

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA**

**EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE RESIDUOS
DE CAMARÓN ENSILADOS POR MÉTODOS ÁCIDO Y
BACTERIANO**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A
MIRIAM ELIZABETH FRANCO ZAVALETA**

**Directora
Dra. Isabel Guerrero Legarreta**

Noviembre, 2010

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

México D.F. a 30 de Noviembre del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Extracción de astaxantina a partir de residuos de
camarón ensilados por métodos ácido y bacteriano

que presentó

Miriam Elizabeth Franco Zavaleta

Directora de la tesis

Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado del examen

Presidente: Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López
Instituto Politécnico Nacional

Secretaria: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: Dra. Araceli Tomasini Campocosío
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DEDICATORIAS

A Dios...que siempre ha estado conmigo, por darme la salud, conocimiento y perseverancia para concluir una meta más en mi vida.

A mis adorados hijos Mildred y Ricardo, quienes son la luz de mi vida, por su comprensión y paciencia y el limitado tiempo que pude dedicarles durante el desarrollo de esta tesis.

A mi amado esposo, porque a pesar de las desveladas estabas ahí, ayudándome en todo, y cuando me sentía vencida me animabas a continuar, por muy difícil que fueran las cosas, siempre buscando alternativas, pero sobre todo, por el amor que me has dado.

A mis queridos padres, María Luisa y Adolfo (q.e.p.d.), a quienes siempre he admirado por su esfuerzo y lucha, siempre brindándome su cariño y apoyo, pero principalmente por haberme dado la oportunidad de vivir.

De manera especial quiero dedicar este trabajo a mi padre, quien para mi fue ejