrama de flujo de la obtención de carotenoides a partir de desechos del cangrejo de río según Meyers y Bligh (1981).

Gildberg y Stenberg (2001), reportaron un método de extracción integral de desechos de camarón utilizando una proteasa. Este método permite extraer quitina, pigmentos y proteína hidrolizada más eficientemente que los métodos tradicionales en cuanto a la proporción de proteína recuperada y quitosano de alta calidad (Figura 17). Con este método se obtiene además un hidrolizado proteico.

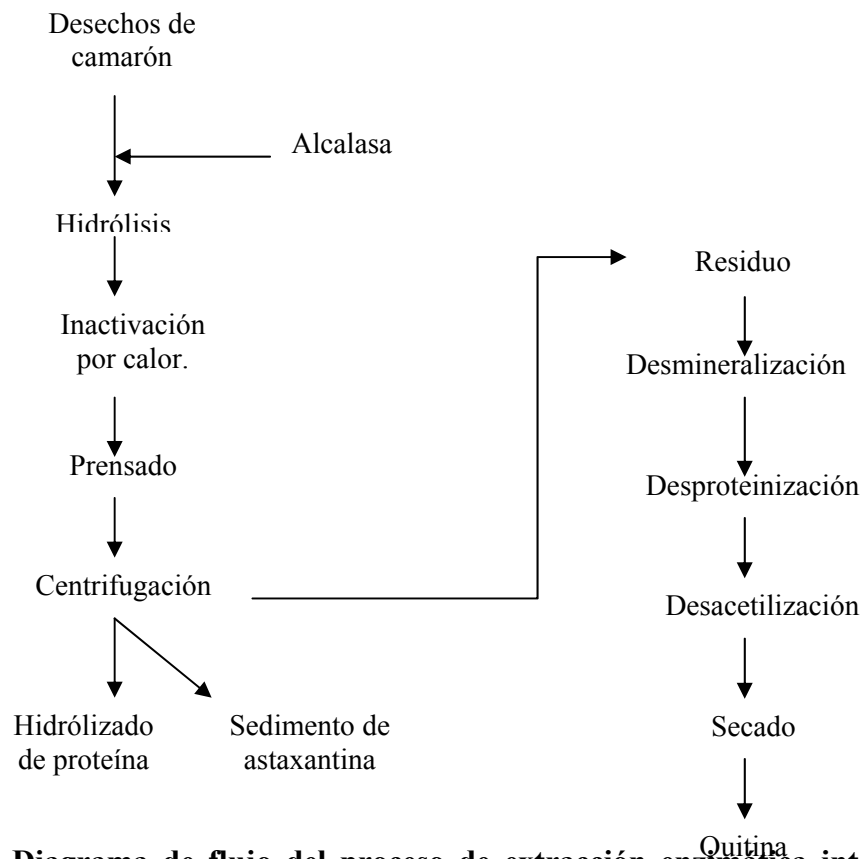


Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de extracción enzimática integral de quitina, astaxantina e hidrolizado de proteína según Gildberg y Stenberg (2001).

2.4.3.2. Extracción en residuos fermentados.

El método por fermentación láctica no únicamente ha sido utilizado en pigmentos, también se ha aplicado en la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón (Zakaria y col, 1998) o de langostilla (Bautista y col, 2001), y en conjunción con tratamientos enzimáticos para desproteínizarlo (Yang y col, 2000). En este proceso, la finalidad es estabilizar la estructura de la astaxantina para posterior extracción. Esta estabilización se debe a que la acidificación por medio de bacterias acidolácticas promueve condiciones reductoras que evitan la transformación del pigmento a la forma oxidada; a la vez, el carbonato y bicarbonato de calcio se solubilizan parcialmente, y se lleva a cabo una desproteínización parcial (Torrinsen y col, 1981; Chen y Meyers, 1983).

Torrinsen y col. (1981), demostraron que la astaxantina en desechos de camarón (*P. borealis*) es estable en ensilaje ácido a pH 4.0. La velocidad de conversión de astaxantina de su forma diéster a monoéster disminuyó durante 21 días, por lo que al

final del ensilado se encontró mayor contenido de diéster de astaxantina (64%), en comparación a monoéster (28%) y astaxantina libre (8%). Estos autores emplearon concentraciones altas de ácido necesario para estabilizar el ensilaje debido al alto contenido de minerales en el exoesqueleto del camarón. El volumen de sólidos de los desechos se redujo después del ensilado debido a que las sales del exoesqueleto fueron disueltas y el pigmento se mantuvo en la fracción sólida.

Hall y De Silva (1991) utilizaron la fermentación láctica en desechos de camarón (*Litopenaeus monodon*) para extraer quitina y proteína, incluyéndose en esta fracción la astaxantina. La cepa iniciadora fue un cultivo mixto de *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*. Las fuentes de carbono para el crecimiento del cultivo mixto fueron lactosa o yuca. Armenta (2002a), utilizó la fermentación láctica previo a la extracción de astaxantina utilizando tres iniciadores lácticos, obteniendo una mayor y más rápida disminución del pH usando una cepa de *Lactobacillus sp.*, alcanzando un pH final de 4.21 después de 48 horas de fermentación, encontró mayor eficiencia de extracción al usar éter de petróleo/acetona/agua (15:75:10) debido a la naturaleza no polar del sistema de disolventes, similar a la astaxantina.

2.5. Color.

2.5.1. Definición de color.

El color es el resultado de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos, por los cuales se capta la radiación por el ser humano en una longitud de onda entre 400 y 700 nm (Figura 18), en este intervalo se inicia una reacción fotoquímica. Posteriormente, hay una transferencia de información entre el ojo y el cerebro resultando en la percepción visual (Zollinger, 1991). Los tonos de los colores se deben principalmente al grado de absorbancia o reflectancia que tiene la luz visible sobre un sólido. Si la luz visible se refleja completamente en el sólido en una forma difusa y con completa reflectancia, el ojo humano percibe el color blanco. En caso de que el sólido absorba toda la luz, percibe el color negro. Si se absorbe una fracción constante de luz en el intervalo visible, aparece el color gris. Estos colores se denominan colores acromáticos y se caracterizan por estar en el intervalo de 400-700 nm (Hendry y Houghton, 1996) (Figura 18).

Los colores cromáticos muestran más de una banda en el espectro visible, específicamente en el intervalo de 400-700 nm donde absorben la luz que incide. Cuando la luz se refleja por varios cromóforos en el sólido y la suma de los tonos iguala las intensidades relativas del espectro visible de la luz solar, se obtiene una impresión de luz incolora la cual se le denomina mezcla aditiva de colores (Zollinger, 1991).

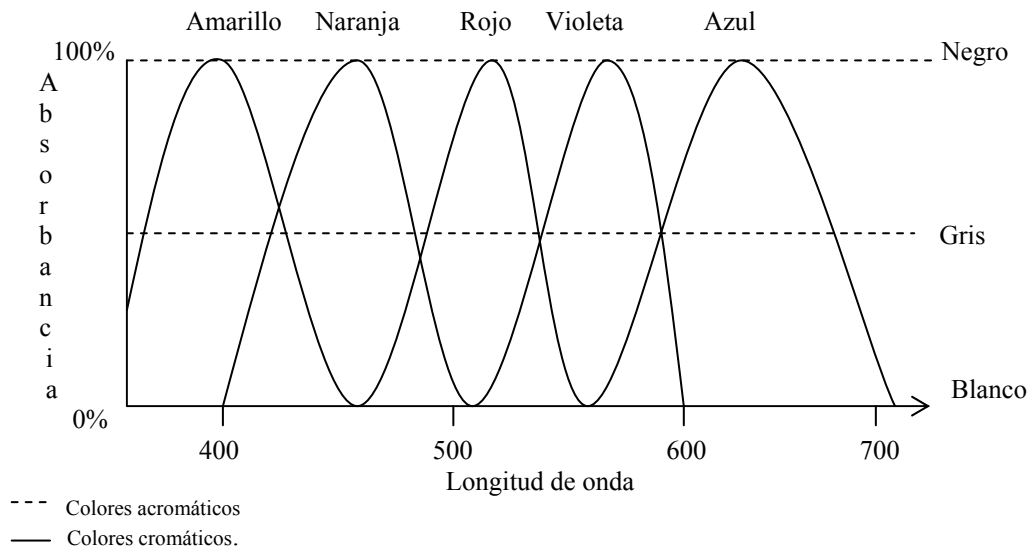


Figura 18. Representación esquemática de la absorción de luz de sólidos coloridos.

Fuente: Zollinger, 1991.

Hendry y Houghton (1996) menciona seis matices que puede percibir el ojo humano:

Rojo a una longitud de onda alrededor de 700 nm.

Naranja a 625 nm.

Amarillo cercano a 600 nm.

Verde a 525 nm.

Azul alrededor de 450 nm.

Violeta debajo de 400 nm.

Los pigmentos pueden sufrir cambios de coloración a través de movimientos de posiciones e intensidades de las bandas de absorbancia. Estos cambios en la absorbancia, de longitud de onda de mayor a menor, recibe el nombre efecto batocrómico e hipsocrómico. Al incrementar la magnitud del coeficiente de extinción (absorción) se produce un cambio conocido como efecto hipercrómico, mientras que al disminuir dicho coeficiente, desciende la magnitud de la longitud de onda denominándose efecto hipocrómico (Zollinger, 1991) (Figura 19).

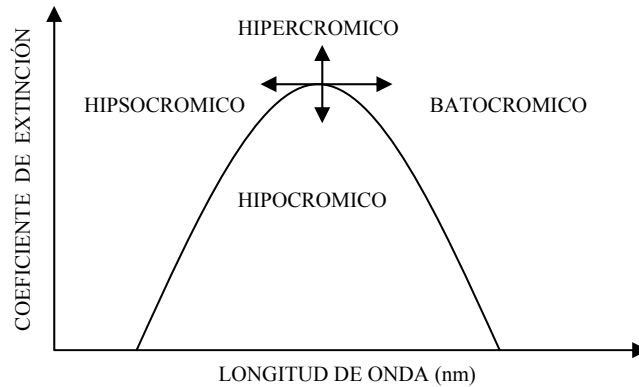


Figura 19. Efecto de cambios de color en pigmentos.

Fuente: Zollinger, 1991

Hendry y Houghton (1996) mencionan la causa de los cambios batocrómicos por las modificaciones estructurales en las moléculas:

1. Incremento en la longitud de la cadena
2. Ramificación de la cadena
3. Arreglo en una estructura de anillo individual (ciclización)
4. Adición de moléculas de nitrógeno u oxígeno
5. Enlace de dos o más anillos
6. Adición de ciertos metales de transición

En los pigmentos carotenoides, el color está en función del número de enlaces dobles conjugados en la molécula. El anillo en la estructura de algunos carotenoides influye en el color, lo que no ocurre en la estructura abierta del licopeno. De esta forma, el color que refleja el licopeno es rojo, mientras que el β -caroteno es naranja (Francis, 1999). Si ocurre la oxidación de los pigmentos carotenoides, si se genera un arreglo estructural de forma trans a cis, o si se lleva a cabo la ciclización en la cadena isoprenoide en uno de sus dobles enlaces se producen cambios en el color (Hendry y Houghton, 1996).

2.5.2. Medición de color

El color es fundamental para que el ojo humano detecte y seleccione un determinado objeto. Zollinger (1991) menciona tres formas fundamentales en el que el color puede ser descrito cuantitativamente: espectrofotométricamente, colorimétricamente y sensorialmente. El último en particular es un método subjetivo debido a que existe gran variación por ser dependiente de tres parámetros fisiológicos (brillo, matiz, y saturación).

La importancia del color, específicamente en los alimentos es la predeterminación de las expectativas del observador en sabor y aroma, debido a que se hace un juicio en base al color del alimento (Hendry y Houghton, 1996). Los niveles de color afectan los niveles aparentes de dulzura y en consecuencia se estima el valor estético del alimento. Por ello, los colores pueden ser añadidos a los alimentos por varias razones:

Para reforzar los colores ya presentes en los alimentos pero en menor intensidad de lo que espera el consumidor.

Para asegurar la uniformidad del color en los alimentos de lote a lote.

Para preservar la apariencia original del alimento cuyo color ha sido afectado por el procesamiento.

Para dar color a ciertos alimentos tales como la confitería y bebidas.

2.5.2.1. Métodos espectrofotométricos

El método espectrofotométrico se basa en la determinación del espectro y cálculo de las coordenadas del espectro físico, graficando la transmisión o extinción (absorción) de una solución colorante utilizando como fundamento la Ley de Lambert-Beer (Pérez-Alvarez y col, 2000; Zollinger, 1991). También se aplica por la relación entre la reflectancia de la materia colorante en un material como una función de la longitud de onda. De esta forma, la absorbancia de un colorante es directamente proporcional a la concentración del mismo (Zollinger, 1991). La cuantificación dada para cada molécula depende del coeficiente de absorción y en consecuencia de solvente utilizado (Rodríguez-Amaya, 1999). Para el espectro de los carotenoides apolares se utiliza solventes como hexano y para las xantofilas polares como etanol. Por ello, la longitud

máxima ($\lambda_{\max}$) es dependiente del solvente. En cualquier solvente dado, los valores de $\lambda_{\max}$ incrementan con la longitud del cromóforo. Los grupos carbonilos conjugados con la cadena polienica aumentan el tamaño del cromóforo y en consecuencia incrementan $\lambda_{\max}$. Esto ocurre con la presencia de los grupos hidroxí y metoxi (Hendry y Houghton , 1996).

2.5.2.2. Métodos colorimétricos.

Los métodos colorimétricos se basan en la determinación de coordenadas visuales utilizando estándares para comparar la muestra a analizar (Pérez-Alvarez y col, 2000). El sistema CIE (Commision International de l'Éclairage) se basa en el hecho de que la luz reflejada de cualquier superficie colorida puede ser visualmente igualada por una mezcla aditiva tridimensional de luz roja, verde y azul en proporciones adecuadas, también conocidas como colores primarios (Zollinger, 1991). La ventaja de este sistema radica en que los tres colores están presentes al mismo tiempo, siendo el color percibido una combinación de los primarios. Este método también es conocido como CIELAB o espacio de color (Little, 1975). La localización de cualquier color en el espacio está determinada por tres coordenadas de color: L^* [luminosidad, $L=0$ (negro), $L=100$ (blanco)], a^* (+a indica rojo y $-a$ indica verde) y b^* (+b indica amarillo y $-b$ indica azul). Estas tres coordenadas de color conforman el espacio de color tridimensional CIELAB o valores triestímulos (Pérez-Alvarez y col, 2000).

El sistema Munsell se basa en tres dimensiones del color y la medición de esta bajo una escala apropiada (Pérez-Alvarez y col, 2000). Estas dimensiones del color son conocidas como tonalidad, luminosidad y cromaticidad o saturación. Las ventajas de este sistema se enumeran a continuación:

1. Cada nombre de un color se define por su grado de tonalidad, luminosidad y cromaticidad.
2. Cada color se puede registrar y comunicar mediante un código.
3. La decoloración se puede definir mediante una grafica a ciertos intervalos mediante su tonalidad, luminosidad, y croma.
4. Se especifica un color y se verifica mediante pruebas física.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materia prima.

Se utilizaron exoesqueletos y piernas de cangrejo azul (*Canellectes sapidus*) obtenidos del mercado de la Central de Abastos de la Ciudad de México. El tiempo estimado de la captura a la compra fue de 8 a 12 h. El material se congeló a -6°C hasta su uso.

3.2. Preparación de las muestras.

Una vez eliminada la mayor parte de la carne, el exoesqueleto se molió a través de un cedazo $1/8''$ en un molino manual marca Alfa 12 (Monterrey, Nuevo León, México), y se añadió 0.02% de una mezcla de butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) en una proporción 1:1 (p/p). Posteriormente, la mezcla se secó en un horno marca Felisa (Guadalajara, México) a 60°C por 14.5 h, hasta alcanzar una humedad final de 45% ya que a menor humedad el color del pigmento se oxidaba. La muestra seca se almacenó en bolsas selladas al vacío en equipo Multivac (Kansas City, Missouri) hasta su estudio. En la Figura 20 se indican los pasos seguidos para la preparación de las muestras.

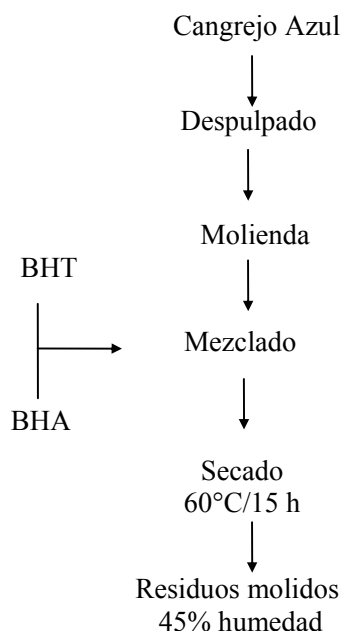


Figura 20. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima.

3.3. Extracción de pigmentos.

Los residuos secos fueron colocados en frascos ámbar de 390 mL para evitar la oxidación por efecto de la luz. A estos se les añadió el sistema de disolvente o aceite de soya en la proporción indicada en la Tabla 11. Los frascos se colocaron en una agitadora orbital marca New Brunswick Scientific modelo Orbit (Chicago, Illinois), y se agitaron a 200 r.p.m. durante 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Previamente se determinó el tiempo de agitación para obtener una extracción máxima.

Tabla 11. Sistemas utilizados para la extracción de pigmentos.

Componentes del sistema.	Proporciones de la mezcla	Proporción con respecto al residuo
Agua:cloroformo:metanol	1:2:4	1:10
Éter de petróleo:acetona: agua	15:75:10	1:10
Etanol:agua	40:60	1:10
Aceite de soya comercial	---	1:2

Fuente: Armenta (2002a)

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 7000 r.p.m. durante 20 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MI con rotor JA-14 (Palo Alto, California) y filtradas en una malla con un tamaño de poro de 1 mm². Los residuos se lavaron con 25 mL del sistema de disolventes empleado, centrifugándose de nuevo a las condiciones ya descritas. Finalmente, el residuo se filtró por 3 veces a través de un filtro Whatman 42. La extracción con disolvente se siguió mediante los análisis fisicoquímicos que se describen en la Sección 3.5, a las 0, 6, 12, 18 y 24 h de extracción.

La eliminación de los disolventes del filtrado se efectuó en un rotavapor Buchi RE 111 CH9230 con vacío (Flawil, Suiza) a 60°C por 15 min. A los extractos obtenidos se le agregó 20 mL de hexano; finalmente fueron congelados a -70°C hasta su análisis, según lo recomienda Rodríguez-Amaya (1999). Los tratamientos con etanol/agua y con aceite de soya, no se concentraron en rotavapor debido al alto contenido de agua y aceite, respectivamente. El residuo sólido del tratamiento con aceite de soya se lavó tres veces con

agua/cloroformo/metanol (1:2:4) en una relación 1:10 (p/v) y secado posteriormente a 60°C por 18 h; en los casos de tratamientos con los sistemas de disolventes orgánicos, el remanente de los disolventes se eliminó secando a 22°C por 18 h. Una vez secas las muestras sólidas se empacaron al vacío usando un equipo Multivac D-894 (Kansas City, Missouri) a -750 mBar. Tanto en el residuo como en el filtrado se llevaron a cabo los análisis fisicoquímicos que se describen en la Sección 3.5. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicados. Las Figuras 21 a 23 indican los pasos seguidos para la extracción de pigmentos de residuos de cangrejo azul para los cuatro tratamientos.

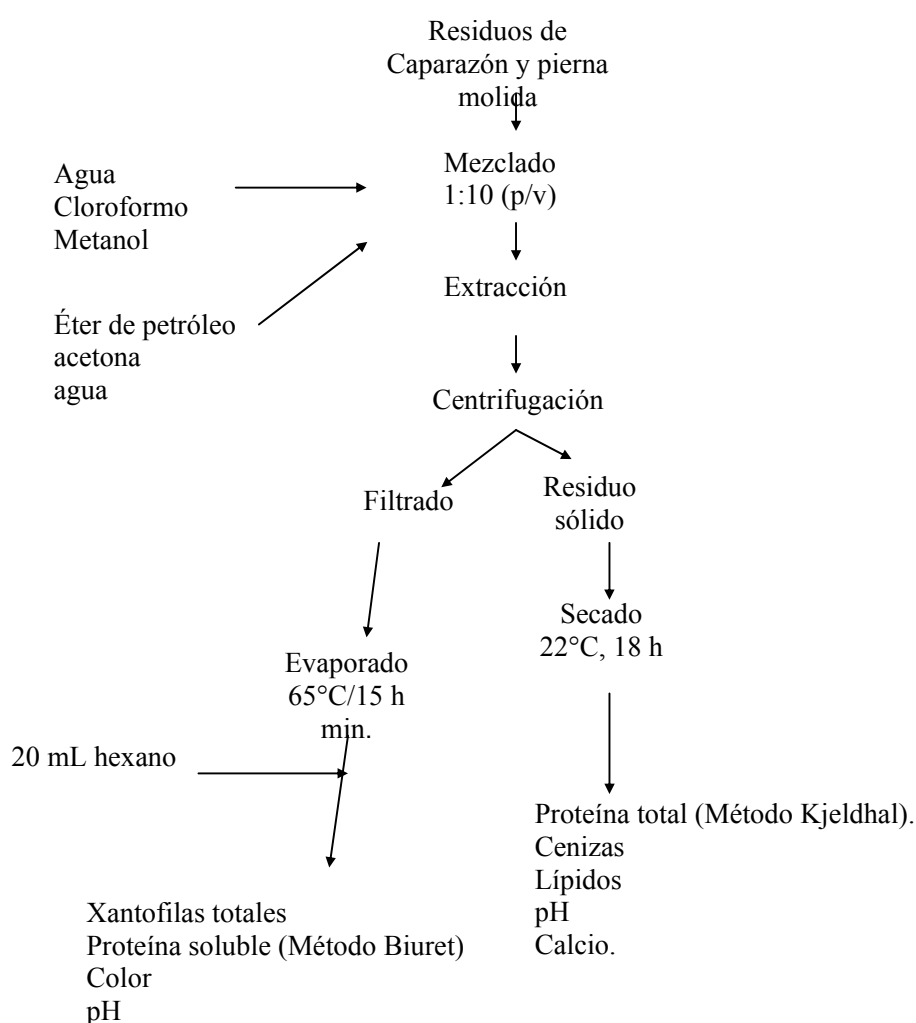


Figura 21. Diagrama de flujo del proceso de extracción con el sistema de solventes agua/cloroformo/ metanol y éter de petróleo/acetona/agua.

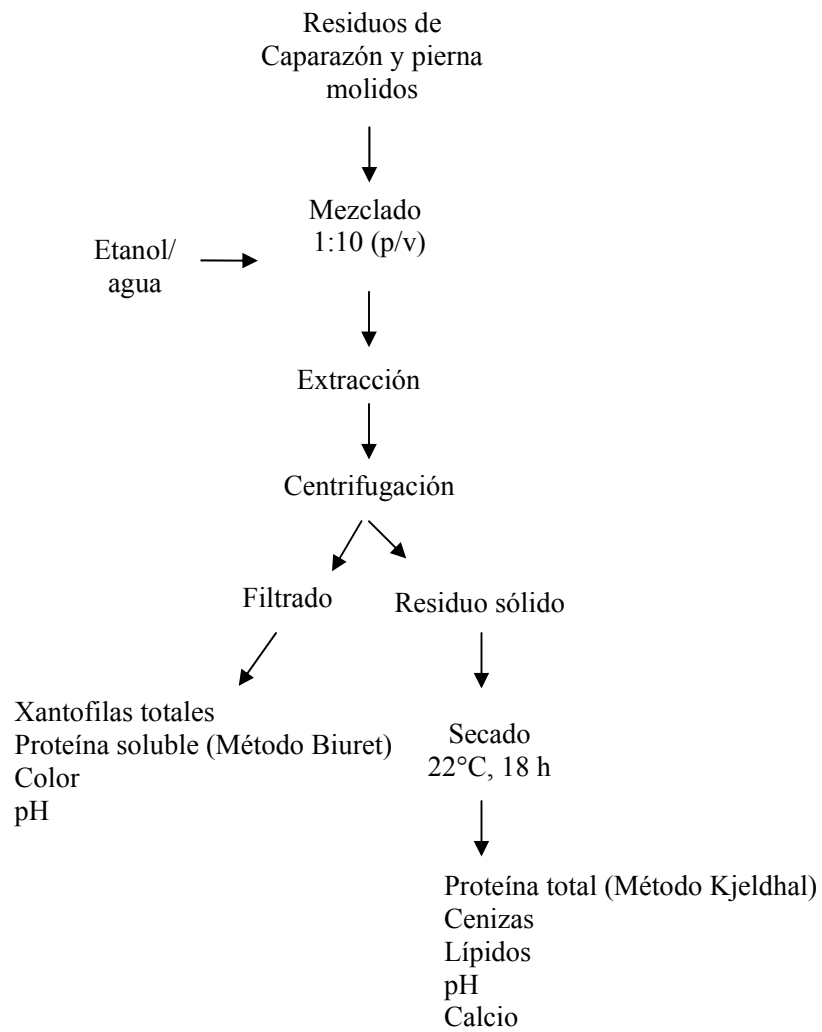


Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de extracción con el sistema etanol/agua.

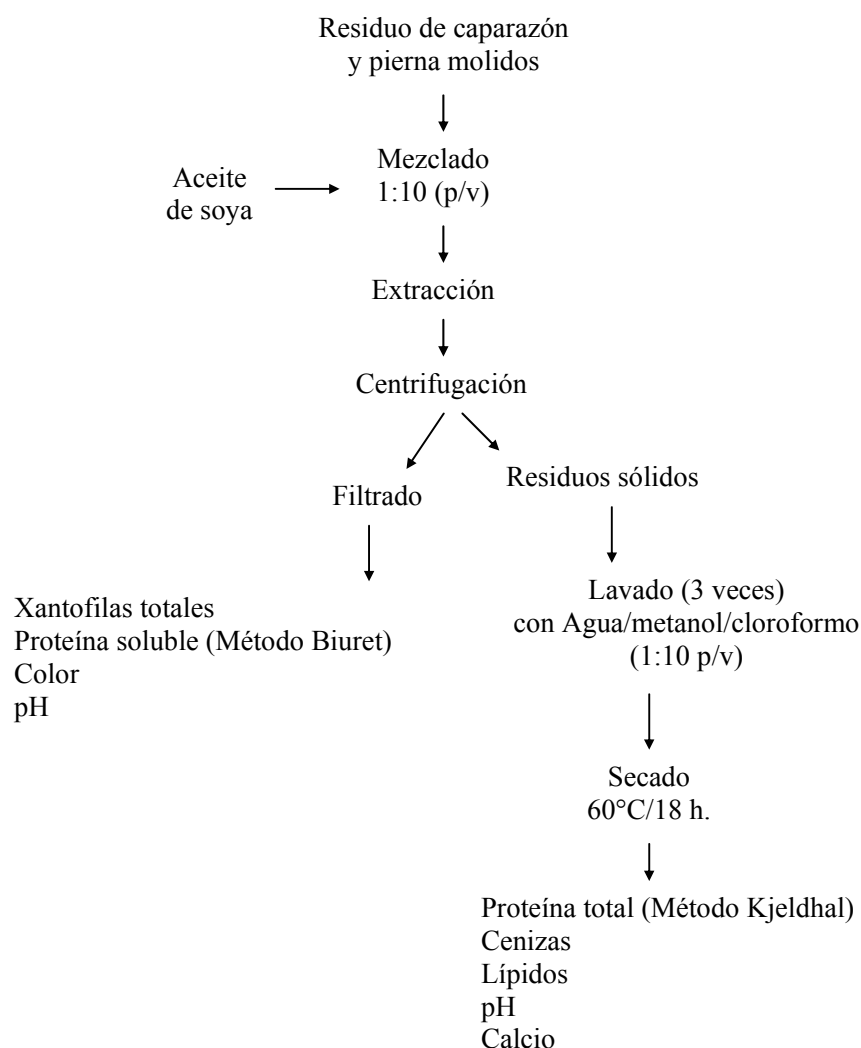


Figura 23. Diagrama de flujo del proceso de extracción con aceite de soya.

3.4. Extracción de pigmentos empleando fermentación láctica.

3.4.1. Desmineralización de los residuos.

Las muestras secas fueron descalcificadas a través del tratamiento ácido-alcalí (Muzarelli, 1977) con la finalidad de eliminar una proporción de carbonato de calcio y evitar un efecto de bufer en el sistema de fermentación. Se llevaron a cabo pruebas preliminares de desmineralización por 24 h para conocer la evolución en el contenido de proteína y de cenizas. La desmineralización se llevó a cabo de la siguiente manera: a 100 g de residuo se le añadió ácido acético 1N en proporciones de 1.5, 3, 4.5 y 6%. La Figura 24 muestra los

pasos para la desproteinización-desmineralización de los residuos de cangrejo azul. Se empleó en los experimentos posteriores una desmineralización con 4.5% de ácido acético 1N, ya que a 6% de ácido acético se observó un marcado oscurecimiento del pigmento.

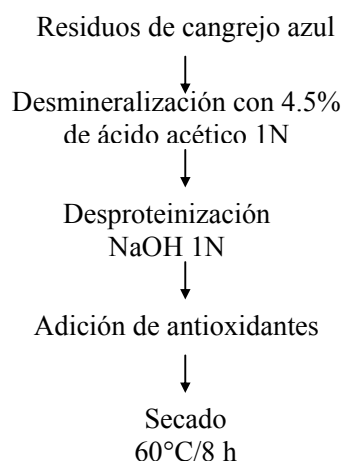


Figura 24. Diagrama de flujo del proceso de desproteinización-desmineralización de los residuos de cangrejo azul.

La adición de ácido acético al inicio del proceso permitió una reducción de la cantidad de carbonato de calcio presente que facilitó la desproteinización con NaOH. Las condiciones detalladas del proceso de desmineralización se describen en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones del proceso de desmineralización de materia prima.

Proceso, tiempo, velocidad y solución ácido o álcali.	Tiempo (h)
Agitación a 200 r.p.m. en solución al 4.5% de ácido acético, 1N	24
Lavado con agua destilada y agitado a 200 r.p.m.	0.15
Agitación con solución de NaOH al 1 N (1:10 p/v) agitado a 200 r.p.m.	1.0
Lavado con agua destilada y agitado a 200 r.p.m. (1:3 p/v)	.15
Lavado y agitado con agua destilada (1:10 p/v).	0.5
Secado a 62°C con 0.02% de BHA y BHT.	8.5

3.4.2. Fermentación láctica.

Los residuos desmineralizados fueron fermentados siguiendo el método reportado por Torrinsen y col (1981), Chen y Meyers (1983) y Armenta (1998) para residuos de camarón. La Figura 25 muestra los pasos seguidos:

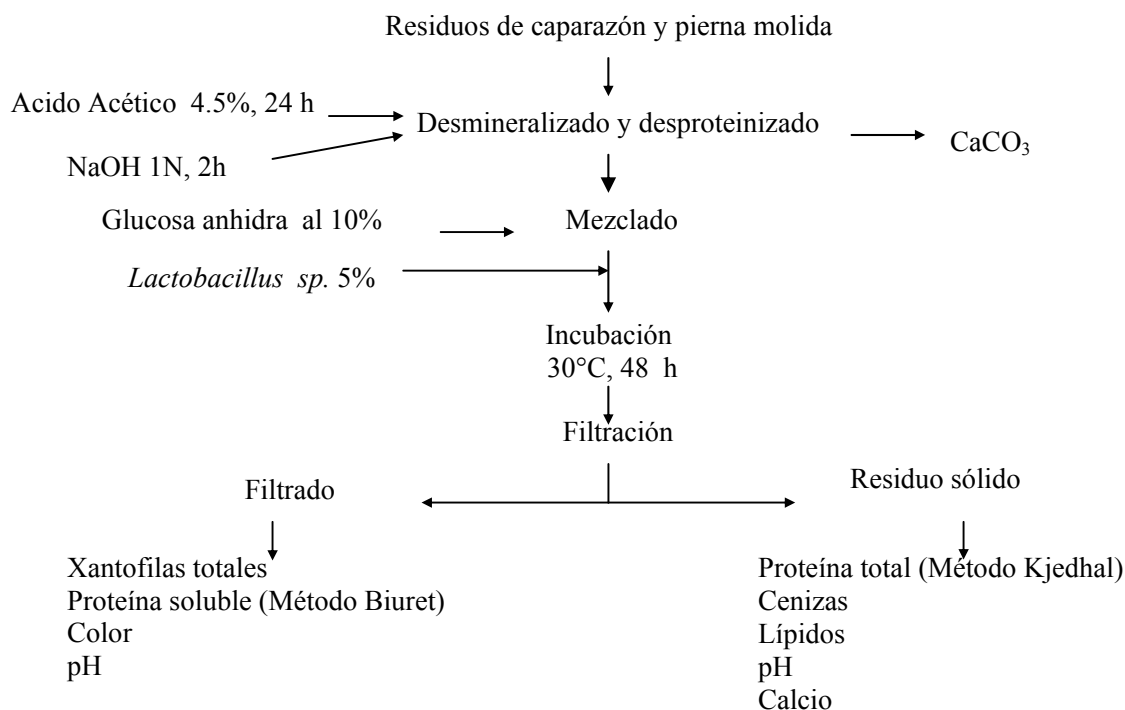


Figura 25. Diagrama de flujo del proceso de estabilización por fermentación láctica.

3.4.2.1. Cultivo iniciador.

El cultivo iniciador consistió en *Lactobacillus spp.* aislado a partir de camarón de aguas tropicales, donado por la Dra. Zakaria Zukaria de la Universidad de Malasia. Esta cepa es altamente acidificante. Las temperaturas de crecimiento de la cepa se indican en la Tabla 13. La cepa fue reactivada en caldo MRS (Bioxon) al 2% e incubada por 24 h a $32 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta alcanzar una densidad óptica mayor a 2.

Tabla 13. Microorganismo iniciador en la fermentación.

Microorganismo iniciador	Condiciones de crecimiento
<i>Lactobacillus spp.</i>	Temperatura mínima = 30°C Temperatura óptima = 32°C Temperatura máxima = 35°C

Fuente: Armenta, 1998.

3.4.2.2. Condiciones de la fermentación.

Las muestras descalcificadas y desproteinizadas fueron colocadas en envases ámbar de 390 mL de boca ancha y tapa de plástico, se agregó una solución de glucosa al 10% (p/v). Esta mezcla se inoculó con la cepa láctica (10:1 p/v). La fermentación se llevó a cabo a 32°C, en un baño María marca Felisa (México, D.F), durante un total de 48 h, tomándose muestras a las 0, 24, 36 y 48 h. En el residuo sólido se analizaron proteína total, cenizas, lípidos, pH y contenido de calcio. En el licor se analizaron xantofilas totales, proteína soluble, color y pH.

Al residuo sólido y al licor se les practicaron los análisis fisicoquímicos que se describen a continuación.

3.5. Análisis fisicoquímicos.

Estos se llevaron a cabo en la materia prima despulpada, molida, y secada, así como en los filtrados y residuos sólidos secos de los tratamientos de extracción, y en el licor de fermentación y residuo sólido de la fermentación sólida.

3.5.1. pH.

A 1 g de muestra se le añadió 9 mL de agua destilada, se agitó y se midió el pH en un potenciómetro ISE Beckman (Fullerton, California) (Chen y Meyers, 1983).

1.5.2. Proteína total.

Para la determinación de proteína total en el residuo sólido, se utilizó el método de Kjeldhal (Koniecko, 1980). A 0.5 g de muestra en un matraz microkjeldhal se agregaron 12 mL de ácido sulfúrico concentrado, tres perlas de vidrio, 2 g de una mezcla de sulfato de potasio pentahidratado y sulfato cúprico (10:1 p/p como solución catalizadora). La muestra se digirió por 5-6 h. Posteriormente se destiló y tituló con una solución valorada de ácido clorhídrico. El nitrógeno total se calculó por la ecuación:

$$\text{Nitrógeno total} = \frac{(B-A) \times N \times 0.04}{\text{Peso de la muestra}} (9.11577) (100\%) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

A = Blanco (mL gastados de HCl)

B = Muestra (mL gastados de HCl)

N = Normalidad del ácido clorhídrico

0.04 = miliequivalente del HCl

9.11577 = Factor de conversión a proteína en desechos de cangrejo (Lim y Sessa, 1995)

3.5.3. Lípidos.

El análisis de lípidos se llevó a cabo en base al método reportado por Koniecko (1980) modificado de la A.O.A.C. (1990). Se utilizaron dedales de celulosa a peso constante, en los cuales se colocó la muestra. Esta se extrajo en una unidad de extracción Soxtec 1045 (Bromma, Suecia) usando hexano como medio de extracción. El tiempo de ebullición y extracción de la muestra fue de 30 y 15 minutos, respectivamente. Finalmente se secaron los dedales con la muestra a 60°C por 15 min. La cantidad de lípidos presentes se calcularon por la fórmula:

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{A-B}{\text{Peso de la muestra}} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

A = Peso inicial del dedal + muestra.

B = Peso final.

3.5.4. Cenizas.

El contenido de cenizas fue analizado en la muestra por diferencia de peso según el método reportado por Koniecko (1980). La muestra se calcinó en un crisol de porcelana a 500-510°C a peso constante, en una mufla Lindberg (Guadalajara, México).

3.5.5. Calcio.

El análisis de calcio se llevó a cabo por el método de espectrofotometría de absorción atómica según se reporta el manual del equipo (Varian, 1979) basados en el método reportado por Adams y col (1966). Las muestras del residuo de cangrejo se analizaron de la siguiente manera: Se pesó una muestra de 0.7 g y fue colocada en un tubo de ensayo de 20 mL agregándose 10 mL de solución madre (ácido nítrico al 12.5%) para diluirlo a menor concentración. Se agitó en un vortex marca Scientific Instruments (Bohemia, Nueva York), se tomó una alícuota de 2 mL y se agregó a otro tubo de ensaye con 20 mL de solución madre con la finalidad de diluir la muestra a un intervalo de 0-4 ppm de calcio. Se agitó de nuevo y se leyó en un espectrofotómetro de absorción atómica en flama, marca Varian Spectraa-20 (Victoria, Australia) a una absorbancia de $\lambda = 422.7$ y un ancho de banda de 0.5. Previamente se construyó la curva de calibración con diluciones de 0 a 4 ppm del estándar de calcio (Baker) diluidos en solución madre (Anexo 1). El resultado en absorbancia fue extrapolado con la curva de calibración y se reportó en partes por millón (ppm).

3.5.6. Proteína soluble.

El análisis de proteína en los filtrados obtenidos por extracción con solventes y por fermentación láctica se llevó a cabo por el método de Biuret en el cual se forma un complejo colorido cobre-proteína, que se lee a $\lambda=540$ nm, según lo reporta Gornall y col (1949). Las muestras del extracto de pigmentos se analizaron de la siguiente manera: se

tomo 1 mL del filtrado y se agregaron 3 mL de solución de Biuret (Anexo 2), se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Palo Alto, California). Previamente se construyó una curva estándar con albúmina sérica bovina (Anexo 2). Los resultados se reportaron en mg proteína/mL de solución de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{mg/mL de proteína soluble} = m(A) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

A = Absorbancia ($\lambda=540$ nm).

m = pendiente (0.7729).

3.5.7. Xantofilas totales

Las determinaciones espectrofotométricas de xantofilas totales extraídas a partir de los filtrados se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Palo Alto, California) utilizando el método reportado por AOAC (1990) y adaptado por Armenta (2002a). Se utilizó una celda de cuarzo resistente al efecto de solventes, midiendo la absorbancia a $\lambda=474$ nm. El valor de la absorbancia se sustituyó en la fórmula:

$$\text{Xantofilas totales } (\mu\text{g/g}) = (A \times D/P \times 236)(1000) \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

A = Absorbancia a $\lambda = 474$ nm.

D = Factor de dilución

P = Peso de la muestra en gramos

236 = Absortividad específica de la transluteína

1000 = Factor de conversión de $\mu\text{g/g}$.

La transluteína se toma como referencia para xantofilas totales. Los factores de dilución establecidos fueron los mismos de los sistemas de solventes: 125 mL de solvente (100 mL iniciales + 25 mL de lavado)/10 g de residuo de cangrejo azul (v/p) = 12.5.

Para los tratamientos tratados con aceite de soya: 40 g de aceite de soya (20 g iniciales + 20 g de lavado)/10 g de residuos de cangrejo azul (p/p) = 4.

3.5.8. Color.

La determinación de color se llevó a cabo en un colorímetro Hunter Lab Colorflex, modelo 45 (Reston, Virginia). Se empleó como calibración a una cerámica blanca con los valores $L=93.20$, $a=-1.07$, $b=0.35$ y una cerámica negra. Se registraron los valores L , a y b para las muestras, donde $L= 0$ (negro) y $L= 100$ (blanco). Las coordenadas a y b se transforman a tonalidad y cromaticidad por las siguientes ecuaciones (Little, 1975):

$$\text{Cromaticidad} = \sqrt{a^2 + b^2}. \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\text{Tonalidad} = \arctan(b/a) \quad (\text{Ecuación 6})$$

La cromaticidad indica la intensidad en un color determinado y se refiere a la magnitud de un vector en coordenadas polares. La tonalidad representa la composición del color en un punto determinado en el espacio cromático; es el ángulo del vector en coordenadas polares y puede tener los siguientes valores: 0° = rojo; 90° = amarillo; 180° = verde; 270° = azul (Francis, 1999).

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Las muestras se asignaron aleatoriamente a los 4 tratamientos y 4 tiempos de extracción, empleando un diseño totalmente al azar tanto para los estudios de extracción con solventes como en los de fermentación láctica. Los datos obtenidos en duplicado en los experimentos empleando sistemas de solventes fueron sujetos a un análisis de varianza y pruebas múltiples de medias de Duncan. Los datos obtenidos de los experimentos en la fermentación láctica se sujetaron a una regresión lineal con excepción de los datos obtenidos para concentración de calcio los cuales se sujetaron a una prueba t de student. Se empleó un paquete estadístico SPSS versión 7.5.

Las Tablas 14 y 15 resumen las variables de respuesta analizadas y los análisis estadísticos aplicados a estas.

Tabla 14. Variables de Respuesta en cada experimento.

Procedimiento experimental	Variable de respuesta									
	pH	Proteína total	Proteína soluble	Lípidos	Cenizas	Xantofilas totales	Calcio	Luminosidad	Tonalidad	Cromaticidad
<u>Extracción con solventes</u>										
Residuo sólido	X	X		X	X		X			
Filtrado	X		X			X		X	X	X
<u>Fermentación láctica</u>										
Residuo sólido	X	X		X	X		X			
Filtrado	X		X			X		X	X	X

Tabla 15. Métodos estadísticos aplicados a los datos obtenidos experimentalmente.

Procedimiento experimental	I.1 Variable de respuesta	Factores y niveles	Métodos estadísticos
Extracción con solventes	pH (sólido), pH (filtrado), proteína total, proteína soluble, xantofilas totales, luminosidad, cromaticidad, tonalidad	tiempo (4) tratamientos (4) tiempo x tratamientos	Prueba F Duncan
	Calcio	tiempo (inicial y final) tratamientos (4)	Prueba F Duncan
Fermentación láctica	pH (sólido), pH (filtrado), proteína total, proteína soluble, xantofilas totales, luminosidad, tonalidad, cromaticidad Calcio	tiempo, (tiempo ²) tiempo inicial y final)	Regresión lineal Student-t

IV. Resultados

4.1. Extracción con disolventes.

4.1.1. Residuo sólido.

4.1.1.1. Secado de materia prima.

Los residuos de cangrejo azul fueron secados hasta llegar a un contenido de agua de 45%. Este porcentaje se determinó previamente como el más adecuado debido a que a menores contenidos de humedad el pigmento se oscurecía. Este efecto se debió al bajo contenido de humedad y la temperatura de secado. Akpan (1997) reportó la composición proximal y mineral del caparazón del *C. sapidus* con $29.20 \pm 0.04\%$ de humedad y con un contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas de 27.82 ± 0.01 , 3.80 ± 0.15 , 2.82 ± 0.23 y $50.36 \pm 0.04\%$ respectivamente. Por otra parte, Otwell y Koburger (1985) reportaron 80.3% de la humedad de este residuo con niveles de proteína y lípidos (15.9 y 1.3%, respectivamente). Los valores obtenidos en la composición proximal de la materia prima se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición proximal de residuos secos, y resultados de otros autores (en *C. sapidus*).

Humedad	Proteína	Cenizas	Lípidos	Carbohidratos	Referencia
45	47	56.5	3.46	Nd	Datos obtenidos
36.49	11.88	10.28	Nd	Nd	Velez y col. 1991
29.2 ± 0.04	27.82	50.3	3.8	2.82	Akpan 1997
4.5	24	56	12.9	Nd	Rutledge, 1971
80.3*	15.9	1.9	1.3	Nd	Otwell y Koburger, 1985

* cangrejo azul entero.

Nd = No determinado.

4.1.1.2. pH

Se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0.0001$) (Anexo 3), no así entre los tiempos ($P > 0.0299$) ni la interacción tiempo x tratamiento ($P > 0.0727$). Los residuos sólidos obtenidos por los cuatro sistemas de extracción mostraron tener un comportamiento similar. El valor de pH del residuo extraído con éter de petróleo/ acetona/agua se mantuvo por debajo de los demás tratamientos ($x=8.501$) (Anexo 4). Como

era de esperarse, en los cuatro tratamientos se mantuvo un pH alcalino (Figura 26). Según Rodríguez-Amaya (1999) y Yuan y Chen (2001), este ambiente provoca una isomerización en la estructura del pigmento carotenoide y también una desnaturalización en la proteína, generando consecuentemente un efecto batocrómico al observarse un incremento en el tono rojo del filtrado (Figura 35).

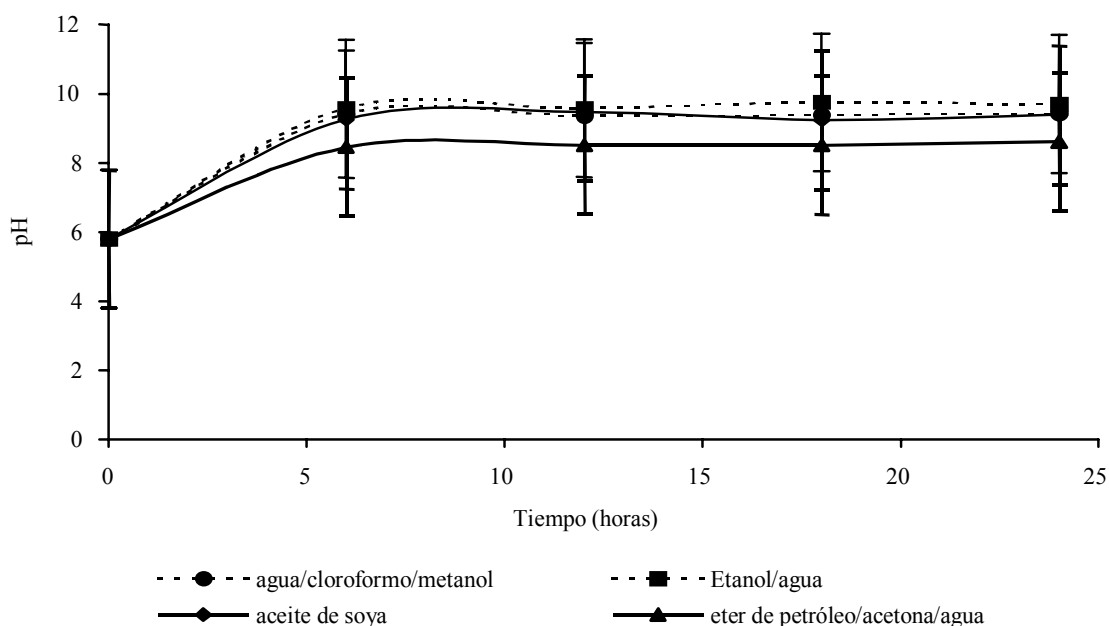


Figura 26. pH en los residuos sólidos cangrejo azul en los 4 sistemas de disolventes.

4.1.1.3. Proteína total.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, tiempo de interacción de ambos con respecto al contenido de proteína total ($P > 0.001$ en los tres casos) (Anexo 3). El contenido de proteína total en los tratamientos con agua/cloroformo/metanol, etanol/agua y éter de petróleo/acetona/agua disminuyó rápidamente de 0 a 5 h, con valores medio de $x = 1.35\%$, 2.93% , 9.43% , respectivamente (Anexo 4). En el tratamiento con aceite de soya la disminución del contenido de proteína fue más lenta, obteniendo en valor medio $x = 26.72\%$ (Anexo 4) con un aumento posterior (Figura 27). Estos cambios pudieron deberse a la gran variación que hay en la constante dieléctrica de los disolventes (Scopes, 1994) (Tabla 17).

Tabla 17. Constantes dieléctricas de los disolventes aplicados.

Disolventes	Constante dieléctrica
Agua	78.54
Cloroformo	4.9*
Metanol	32.63
Etanol	24.30
Acetona	20.7
Éter de petróleo	2.0-2.2

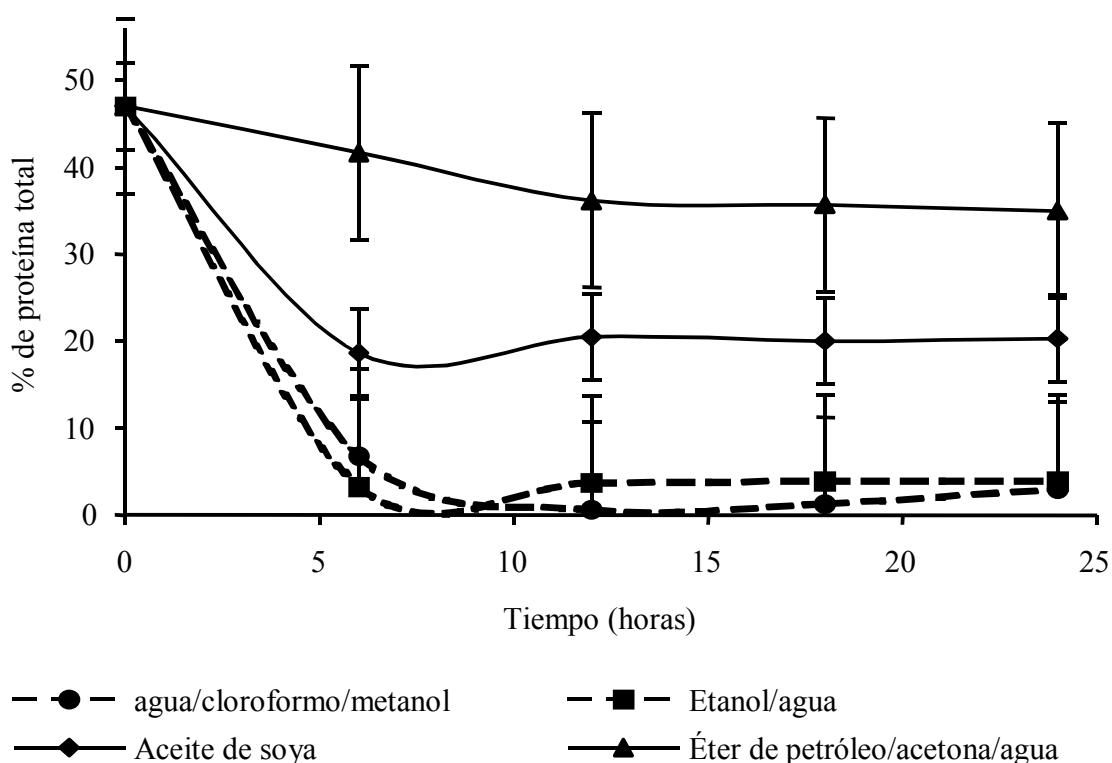
$\epsilon_r = 25^\circ\text{C}$

* $\epsilon_r = 20^\circ\text{C}$

Fuente: Atkins, 1991.

Dado que parte de la proteína está asociada a los pigmentos, al extraer estos también se extrajo una fracción de la proteína presente, por otra parte el carácter polar del etanol, metanol y cloroformo promovieron la hidrofobicidad de las proteínas, generando su precipitación (Scopes, 1994; Stryer, 1995), efecto que podría esperarse del sistema éter de petróleo/acetona/agua. Sin embargo la extracción no fue tan eficiente como con los otros disolventes en cuanto a disminución del contenido proteico en el residuo sólido, como se observa al ser el sistema de disolventes orgánicos en donde se encontró mayor contenido de proteína ($x = 9.43\%$). El efecto de la polaridad de cada sistema de solvente varía de acuerdo a la proporción de cada solvente presente en el sistema dado. Por tanto los sistemas con mayor polaridad (agua/cloroformo/metanol y petróleo/acetona/agua) extraen en menor proporción a la proteína dado el carácter poco polar de esta (Anexo 4). La proteína contenida en los residuos de crustáceos puede ser aplicada en alimentación animal, como lo reportan Velez y col (1991), Evers y Carroll (1996; 1998), Abazinge y col (1993) y Foss y col (1987), quienes han utilizado ensilados de crustáceos para ganado vacuno. Por otra parte, la proteína extraída es buena fuente de aminoácidos, como lo reporta Armenta y col (2002b) quienes describen el patrón de aminoácidos que hace a este material un buen aditivo de alimentario para peces, en forma de atrayente. Estos son necesarios para que estos organismos, en especial las truchas, acepten los alimentos (Muriana y col. 1993).

Figura 27. Contenido de proteína total en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.



4.1.1.4. Lípidos.

Como era de esperarse, el contenido de lípidos fué significativamente mayor ($P>0.001$) (Anexo 3) en los residuos tratados con aceite de soja ($x=21.334\%$) (Anexo 4). El contenido en los residuos tratados con los 3 sistemas de disolventes disminuyó en forma constante durante el estudio, permaneciendo siempre en valores menores a 5% siendo significativamente menor en los residuos tratados con éter de petróleo/acetona/agua ($x=0.0$). El contenido de lípidos en los residuos de cangrejo han sido reportados entre 3 y 4% (Akpan, 1997), mientras que Otwell y Koburger (1985) lo reportan menor a 2%. Esta pequeña cantidad de lípidos puede deberse a su asociación con los pigmentos en forma de lipoproteínas (Muriana y col, 1993) sin que haya una concentración apreciable de lípidos en

el exoesqueleto. Entre los lípidos presentes en organismos marinos se encuentran los poliinsaturados como los ácidos DHA y EPA, y los ácidos grasos ω -3, considerados como nutraceuticos (Kritchevsky, 1999; Dillard y German, 2000; Guillou y col, 1993; García, 1998). Aunque en esta tesis no se caracterizaron los ácidos grasos presente, estos deben de incluir a los antes mencionados lo que hace a la fracción lipídica de los residuos de cangrejo azul de gran importancia como fuente de otros compuestos de alto valor agregado (Gilberg y Stenberg, 2001).

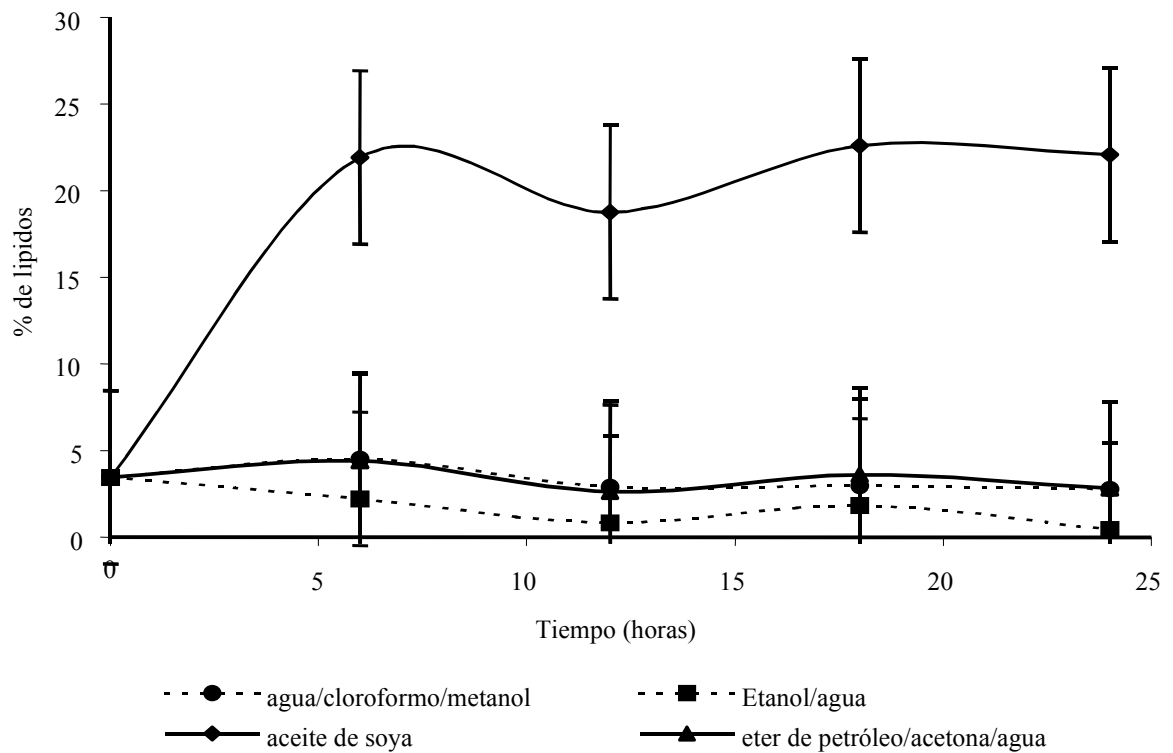


Figura 28. Contenido de lípidos en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.

4.1.1.5. Cenizas

Las cenizas están en gran parte representadas por fósforo, carbonato de calcio y otros minerales presentes en el exoesqueleto (Akpan, 1997; Otwell y Koburger, 1985). Se observó diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.0001$), con el tratamiento con soya no hubo variación en el contenido de cenizas durante el tiempo de estudio. En cambio, los tratamientos con sistemas de solventes disminuyeron a las 6 horas de extracción el

contenido de cenizas a valores cercanos a 38% no habiendo diferencia significativa entre ellos (Anexo 4), se observó una disminución significativa ($P>0.0001$) en los residuos tratados con agua/cloroformo/metanol y etanol/agua, a las 12 horas de estudio. En general, los sistemas de solventes no afectan el contenido de quitina y quitosano en los residuos, dato importante ya que estos, además de ser una fuente de pigmentos, los son también de quitina que puede ser explotada como compuesto de alto valor agregado (Gildberg y Stenberg, 2001)

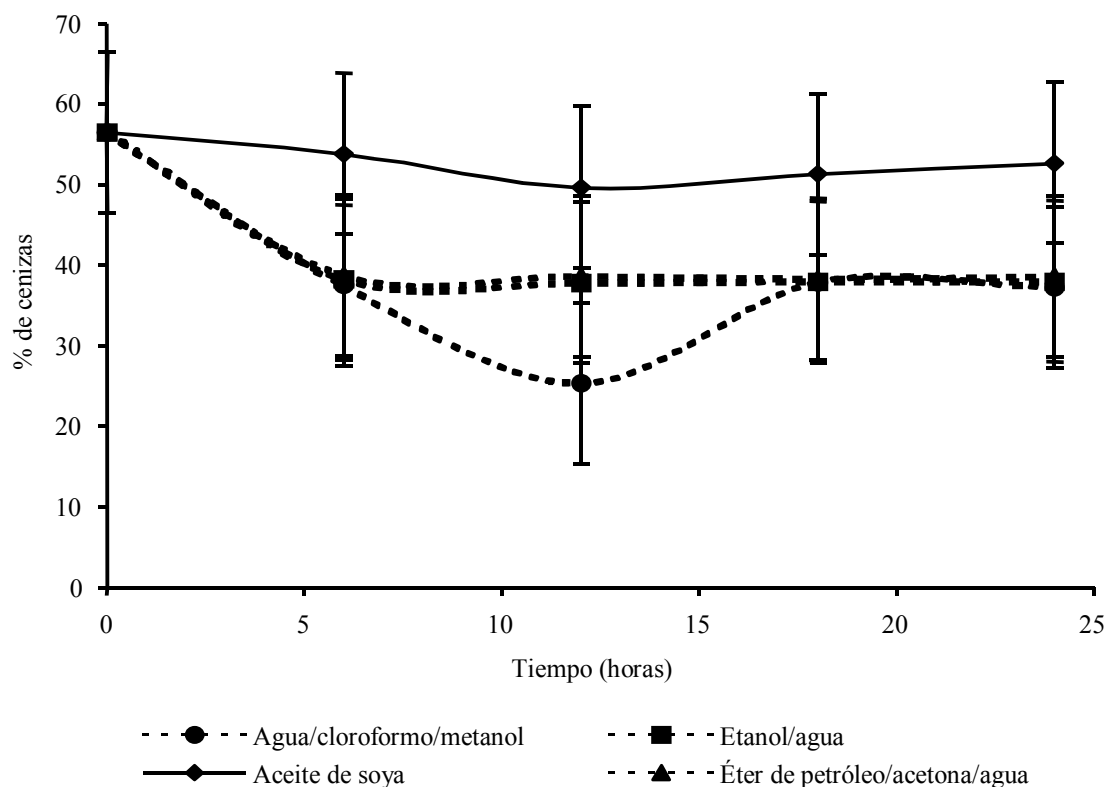


Figura 29. Contenido de cenizas en los residuos sólidos de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.

4.1.1.6. Carbonato de calcio.

El contenido de carbonato de calcio disminuyó en todos los tratamientos aplicados, observándose diferencias significativas ($P > 0.0001$) (Anexo 6) para los tratamientos, tiempo e interacción entre ellos. El mayor contenido medio de calcio se observó en el tratamiento con agua/cloroformo/metanol ($\bar{x} = 318.175 \text{ mg}/100\text{g}$) y el menor en el tratamiento con soya

($x=290.197$ mg/100g). Los sistemas agua/cloroformo/metanol y éter de petróleo/acetona/agua no mostraron diferencias significativas entre sí; por su parte, los sistemas etanol/agua y aceite de soya tampoco mostraron diferencias (Anexo 7). Este patrón se pudo deber a una extracción de calcio asociado con los pigmentos contenidos en las vesículas en el caparazón del crustáceo con pigmentos carotenoides disponibles para su extracción. Los residuos de cangrejo azul tienen un contenido de carbonato de calcio de 614.46 mg/100 g, lo que dificulta la extracción de compuestos de alto valor agregado como los pigmentos o la quitina. Se han diseñado varios métodos para disminuir este contenido de carbonato de calcio, el cual también puede ser recuperado para usos industriales (Asenjo, 1990). Entre los métodos por los cuales se puede descalcificar a los residuos de crustáceos están los reportados por Nettles (2002), que se basa en la adición de una solución de ácido clorhídrico 2 N a desechos para obtener quitosano adecuado para fabricar películas que favorecen la síntesis de matrices cartilaginosas. Rutledge (1971) reportó 68% de reducción de carbonato de calcio en el cangrejo azul, disminuyendo el contenido de humedad a 6%, moliéndolo y tamizándolo a través de una malla de $\frac{1}{4}$ " obteniendo además 58% de proteína. Sin embargo, este autor no reporta el contenido de pigmentos, pues su finalidad fue aprovechar el contenido proteico para dietas de ganado vacuno y de que a esta reducción de humedad los carotenoides se oxidan. Otwell y Koburberg (1985) reportan 115 mg/100g de CaCO_3 en los residuos de cangrejo azul entero a 80.3% de humedad (Tabla 18). Charley (1987) reporta una concentración de 63 mg de calcio por 100 g de porción comestible en camarón (2800 ppm). Específicamente el metanol es considerado un disolvente que puede disolver las sales inorgánicas como el carbonato de calcio. Sin embargo, los demás sistemas de solventes mostraron también tener esa capacidad al disminuir el contenido de calcio (Merck, 1980).

Tabla 18. Contenido de carbonato de calcio en los residuos sólidos con tratamiento y sin tratamiento con sistemas de solventes en la hora inicial* y final.**

Sistemas de solventes	Mg de CaCO_3 / 100 g de muestra
Materia prima sin solvente*	614.46 ± 0.9
Agua/cloroformo/metanol**	5.9 ± 0.5
Etanol/agua**	7.0 ± 0.1
Aceite de soya**	11.9 ± 0.9

Tabla 19. Contenido de cenizas reportado por diferentes autores en cangrejo azul.

Calcio (mg/100 g)	Especie	Referencia
614.45	<i>C. sapidus</i>	Datos obtenidos
115*	<i>C. sapidus</i>	Otwell, y Koburger, 1985
10648	<i>C. sapidus</i>	Akpan, 1997.
170000	<i>C. sapidus</i>	Rutledge, 1971.

* Cangrejo azul entero

4.1.2. Filtrado.

4.1.2.1. pH

No hubo diferencia en el pH de los filtrados (Figura 30) manteniéndose dentro de un intervalo entre 7 y 9. Los valores menores se observaron en los tratamientos con aceite de soya ($x=4.685$), mientras que en los tratamientos con sistemas de disolventes los valores medios fueron en la región alcalina (Anexo 4), encontrándose diferencias significativas entre los cuatro tratamientos. Los valores de pH en el filtrado permanecieron constantes a lo largo del tiempo de estudio, no habiendo diferencia significativa con respecto al tiempo ($P>0.2121$), ni en la interacción tiempo x tratamiento ($P>0.0185$) (Anexo 3)

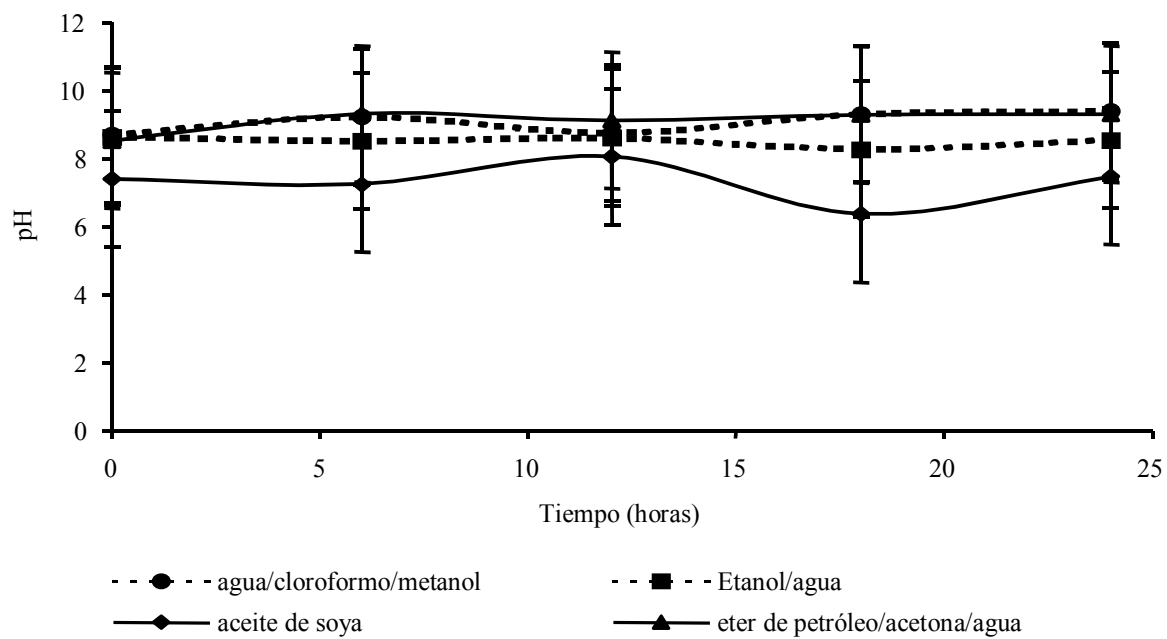


Figura 30. pH en los filtrados de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.

4.1.2.2. Proteína soluble.

En el contenido de proteína soluble en los filtrados se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos, el tiempo y la interacción de ambos ($P>0.0001$) (Anexo 3). El valor medio mas alto se observó en el sistema agua/ cloroformo/metanol ($x=2.9\%$) y el menor en el sistema éter de petróleo/acetona/agua ($x=0.3\%$) (Anexo 4). Por otra parte, en el residuo la mayor concentración se encontró en el tratamiento éter de petróleo/acetona/agua ($x=9.43\%$) y el menor en los residuos tratados con agua/cloroformo/metanol ($x=1.35\%$), lo que corrobora lo concluido en la Sección 4.1.13. en el sentido de que la proteína se precipitó debido a la polaridad de la mezcla de disolventes.

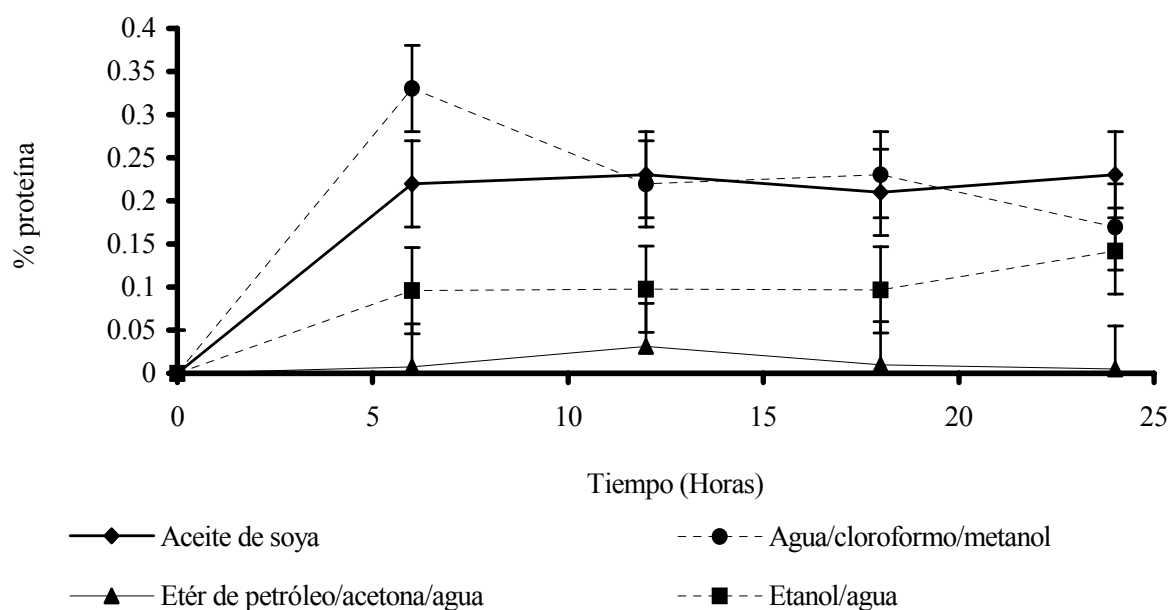


Figura 31. Contenido de proteína soluble del filtrado de cangrejo azul extraído con los 4 sistemas de disolventes.

4.1.2.3. Xantofilas totales.

Las xantofilas totales en los extractos de cangrejo azul estan constituidos por carotenos y xantofilas principalmente. El tiempo óptimo de extracción obtenidos en los diferentes tratamientos se observó a las 12 horas en las muestras tratadas con los sistemas agua/cloroformo/metanol y aceite de soya (Figura 32) aunque este último en cantidades muy pequeños. Se observó una concentración extremadamente pequeña de xantofilas en el filtrado obtenido con el sistema etanol/agua (0.0433 µg/g) (Anexo 4), así como con aceite de soya ($x=0.0062$ µg/g) (Anexo 4). Solo el tratamiento fue significativo en la cantidad extraída de xantofilas ($P>0.0001$) (Anexo 3), no así el tiempo ($P>0.606$) ni la interacción de ambas variables ($P>0.464$). Armenta (1988) reportó mayores concentraciones de xantofilas totales en camarón con respecto a lo obtenido en el cangrejo azul (Tabla 19).

Tabla 20. Xantofilas totales en cangrejo azul y camarón.

Sistema de disolventes	Xantofilas totales (ug/g)	
	Camarón*	Cangrejo azul**
Agua/cloroformo/metanol (1:2:4)	20.71	0.4788 ± 0.120
Éter de petróleo/acetona/agua (15:75:10)	22.085	0.2147 ± 0.040
Etanol: agua (40:60)	14.271	0.0433 ± 0.001
Aceite de soya	17.102	0.0062 ± 0.020

* Armenta (1988)

** Valores medios (x) obtenidos (Anexo 4).

Por su parte, Shahidi y Synowiecki (1991) reportaron la extracción de pigmentos carotenoides utilizando aceite de hígado de bacalao a 80°C a partir de residuos de langostilla recuperando 1.99 ± 0.03 mg/mL a partir de 3.32 mg/mL de residuo. En las últimos etapas de la extracción posiblemente ocurrió una oxidación debido al continuó proceso de extracción con disolventes o a la severidad del tratamiento (Rodríguez-Amaya, 1999). La mayor eficiencia de extracción de los sistemas agua/cloroformo/ metanol y éter de petróleo/acetona/agua se debió posiblemente a que los pigmentos, en especial la astaxantina, tiene una cadena de unidades de isopreno monoesterificado con ácidos grasos. La polaridad de la astaxantina se ve reducida por su unión con otras biomoléculas, predominando su carácter no polar (Torrinsen y col, 1989; Storebakken, 1992).

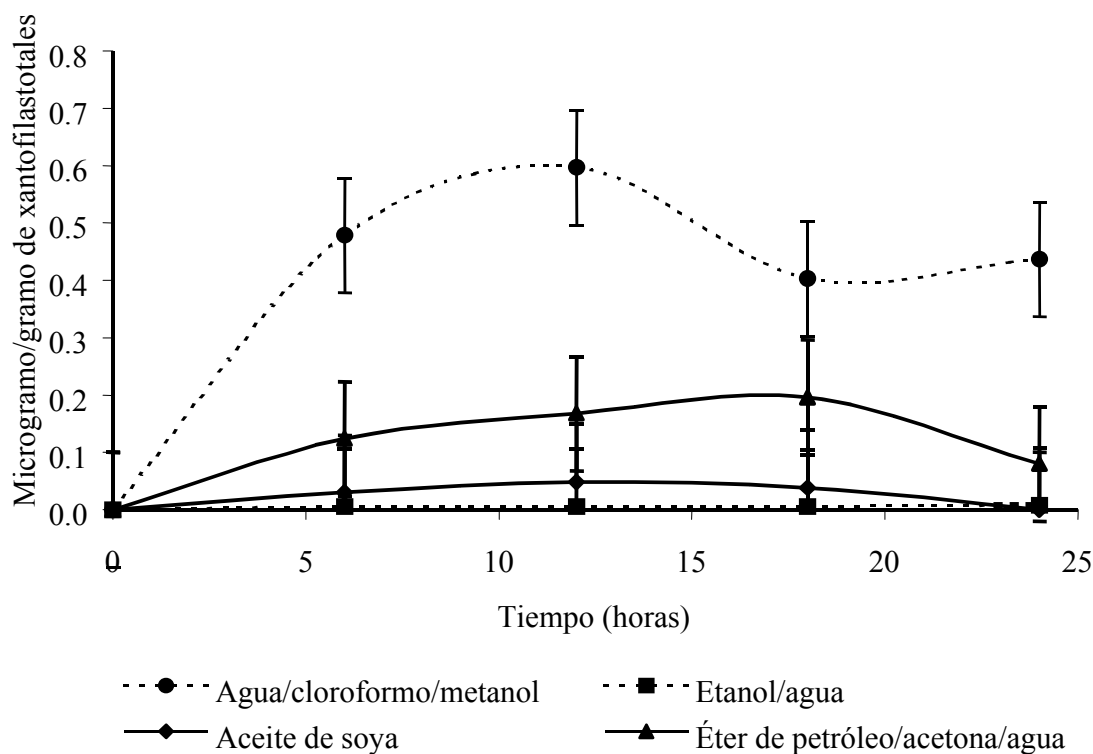


Figura 32. Contenido de xantofilas totales del filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.

4.1.2.4 Color.

Luminosidad.

La luminosidad en el caso particular del filtrado obtenido, se mostró la cantidad de luz absorbida o reflejada por el cromóforo. Un aumento de luminosidad significa que el producto es más o menos claro, ya que $L = 0$ es negro absoluto y $L = 100$ es blanco absoluto. En todos los tratamientos se observó un aumento de la luminosidad en forma constante hasta las 17 horas (Figura 33). Se encontraron diferencias significativas entre los

tratamientos estudiados ($P>0.0001$) (Anexo 3), y en la interacción tratamiento x tiempo ($P>0.01$); en menor grado, la luminosidad se afectó con el tiempo de extracción ($P>0.0397$). La mayor luminosidad se observó para el tratamiento con éter de petróleo/ acetona/agua ($x=18.010$), seguido por etanol/agua ($x=11.268$) y agua/cloroformo/ metanol ($x=9.026$). Estos tres tratamientos no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento con aceite de soya sí fue significativamente diferente a los demás ($x=5.678$). Tomando en cuenta que el aceite de soya fue el menos eficiente en la extracción de xantofilas totales (Sección 4.1.2.3), se puede concluir que la menor luminosidad encontrada en el tratamiento con aceite de soya reflejó varias xantofilas en solución.

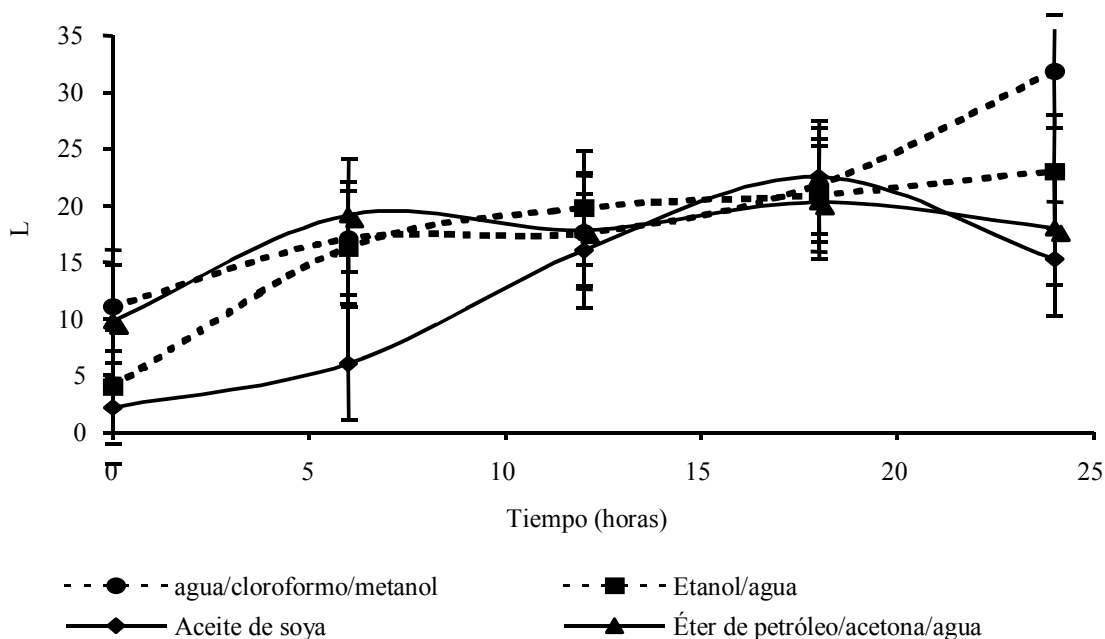


Figura 33. Luminosidad del filtrado de cangrejo azul extraídos con los 4 sistemas de disolventes.

Tonalidad.

La tonalidad esta expresada en grados, en un sistema de coordenadas polares. Por tanto, si los valores son de 0 a 90, se refiere a colores que van de rojo (0°) a amarillo (90°). Si los valores se encuentran en el segundo cuadrante (90 a 180°), el color varía de amarillo (90°) a verde (180°); en el tercer cuadrante variará de verde (180°) a azul (270°); finalmente, en el cuarto cuadrante el color varía de azul (270°) a rojo (360°=0). Los sistemas de aceite de soya, éter de petróleo/acetona/agua y agua/cloroformo/metanol produjeron valores de tonalidad en la región rojo-amarillo, siendo el color más cercano a rojo observados en el sistema agua/cloroformo/metanol ($x=53.96^\circ$) (Anexo 4) y el más cercano a amarillo, el aceite de soya ($x=74.13^\circ$). Entre estos tres tratamientos no hubo diferencias significativas, pero sí lo hubo con respecto al tratamiento con etanol/agua ($x=249.7^\circ$) indicando que el color adquirido por el filtrado fue en la región verde-azul ($x=249.7^\circ$). Hay que recordar que el pigmento de *C. sapidus*, en su forma natural, es de color azul por efecto de la fracción proteíca. El cambio a color rojizo pudo deberse a una oxidación del pigmento ya que la

pérdida o cambio de color indica una degradación o modificación estructural, así como también la isomerización cis también lo provoca, generando un cambio hipsocrómico o a la desnaturalización de la fracción proteica (Rodríguez-Amaya, 1999). Por otra parte, ni el tiempo ni la interacción tratamiento x tiempo presentaron diferencias significativas ($P > 0.801$ y 0.0981 , respectivamente) (Anexo 3).

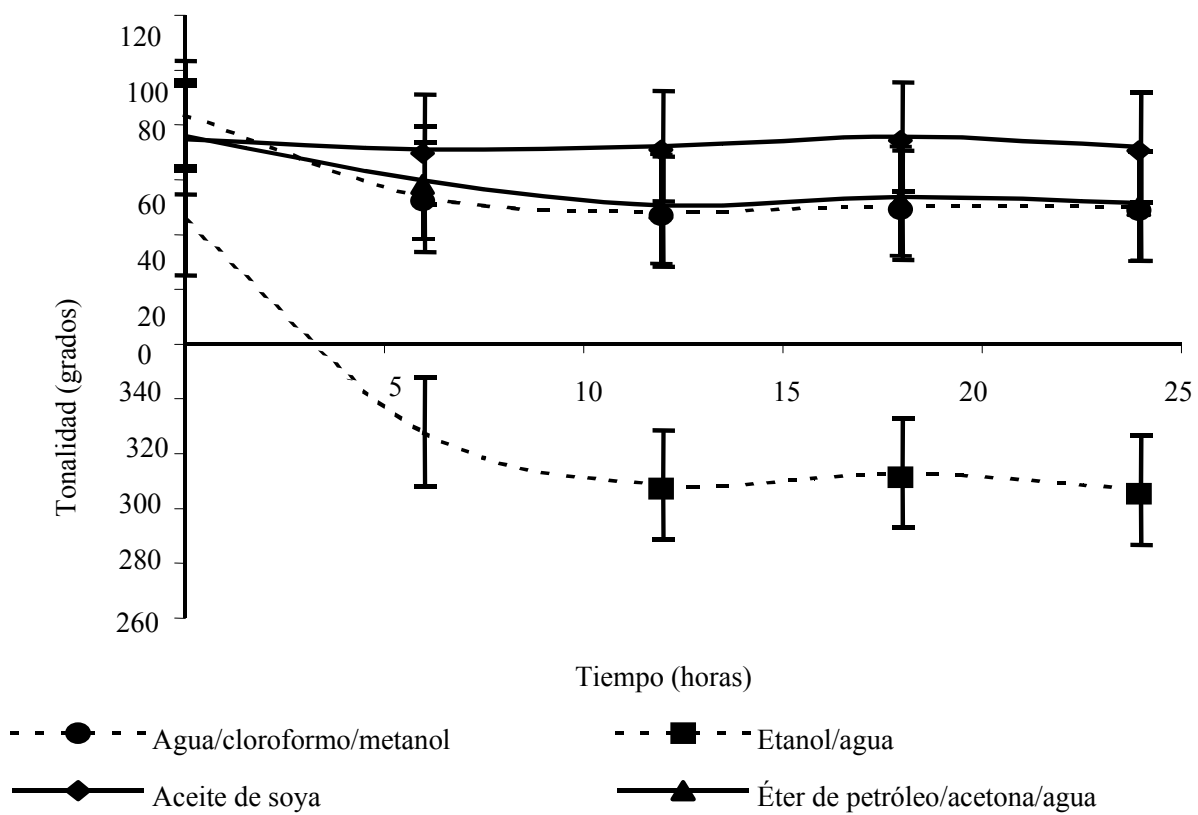


Figura 34. Tonalidad del filtrado de cangrejo azul extraído con los 4 sistemas de disolventes.

Cromaticidad.

La intensidad del color se describe por la magnitud del vector en coordenadas polares. Se observó un aumento de intensidad más rápido en los tratamientos con aceite de soya y éter de petróleo/acetona/agua (Figura 35), y más lento en agua/cloroformo/metanol. La extracción con agua/cloroformo/metanol fue significativamente diferente a los otros tres tratamientos (Anexo 3), mostrando un valor medio de $x=22.936$ (Anexo 4). Esta diferencia se presentó en menor grado con respecto al tiempo de extracción ($P>0.0101$) y a la interacción tratamiento x tiempo ($P>0.0373$).

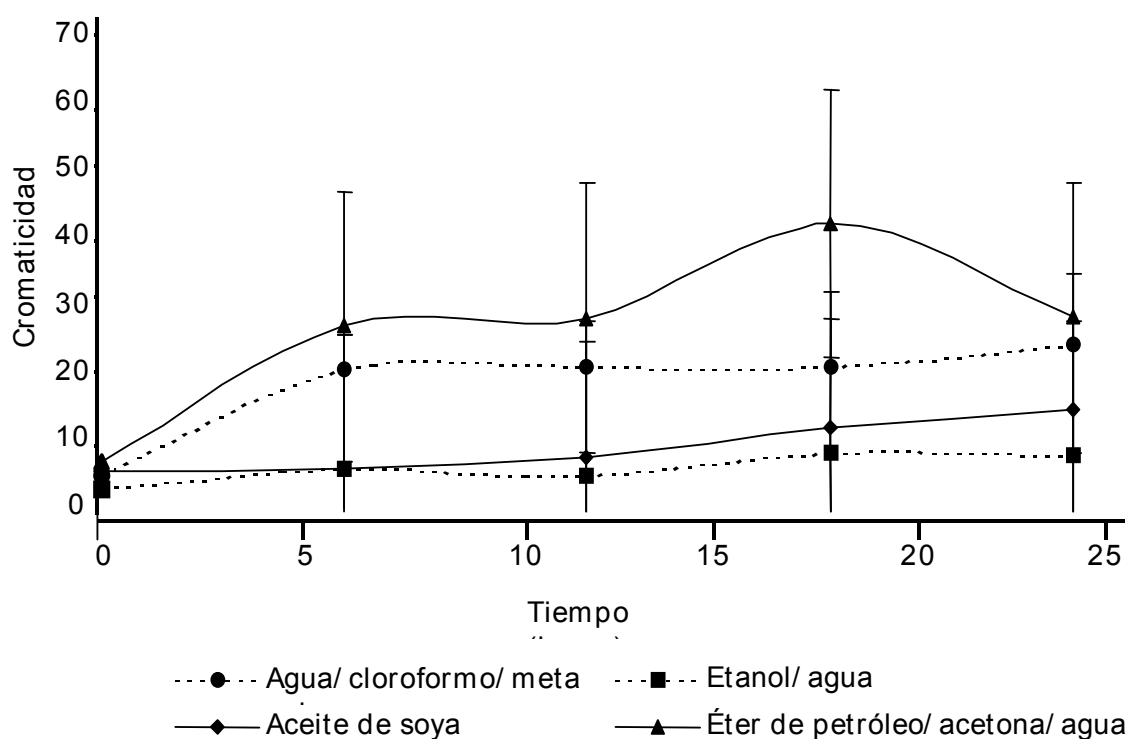


Figura 35. Cromaticidad del filtrado de cangrejo azul extraído con los 4 sistemas de disolventes.

4.2. Fermentación láctica.

4.2.1. Residuos sólidos.

4.2.1.1. Desmineralización de residuos sólidos.

La desmineralización y desproteinización de residuos sólidos, previo a la fermentación, se llevó a cabo empleando 4.5% de ácido acético 1N y NaOH 1N, modificando el método reportado por Chen y Meyers (1983) para desechos de camarón. Al aplicar ácido acético como agente desmineralizante se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto a la disminución de proteína y de cenizas. Como se indicó en la Sección 3.41. se decidió llevar a cabo la desmineralización con 4.5% de ácido acético 1N, ya que, si bien empleando 6% se tenía mayor cantidad de cenizas eliminados, el pigmento se oscurecía notablemente.

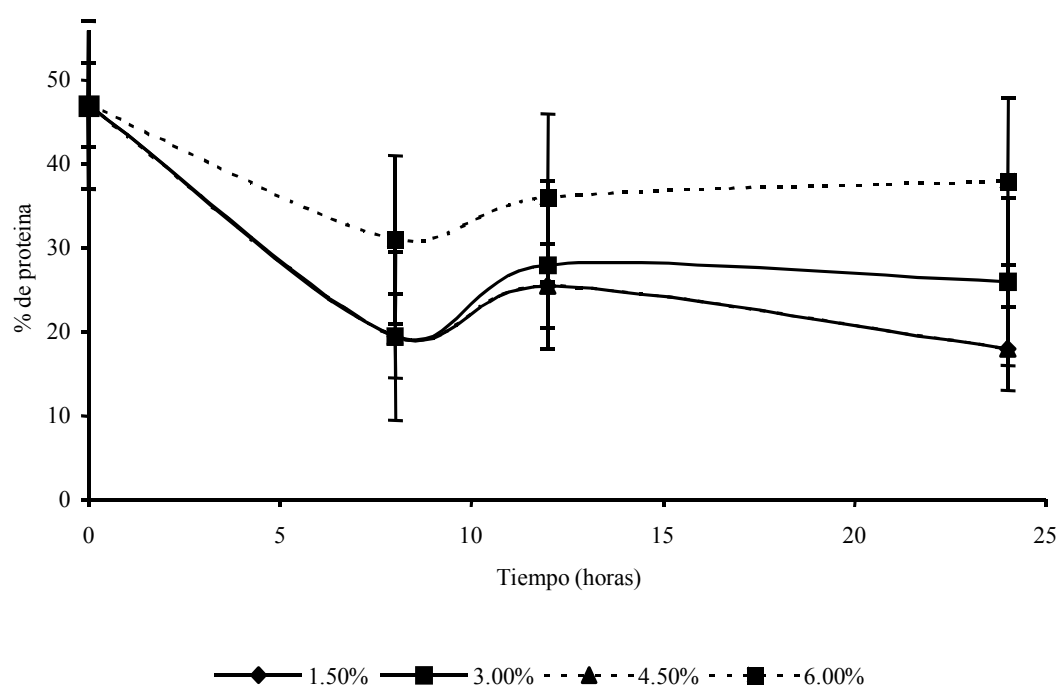


Figura 36. Porcentaje de proteína en la desmineralización de residuos de cangrejo azul empleando diferentes porcentajes de ácido acético 1N.

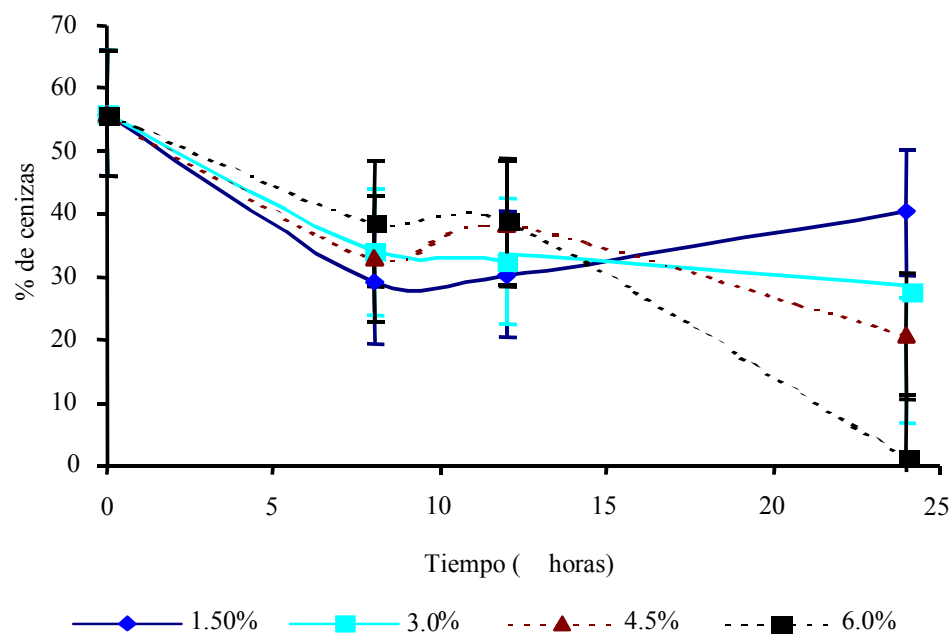


Figura 37. Porcentaje de cenizas en la desmineralización de residuos de cangrejo azul empleando diferentes porcentajes de ácido acético 1N.

La Tabla 21 muestra los valores medios obtenidos en el proceso de desproteínización-desmineralización.

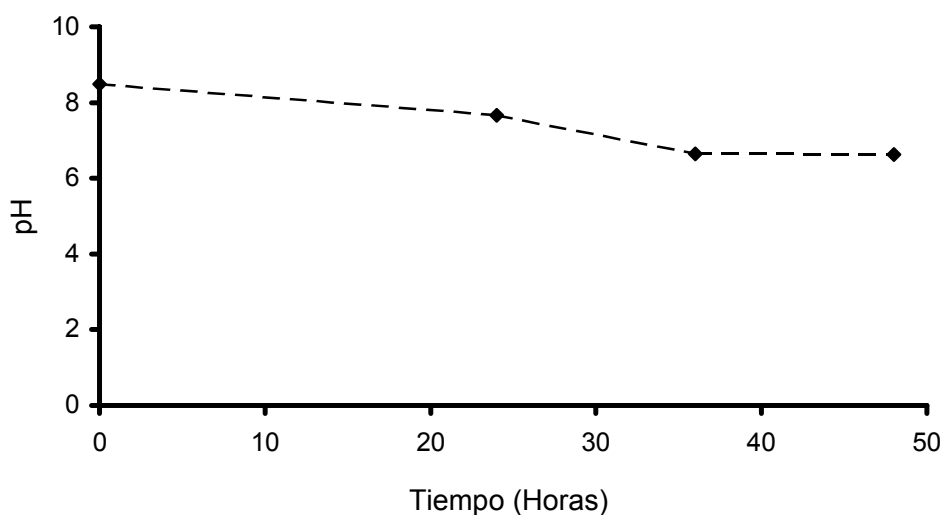
Tabla 21. Valores medios obtenidos en la descalcificación-desmineralización de residuos de cangrejo azul a las 24 h de tratamiento.

% CH ₃ COOH	x (cenizas) (%)	x (proteína) (%)
1.5	39.12 ± 1.04	26.52 ± 0.0
3	33.57 ± 1.5	17.24 ± 5.0
4.5	24.65 ± 4.5	18.13 ± 0.0
6	1.28 ± 0.02	38.00 ± 5.0

4.2.1.2. pH.

El descenso del pH a través del tiempo fue ineficiente, ya que debido al contenido de carbonato de calcio en el residuo se produjo un efecto de bufer el cual no permitió una acidificación eficiente. La tendencia de pH fue mantenerse en un intervalo de pH entre 6 y 8 (Figura 38). En el Anexo 9 muestra el nivel de significancia en el modelo de regresión lineal con respecto al tiempo en efecto lineal y cuadrático. Este fue significativo en el efecto lineal ($P>0.0001$) pero no en el cuadrático ($P>0.776$), con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.891. En el Anexo 10 se muestran los coeficientes de regresión.

Evers y Carrol (1996), reportan un descenso máximo de pH 7.6 en un ensilaje de desechos de cangrejo-melaza (86:14 p/v) en el día 14 utilizando una flora mixta bacteriana. Estos mismos autores (1998), ensilaron desechos de camarón-melaza (73:17 p/v) durante 40 días con una flora mixta de *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, obteniendo un



pH final de 6.7.

Figura 38. pH del residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.1.3. Proteína total.

La acidez generada por el inóculo láctico no fue suficiente para una desproteinización significativa. La disminución del contenido proteico fue de cerca de 17% a alrededor de 15% (Figura 39). Por otra parte, los efectos lineal y cuadrático en la ecuación de regresión no fueron significativos, y el coeficiente de determinación fue muy bajo ($R^2 = 0.297$) (Anexo 9). Este bajo coeficiente pudo deberse al efecto bufer de la alta cantidad de carbonato de calcio presente, que afectó la exactitud de las determinaciones. La desproteinización, sin embargo, podría mejorarse si se utilizara una proteasa o un ácido como el clorhídrico. Oh y col (2000) reportan 2% de desproteinización utilizando una proteasa del *Pseudomona aeruginosa* K-187 durante 7 días en desechos de caparazones molidos de camarón y cangrejo, frente a 45% de desproteinización en la misma materia prima utilizada tratada con ácido clorhídrico 2 N (3:8 p/v).

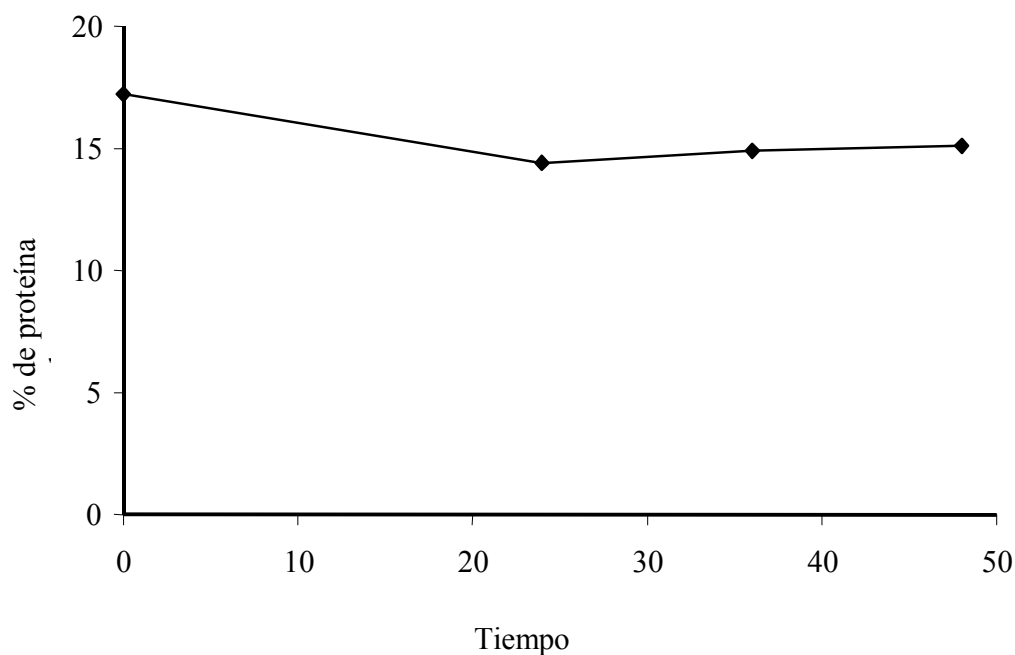


Figura 39. Contenido de proteína total en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.1.4. Cenizas.

El contenido de cenizas durante el proceso de fermentación fue únicamente de 1.14% con respecto al residuo sólido desmineralizado, posteriormente se mantuvo estable (Figura 40). Las cenizas están relacionadas con la cantidad de carbonato de calcio, principalmente. Ninguno de los efectos de tiempo, lineal y cuadrático, fueron significativos en la ecuación de regresión (Anexo 9), mostrando un coeficiente de determinación $R^2 = 0.742$.

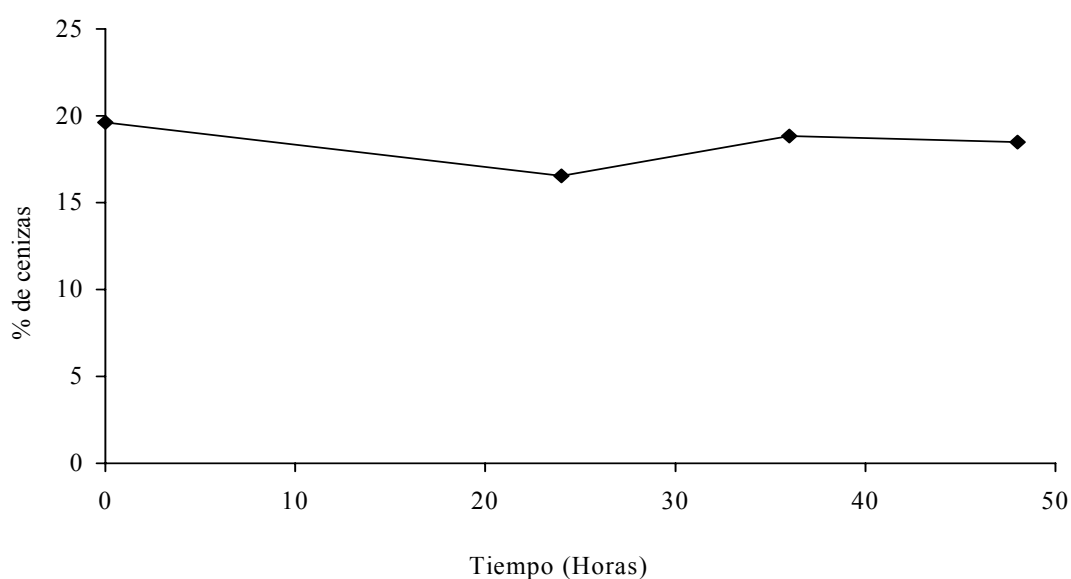


Figura 40. Contenido de cenizas en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul extraído.

4.2.1.5. Carbonato de calcio.

El contenido de carbonato de calcio se midió únicamente en los tiempos inicial y final de la fermentación, disminuyendo 29.11% (Figura 41). Aplicando una prueba t de student a estos datos, se obtuvo una diferencia significativa ($P > 0.0001$) (Anexo 11). Esto indicó que, aunque el contenido de cenizas no disminuyó en forma significativa, esto pudo deberse a otros compuestos que contribuyeron al porcentaje de cenizas, no únicamente al carbonato de calcio que sí disminuyó significativamente durante la fermentación. Los datos obtenidos, sin embargo, no concuerdan con los reportados por Rutledge (1971) que encontró menor contenido de calcio, si bien este autor estudió otras condiciones de proceso.

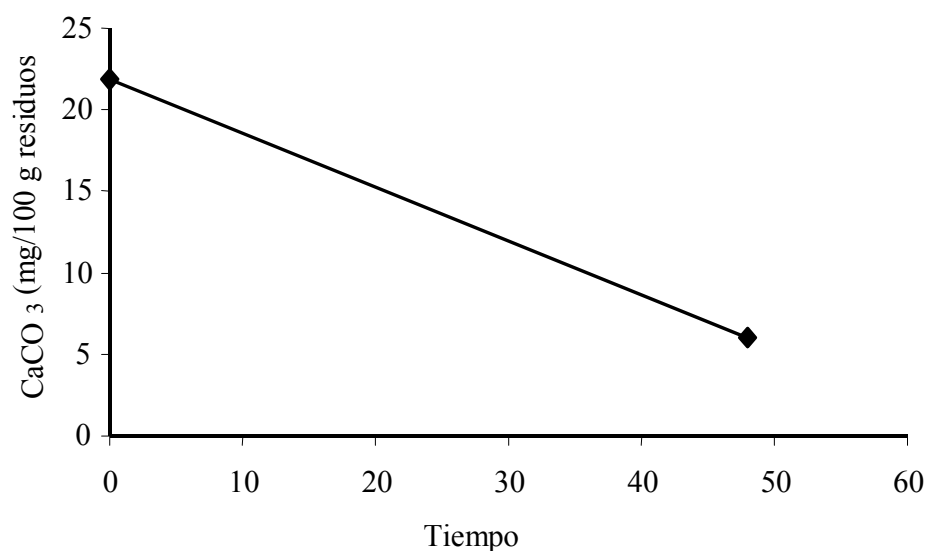


Figura 41. Contenido de carbonato de calcio en el residuo sólido de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.2. Filtrado de la fermentación.

4.2.2.1. pH

El pH en el filtrado presentó la misma tendencia del pH en el residuo sólido (Figura 42). Al igual que en el residuo sólido, el descenso poco marcado se debió al contenido de carbonato de calcio. Se encontró un efecto lineal significativo del tiempo en la ecuación de regresión ($P > 0.036$); se tuvo un alto coeficiente de determinación ($R^2 = 0.923$). Armenta (1998), reporta pH 4.21 después de 48 horas de fermentación con *Lactobacillus sp.* en residuos de camarón, sin embargo el camarón contiene menor cantidad de carbonato de calcio en comparación con el cangrejo azul.

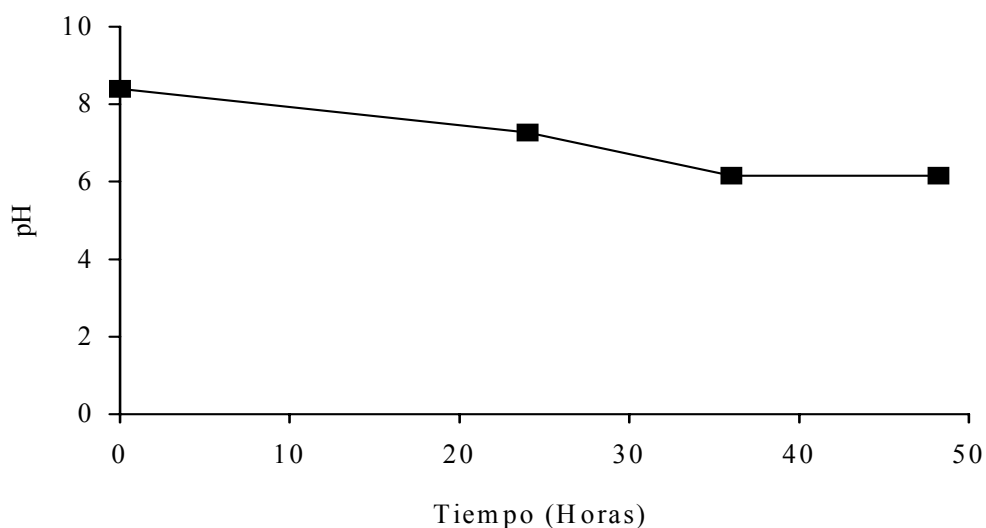


Figura 42. pH del filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.2.2. Proteína soluble.

La proteína soluble tuvo una disminución drástica a las 35 horas de iniciada la fermentación (Figura 43), lo que concordó con la disminución de pH que pudo afectar a la solubilidad de la proteína. En este caso, el efecto cuadrático de tiempo fue significativo ($P > 0.001$), no así el efecto lineal ($P > 0.108$) (Anexo 9). Cabe recordar que el pigmento está unido a una proteína, por lo que al disminuir la solubilidad de uno, disminuye la del otro, como se corrobora con la misma tendencia que se observó en la disminución de xantofilas totales (Figura 44). Armenta (1998) reportó mayor contenido de proteína soluble (4.474 mg/mL) cuando se aplicó un tratamiento enzimático en desechos de camarón con una mezcla de savinasa:neutrasa:alcalasa:esperasa que hidrolizan las proteínas al tiempo de a las 24 h de fermentación.

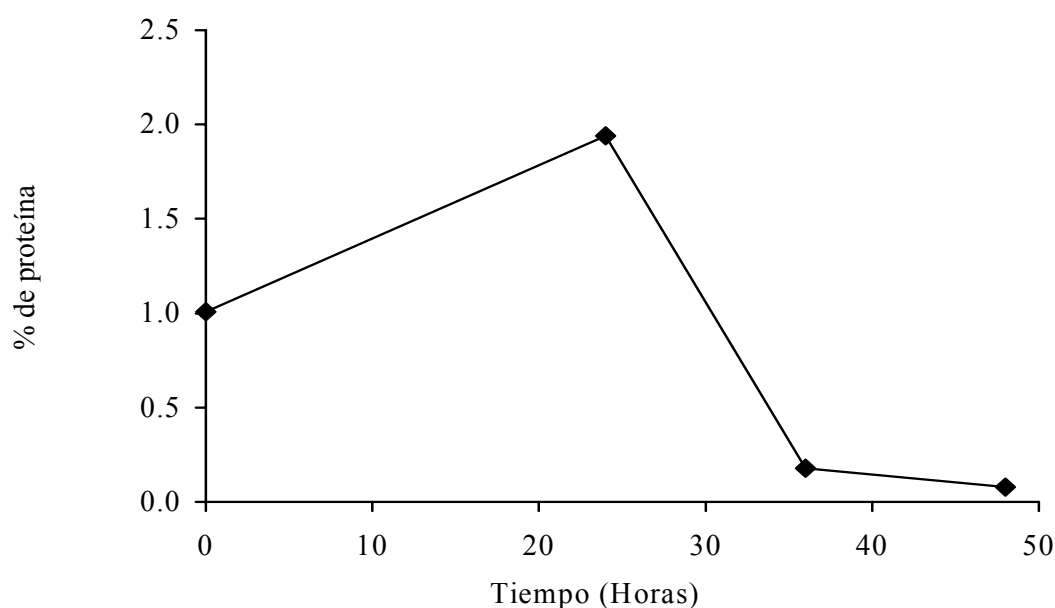


Figura 43. Contenido de proteína soluble en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.2.3. Xantofilas totales.

El contenido de xantofilas totales aumentó de las 0 a las 24 h de fermentación (Figura 44), posiblemente por liberación de las estructuras de calcio en el residuo. Sin embargo, se observó un rápido descenso del contenido de estos pigmentos de las 24 a las 48 h, como resultado de la insolubilización del complejo pigmento-proteína. Al igual que en el caso de contenido de proteína, el efecto cuadrático del tiempo en la ecuación de regresión tuvo mayor significancia ($P > 0.01$) que el efecto lineal ($P > 0.329$), aunque el coeficiente determinación fue muy bajo ($R^2 = 0.317$) (Anexo 9).

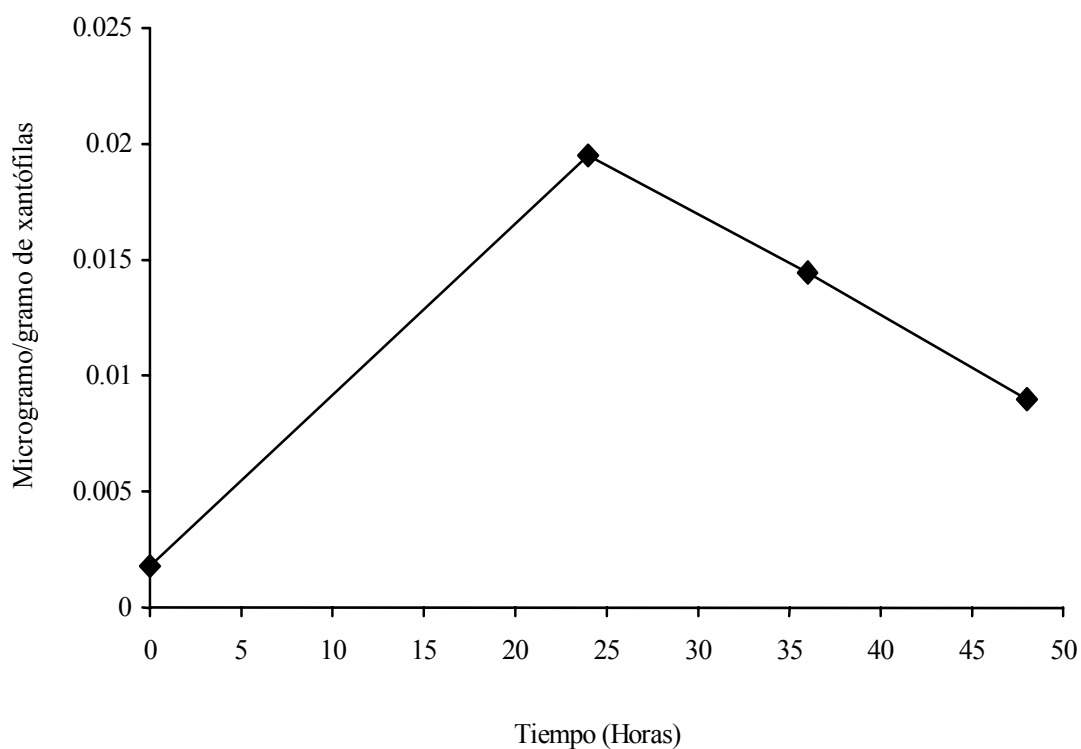


Figura 44. Contenido de xantofilas totales en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

4.2.2.4. Color.

Luminosidad.

La luminosidad aumentó durante todo el tiempo de fermentación (Figura 45) indicando que el filtrado se tornó más claro. Comparado con la disminución de xantofilas totales (Figura 45), y de proteína soluble (Figura 44), puede suponerse que el aumento de luminosidad fue un reflejo de la disminución de pigmentos en solución. Se observó un ligero efecto cuadrático ($P>0.0192$) del tiempo en la ecuación de regresión, no así un efecto lineal ($P>0.144$) (Anexo 9).

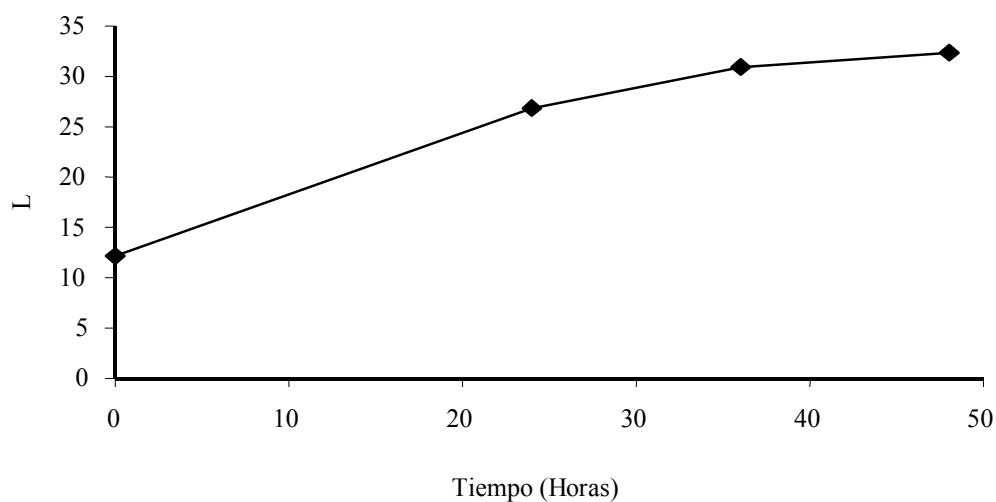


Figura 45. Luminosidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

Tonalidad.

La tonalidad fue constante a lo largo de la fermentación (Figura 46) encontrándose siempre en la región azul-morado. De esta tonalidad constante se puede concluir que la fermentación láctica de cangrejo azul no afecta el color azulado de estos residuos lo que significó que no hubo alteración de la estructura proteica, a diferencia de la extracción con solventes que hace que cambie la tonalidad de los residuos a la región de los rojos. Como era de esperarse de la graficación de resultados, se observó un efecto lineal de tiempo en la ecuación de regresión ($P>0.002$) pero no un efecto cuadrático ($P>0.890$) (Anexo 9).

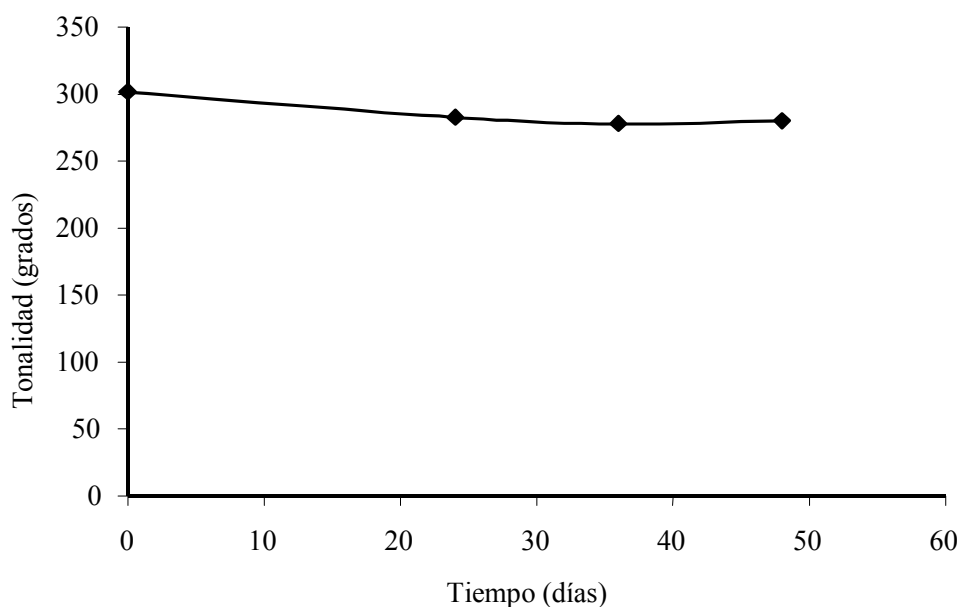


Figura 46. Tonalidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

Cromaticidad.

La cromaticidad o intensidad del color, aumentó de las 0 a las 37 h de fermentación, siendo constante posteriormente (Figura 47). En conjunto la tonalidad y la cromaticidad, indicaron que el color azul-morado no se alteró, pero si aumentó en intensidad. Se observó un ligero efecto cuadrático del tiempo en la ecuación de regresión ($P>0.068$) (Anexo 10).

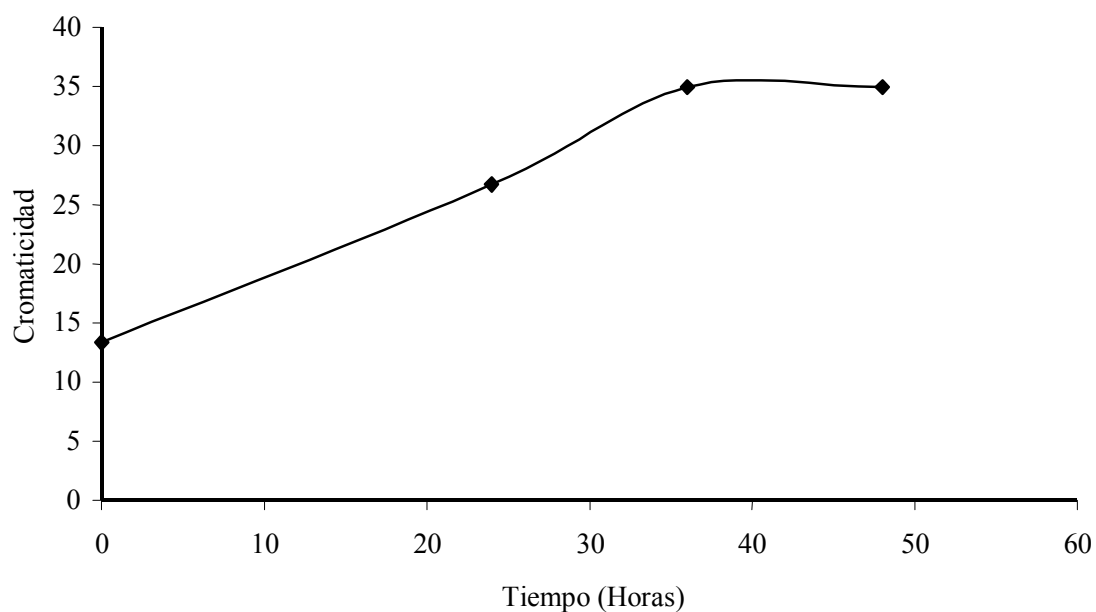


Figura 47. Cromaticidad en el filtrado de la fermentación láctica de desechos de cangrejo azul.

CONCLUSIONES

En los tratamientos con sistemas de solventes se observó mayor eficiencia de extracción en éter de petróleo/acetona/agua y agua/cloroformo/metanol, ya que estos presentaron mayor contenido de xantofilas totales extraídas, mayor luminosidad, tonalidad rojiza y mayor intensidad en dicho tono frente a los tratamientos etanol/agua y aceite de soya. Dicha tonalidad se debe al ambiente no reductor que genera un cambio hipsocrómico en el pigmento carotenoide. Además, el agua/cloroformo/metanol obtuvo mayores concentraciones de proteína en el filtrado del residuo sólido y mayor extracción de la misma a partir de los desechos de cangrejo azul debido a las diferencias en las constantes dieléctricas en los solventes aplicados. Estadísticamente, los sistemas de solventes presentaron diferencias significativas en cuanto a proteína soluble, xantofilas totales y luminosidad, pero no en cromaticidad y tonalidad. El descenso de carbonato de calcio también fue mayor en el agua/cloroformo/metanol, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los demás sistemas de solventes. El tiempo óptimo de extracción de pigmentos para el agua/cloroformo/metanol y éter de petróleo/ acetona/agua es de 12 y 18 horas respectivamente, considerando la cantidad de xantofilas extraídas.

La fermentación láctica no produjo cambios batocrómicos en el pigmento al no haber alteración de la estructura proteica o de la fracción carotenoide conservando el color azul, pero incrementándose la cantidad de xantofilas extraídas (0.3778 y 0.0195 $\mu\text{g/}$ en agua/cloroformo/metanol y fermentado láctico, respectivamente. Sin embargo, el descenso del contenido de xantofilas posterior a las 24 h fue el resultado de la insolubilización del complejo pigmento-proteína, detectado por la reducción de proteína soluble. El factor limitante en la utilización de residuos de cangrejo azul para la extracción de xantofilas es la cantidad de carbonato de calcio, a pesar de la previa desmineralización, la cual no fue suficiente para extraer eficientemente los pigmentos carotenoides.

BIBLIOGRAFIA

- Abazinge, M.D.A., Fontenot, J.P., Allen, V.G., y Flick, G.J.. 1993. Ensiling characteristics of crab waste and wheat straw treated with different additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4): 657-661.
- Adams, P.B., Passmore, W.O. 1966. Critical factors in the determination of the alkaline earth elements in glass by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*. 38(4):630.
- Akon, C.C. y Min, B.D. 1988. Food lipids. Clasificatio, nutrition and biotechnology. Mecanismos de antioxidantes. Edit. Marcel Dekker Inc. Nueva York,. Pp. 407-408.
- Akpan, E.J. 1997. Proximate composition of edible blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Food Science and Technology*, 34(1):59-60.
- Anónimo. 1956. Potential industry from lobster shells. *Fishing Gazette*, pp. 73:93-96.
- A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington, D.C. p. 1042.
- Armenta, R. 1998. Estudios sobre carotenoproteínas extraídas de residuos de camarón fermentado y no fermentado. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- Armenta, R., Guerrero, I, Huerta, S. 2002a. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*, 67(2):1002-1006.
- Armenta, R., Guerrero, I. y Lall, S. 2002b. Aminoacid composition of a carotenoprotein obtained from fermented and non-fermented shrimp wastes. 2002 IFT Annual Meeting. June 15-19, Anaheim, California. EUA.
- Asenjo, J.A. 1990. Separation Processes in Biotecnology. Marcel Dekker. Nueva York. p.115.
- Atkins, W. 1991. Fisicoquímica. Tercera edición. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware. pp. 270-275.
- Ausich, R.L. 1997. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure and Applied Chemistry*.69(10): 2169-2173.
- Badui, D. 1999. Química de los alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F. pp. 379-385.
- Barnes, R. D. 1980. Zoología de los invertebrados. Editorial Interamericana. New York. pp. 561-584.
- Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F.. y Vega, J. 2001. Preparation of crayfish chitin by *in situ* lactic acid production. *Process Biochemistry*, 37: 229-234.

- Britton, G. Wessie, R.J., Askin, D, Waburton, J.D., Gallardo-Guerrero, L., Janses, J.F., de Groot, H.J.M., Lugtenburg, J., Cornard, J-P. y Merlin, J-C. 1997. Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins. *Pure and Applied Chemistry*. 69(10):2075-2084.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfänder, P. 1998. En *Carotenoids. Biosynthesis and metabolism*. Editorial Birkhauser. Basel, Suiza. pp. 132-147
- Brouwer, M., Bonaventura, C. y Bonaventura, J. 1982. Heavy metal ion interactions with *Canellectes sapidus* hemocyanin: Structural and functional changes induced by a variety of heavy metal ions. *Biochemistry*, 21(10): 2529-2537.
- Brown, K. F. y Otwell, W. S. 1980. Crab meal production: tragic impact on the blue crab industry unless viable alternatives established. Conference on Seafood Waste Management in the 1980's; Orlando, Florida; 1980. Florida Sea Grant College; Gainesville, Florida. Febrero 1980, pp. 280-284.
- Careri, M., Elviri, L. y Mangia, A. 1999. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of β -carotene and xanthophylls validation of the analytical method. *Journal of Chromatography*, A(854): 233-244.
- Castenmiller, J. J. M. y West, C. E. 1997. Bioavailability of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 69(10): 2145-2150.
- Cathart, T..P., Lipton, D. W. y Swartz, D. G. 1984. Composting blue crab processing waste. University of Maryland, College Park. Publicación UM-SG-TS-84-01. pp. 1-20.
- Cato, J.C. 1992. Composting and using by-products from blue crab and calico scallop processing plants in Florida. Florida Sea Grant Program. pp. 78.
- Charley, H. 1987. Tecnología de Alimentos. Editorial LIMUSA. México, D.F. pp. 608-185.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, 47: 892-900.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. 1983. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement astaxanthin pigment extraction. *Journal of Food Science*, 48:1516-1521.
- Chew-Boon-P, Park-Jean-S., Wong-Mun-W. y Wong-T.S. 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Research*, 19(3): 1849-1854.
- Dean, J. C., Nielsen, L. A., Helfrich, L. A. y Garling, D. L. 1992. Replacing fishmeal with seafood processing wastes in channel catfish diets. *Progressive Fish-Culturist*, 54(1): 7-13.
- Den Berg, H.V., Faulks, R., Granado, H. Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. y Stahl, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5): 880-912.

- Deuchi, K, Kanauchi, O, Shizukuishi, M, y Kobayashi, E. 1995. Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience and Biotechnological Biochemistry*, 59(7): 1211-1216.
- Dillard, C.J. y German, J.B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1744-1756.
- Diplock, A.T. 1992. The protective roles of antioxidant nutrients in disease prevention. *Vitamin Nutrition Information Service Backgrounder*, 3 (1): 1-11.
- DuPaul, W. D. 1985. The development of an export market for soft crabs: Japan. National Symposium on the Soft-Shelled Blue Crab Fishery, Sea Grant, Florida. Febrero 12-13. pp. 71-75.
- Evers, D. J. y Carroll, D. J. 1996. Preservation of crab or shrimp waste as silage for cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 59:233-244.
- Evers, D. y Carroll, D. 1998. Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 71:241-249.
- FAO, 2000. Producción mundial pesquera por captura y acuicultura, por país. <http://www.ftp.fao.org/fi/stat/summco/aic.pdf>.
- Fennema, O.R. 2001. Principles of Food Science. Food Chemistry. Parte 1. Marcel Dekker Inc. Nueva York. pp. 417-421.
- Francis, F.J. 1999. Colorants. Eagan Press Handbook Series. American Association of Color Chemist. St. Paul, Minnesota.
- Freeman, J.A. y Perry, H.M. 1984. Recent progress in the production of the soft-shell blue crab (*Callinectes sapidus*). National Symposium on the Soft-Shelled Blue Crab Fishery. Sea Grant Florida, Febrero 12-13. pp. 147-151.
- Foss, O., Storebakken, T., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S. y Mainz, U. 1987. Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. *Aquaculture*, 10: 324-328.
- García, D.J. 1998. Omega-3 long chain-nutraceuticals. *Food Technology*, 52(6): 45-49.
- Gates, K.W. y Parker, A. H. 1992. Characterization of minced meat extracted from blue crab picking plant by-products. *Journal of Food Science*, 57(2): 267-292.
- Georgiew Lalov I., Illiev Guerginov I., Asenova Kristeva, M. y Fartsov K. 2000. Treatment of waste water from distilleries with chitosan. *Water Research*, 34 (5):1503-1506.
- Gilchrist, B.M. y Lee, W. L. 1972. Carotenoid pigments and their possible role in reproduction in the sand crab, *Emerita analoga* (Simpson, 1857). *Compendium of Biochemical Physiology*, 42B: 263-294.

- Gildberg, A. y Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36: 809-812.
- Gornall, A.J, Bardawill, C.J. y David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177:751-766.
- Guillou, A., Choubert, G., De la Noue, J. 1993. Separation and determination of carotenoids, retinol, retinal and their dehydro forms by isocratic reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*, 476:93-99.
- Hall, G.M. y De Silva, S. 1991. Lactic Acid Fermentation of shrimp (*Penaeus monodon*) waste from chitin recovery. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science. Princeton, Nueva Jersey. pp. 633-638.
- Hendry, G. A. F. y Houghton, J. D. 1996. Natural food colorants. Editorial AVI. Londres, Inglaterra. pp. 1-141.
- Herskovits, T.T., Erhunmwunsee, L.J., San George, R. y Herp, A. 1981. Subunit structure and dissociation of *Canallectes sapidus* hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 667:44-58.
- Hinostroza, G. C., Huberman, A., de la Lanza, G. y Monroy-Ruiz, J. 1997. Pigmentation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with oil-extracted astaxanthin from the langostilla (*Pleuroncodes planipes*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 4(3): 237-241.
- Horst, M. N. 1990. Concurrent protein synthesis is required for *in vivo* chitin synthesis in postmolt blue crabs. *The Journal of Experimental Zoology*, 256:242-254.
- <http://www.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/bluecrab.html>. Marine science. An information/Education Series from Marine Resources Division. South Carolina Department Division.
- <http://www.oaxaca.gob.mx>. Oaxaca. Pesca. Secretaría de Desarrollo Industrial y Comercial. Consejo Estatal de Pesca, Población Pesquera, Proyectos de Inversión en Acuicultura.
- <http://www.ssa.gob.mx/nom/038ssa13.html>. Norma Oficial Mexicana. NOM-001-SSA1-1993, Bienes y Servicios.
- Hugles, C. 1984. Guía de aditivos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. P. 69.
- Katsuyama, M., Komori, T. y Matsuno, T. 1987. Metabolism of three stereoisomers of astaxanthin in the fish rainbow trout and tilapia. *Comparative Biochemistry Physiology*, 86B(1): 1-5.
- Krantz, G.E. 1983. Report of the acting administrator, Fisheries Administration, Maryland. Department of Natural Resources. Annapolis, Maryland.

- Kritchevsky, S. B. 1999. Beta-carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *Journal of Nutrition*, 129(1):5-8.
- Liaaen-Jensen, S. y Storebakken, T. 1988. The pigmentation of salmonids 1: carotenoids. F. Hoffman-La Roche Brochures. Basel, Suiza. pp. 8.
- Lim, C. y Sessa, D.J. 1995. Nutrition and utilization technology in aquaculture. Capítulo 21. Further utilization of seafood discards. Editorial AOCS. Champaigne, Illinois. pp. 279.
- Little, A.C. 1975. Off on a tangent. *Journal of Food Science*, 40:410-411.
- Ikan, R. 1991. Natural products. A Laboratory Guide. Academic Press. San Diego, California. pp. 105.
- Manu-Tawiah, W. y Haard, N.F. 1987. Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab *Chionocetes opilio*. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 20(1): 31-33.
- Mayer, J., Wiley, B., Henderson, K. y Kaplan, D. 1989. Physical properties of film produced from the biopolymer pullulan and chitosan produced by *Aureobasidium pullulans* and *mucor rouzzi*: Oxygen permeability, tensile strength, etc. Annual Meeting of the American Society for Microbiology: Washington, D.C.
- Mc Coy, M. 1999. Astaxanthin market. A hard one to crack. *Chemical and Engineering News*, 77 (4): 15-17.
- Meglitch, P.A. 1985. Invertebrate zoology. Oxford University Press. Tercera. Edición. Nueva York, N.Y. Pp. 454.
- Merck, 1980. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 9ª. Edición. Merck Company Inc. Cambridge, Massachusetts. pp. 156-186.
- Meyers, P.S. y Bligh, D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 29:505-508.
- Millikin, M. R. y Williams, A.B. 1984. Synopsis of biological data on the blue crab. *Canallectes sapidus* Rathbun. FAO Fisheries Synopsis No. 138, NOAA Technical Report 51: 1-38.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutiérrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L. y Mínguez-Mosquera, M.I. 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*, 114(2): 223-229.
- Muzarelli R. A. A. 1977. Chitin. Pergamon Press. Nueva York. pp. 23-31.
- Négre-Sadargues, G., Castillo, R. y Segonzac, M. 2000. Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic ridge. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A (127): 293-300.

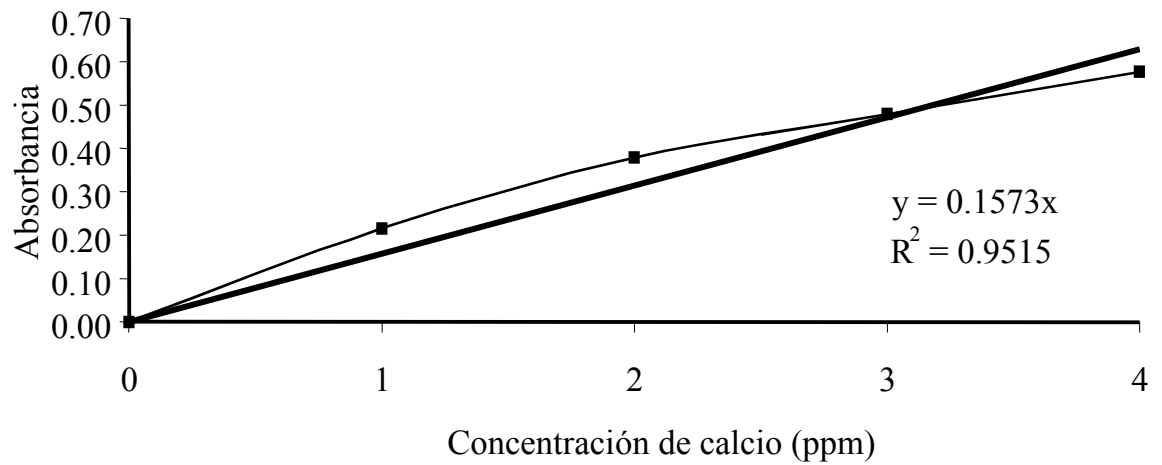
- Nettles, D.L. 2002. Evaluation of chitosan as cell scaffolding material for cartilage tissue engineering. Transaction of the 47th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Francisco, California. Febrero 25-27, 2001.
- Oesterling, M. J. 1998. Blue crab resources in other countries: Implications for the U.S. industry. Journal of Shellfish Research, 17(2): 375-378.
- Oh, Y-S., Shih, I-L., Tzeng Y-M y Wang, S-L. 2000. Protease produced by *Pseudomona aeruginosa* K-187 and its application in the desproteinization of shrimp and crab shell waste. Enzyme and Microbial Technology, 27:3-10.
- Otwell, W. S. y Koburger, J. A. 1985. Microbial and nutritional attributes of soft crabs. Technical Paper No. 5. Project No. SGEP-8. Department of Food Science and Human Nutrition. Universidad de Florida. Gainesville, Florida. pp.1-6.
- Pérez-Alvarez, J, Fernández, J., y Sayas, E. 2000. Fundamentos físicos, químicos, ultraestructurales y tecnológicos en el color de la carne. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. M. Rosmini, J. Pérez, J. Fernández. Editores Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España, pp. 51-71.
- Rich, J. R. y Hodge, C. H. 1991. Utilization of blue crab by-products compost to suppress *Meloidogyne javanica* on tomato. Proceedings of the 1991 Fisheries By-product Composting Conference, Madison, Wisconsin. pp. 141-146.
- Rodríguez-Amaya D.B.1999. A guide to carotenoid analysis in foods. pp. 51-53.
- Rutledge, J.E. 1971. Decalcification of crustacean meals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 19(2): 336-337.
- SAGARPA. 2000. Anuario de Producción Pesquera. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/integra/Anuarios/indexanest2.html>.
- Saito, A. y Regier, L. W. 1971. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 28(4):509-512.
- Schultz, G.A. 1969. How to know the marine isopod crustaceans. Capítulo: Phylum Arthropod. M.C. Brown Company Publisher. Nueva York. pp. 2-3.
- Scopes, K. 1994. Protein purification. Editorial Springer-Verlag. Nueva York, E.U.A. pp. 70-100.
- SEMARNAP, 1998. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Pecuarios. Producción Pesquera y Acuicultura. <http://www.semarnap.gob.mx>.
- Shahidi, F. y Botta, F. 1994. Seafoods. Chemistry. Processing, Technology and quality. Seafood processing by-products. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Escocia. pp. 322-323.

- Shahidi, F., Metusalach, C. y Brown, J. A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and acuaculture. *Critical Reviews in Food Science*,. 38(1): 50-67.
- Shahidi, F. y Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Panadus borealis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39: 1527-1532.
- Simpson, K. L. 1978. The recovery of protein, and pigments from shrimp and crab meals and their use in salmonid pigmentation. Proceeding of the first International Conference on Chitin and Chitosan. R.A.A. Muzzarelli, y E.R. Ponias Editores. Brest, Francia. pp. 253-262.
- Simpson, B. K., Gagné, N., Ashie, I. N.A., y Noroozi, E. 1997. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, 11(1): 25-44.
- Simpson, B. K. y Haard, N. F. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp waste. *Journal of Applied Biochemistry*, 7(B): 212-213.
- Spinelli, J. y Mahnken. C. 1978. Carotenoid deposition in pen-reared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Aquaculture*, 13: 213-223.
- Storebakken, T. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 100: 209-229.
- Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. Cuarta edición. Volumén I. Editorial Reverté S.A. México, D.F. pp.17-41.
- Torrinsen, O., Tideman, E., Hansen, F. y Raa, J. 1981. Ensiling in acid- a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 26:77-83.
- Torrinsen, O., Hardy, R. y Shearer, K. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoids deposition and metabolism. *Critical Reviews in Aquatic Science*, 1(2): 209-276.
- Varian, 1979. *Analytical Methods for flame spectroscopy*. Varian Techtrum PTY LTD. Publicación úmero 35-100009-00 Bohemia, Nueva York. pp. 9.
- Velez, S. A., Allen, J. C, Kerry, C. M. y Adkinson, R. W. 1991. Evaluation of crab and crawfish waste as protein sources for growing dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 74(1): 234-242.
- Warner, G.F. 1977. *The Biology of Crabs*. Van Nostram Reinhold Company, Nueva York. pp. 2-10.
- Weiner, M.L. 1991. An overview of the regulatory status and the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. En: *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science. Princeton, Nueva Jersey. pp. 663-672.

- Williams, A.B 1974. The swimming crabs of the Genus *Canellectes* (Decapoda: *Portunidae*). Fishery Bulletin U.S., 72: 685-798.
- Wong, D.W.S. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. Van Nostrand Reinhold. Nueva York. pp. 147-159.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M. y Wang,, S.L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology, 88B(26): 406-413.
- Yuan, J-P y Chen, F. 1999. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers in orgánic solvents. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 47:3656-3660.
- Yuan, J-P y Chen, F. 2001. Kinetics for the reversible isomeratization reaction of *trans*-astaxanthin. Food Chemistry, 73: 131-137.
- Zakaria, Z., Hall, G.M. y Shama, G. 1998. Lactic acid fermentation of scampi waste in rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry, 33(1): 1-6.
- Zollinger, H. 1991. Color Chemistry. Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. Editorial VCH. Munich, Alemania. pp. 52-56.

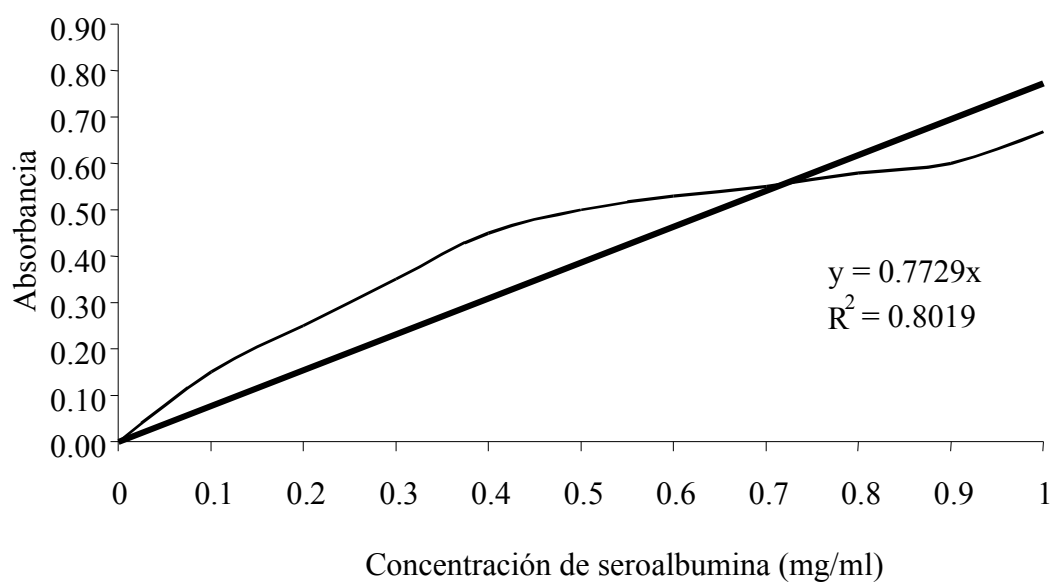
ANEXO 1

Curva de calibración para la determinación de calcio por espectrofotetría de absorción atómica.



ANEXO 2

Determinación de proteína soluble por el método de biuret (Gornall y col, 1949)



Reactivo de biuret:

1. 1.5 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 500 mL de agua destilada, al que se añaden 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratados.
2. 300 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%.
3. Ambas soluciones se mezclan y aforan a 1000 mL con agua destilada.
4. Se almacena en frascos ámbar.
5. Se utiliza una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

ANEXO 3

Extracción con disolventes: Análisis de Varianza.

Variable de Respuesta	P> (modelo)	grados de libertad	R ²	CV	P>		
					tratamiento	tiempo	trat x tiempo
<u>Residuo</u>							
pH	0.0001	32	0.9991	0.863	0.0001	0.0299	0.0727
Proteína total	0.0001	32	0.9977	6.953	0.0001	0.0001	0.0001
Lípidos	0.0001	32	0.9977	6.953	0.0001	0.0001	0.0001
Cenizas	0.0001	32	0.9885	2.192	0.0001	0.0001	0.0001
<u>Filtrado</u>							
pH	0.0001	32	0.991	3.462	0.0001	0.2121	0.0185
Proteína soluble	0.0001	32	0.9734	28.067	0.0001	0.0001	0.0001
Xantofilas totales	0.0001	32	0.6897	63.373	0.0001	0.606	0.464
Luminosidad	0.0001	32	0.8417	24.595	0.0001	0.0397	0.01
Tonalidad	0.0001	32	0.9940	7.733	0.0001	0.8011	0.0981
Cromaticidad	0.0001	32	0.9650	16.675	0.0001	0.0101	0.0373

ANEXO 4

Extracción con disolventes: Comparación múltiple de medias de Duncan: Sistemas de disolventes.

Variable de Respuesta	Sistema de solventes*			
	ACM**	EAA	EA	SOYA
<u>Residuo</u>				
pH	9.178 ^a	8.501 ^b	8.675 ^a	9.269 ^a
Proteína total (%)	1.35 ^b	9.43 ^b	2.93 ^b	26.72 ^a
Lípidos (%)	2.408 ^b	0.0 ^c	1.328 ^b	21.334 ^a
Cenizas (%)	37.799 ^b	38.533 ^b	38.005 ^b	39.973 ^a
<u>Filtrado</u>				
pH	9.393 ^a	8.531 ^b	9.651 ^c	4.685 ^d
Proteína soluble (%)	2.9 ^d	0.3 ^a	1.2 ^b	2.43 ^c
Xantofilas totales (µg/g)	0.4788 ^a	0.2147 ^b	0.0433 ^c	0.0062 ^c
Luminosidad	9.026 ^a	18.010 ^a	11.268 ^a	5.678 ^b
Tonalidad (grados)	63.71 ^b	53.96 ^b	249.79 ^a	74.13 ^b
Cromaticidad	8.603 ^b	22.936 ^a	5.902 ^b	6.323 ^b

* Sistema de solventes: ACM - agua/cloroformo/metanol; EAA - éter de petróleo/acetona/agua; EA - etanol/agua; SOYA - aceite de soya

** valores medios

a, b, c superíndices iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencia significativa

ANEXO 5

Extracción con disolventes. Comparación múltiple de medias de Duncan: Tiempo de extracción

Variable de respuesta	Tiempo (horas)			
	6 *	12	18	24
<u>Residuo</u>				
pH	7.701 ^a	7.637 ^a	7.531 ^a	7.755 ^a
Proteína total (%)	8.5 ^a	6.9 ^a	6.6 ^a	18.3 ^b
Lípidos (%)	6.037 ^a	5.658 ^a	6.854 ^a	6.523 ^a
Cenizas (%)	41.985 ^a	35.393 ^b	41.492 ^a	35.44 ^b
<u>Filtrado</u>				
pH	8.022 ^a	8.054 ^{a,b}	8.074 ^{a,b}	8.110 ^b
Proteína soluble (%)	3.69 ^a	3.24 ^b	3.04 ^b	3.37 ^{a,b}
Xantofilas totales (µg/g)	0.241 ^a	0.248 ^a	0.187 ^a	0.265 ^a
Luminosidad	9.453 ^a	10.606 ^{a,b}	11.154 ^{a,b}	12.769 ^b
Tonalidad (grados)	128.57 ^a	129.57 ^a	125.35 ^a	128.1 ^a
Cromaticidad	8.309 ^a	12.104 ^{b,c}	9.807 ^{a,b}	13.545 ^c

* - valores medios

a, b, c – superíndices iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencia significativa

ANEXO 6

Extracción con disolventes. Análisis de Varianza: Contenido de calcio.

Variable de Respuesta	P> (modelo)	grados de libertad	R ²	CV	P>		
					tratamiento	tiempo	trat x tiempo
Contenido de Calcio (mg/100 g)	0.0001	13	0.998	0.334	0.0001	0.0001	0.0001

ANEXO 7

Extracción con disolventes. Comparación múltiple de medias de Duncan: contenido de calcio (sistemas de disolventes)

Variable de Respuesta	Sistema de solventes*			
	ACM**	EAA	EA	SOYA
<u>Residuo</u>				
Contenido de calcio (mg/100g)	318.175 ^a	313.198 ^a	304.500 ^b	298.197 ^b

* Sistema de solventes: ACM - agua/cloroformo/metanol; EAA - éter de petróleo/acetona/agua; EA - etanol/agua; SOYA - aceite de soya

** valores medios

a, b, c superíndices iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencia significativa

ANEXO 8

Extracción con disolventes. Comparación múltiple de medias de Duncan: contenido de calcio (etapa de extracción)

Variable de respuesta	Etapa	
	inicial	final
<u>Residuo</u>		
Contenido de calcio (mg/100g)	614.500 ^a	13.213 ^b

* - valores medios

a, b, c – superíndices iguales en el mismo renglón indican
que no hay diferencia significativa

ANEXO 9

Fermentación láctica. Regresión lineal.

Variable	P>	R ²	P>	
			tiempo	(tiempo) ²
<u>Residuo</u>				
pH	0.0001	0.891	0.0001	0.7760
Proteína total	0.2041	0.297	0.1530	0.2690
Cenizas	0.0070	0.742	0.610 0	0.8130
<u>Filtrado</u>				
pH	0.0001	0.923	0.0001	0.0360
Proteína soluble	0.0270	0.549	0.1080	0.0010
Xantofilas	0.1780	0.317	0.3290	0.0010
Luminosidad	0.0290	0.542	0.1440	0.0192
Tonalidad	0.0073	0.664	0.0020	0.8900
Cromaticidad	0.0695	0.447	0.1160	0.0680

ANEXO 10

Fermentación láctica. Regresión lineal: coeficientes de regresión

$$\text{Modelo: } Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{tiempo}) + \beta_{11}(\text{Tiempo})^2$$

Variable de respuesta	β_0	β_1	β_{11}
<u>Residuo</u>			
pH	8.5710	-0.0414	-0.0001
Proteína total	17.470	-0.1770	0.0001
Cenizas	17.736	-0.1670	0.0023
<u>Filtrado</u>			
pH	8.2102	-0.0083	-0.0006
Proteína soluble	0.8091	0.0705	-0.0019
Xantofilas	-0.0072	0.00613	-0.00011
Luminosidad	16.496	1.0359	-0.0190
Cromaticidad	4.368	0.318	-0.0054
Tonalidad	283.165	-0.233	-0.00061

ANEXO 11

Fermentación láctica. Prueba t de student: contenido de calcio.

Variable de	P>	grados de	R ²	CV	P>
-------------	----	-----------	----------------	----	----

Respuesta	(modelo)	libertad	tiempo		
Contenido de Calcio	0.0001	4	0.997	0.633	0.0001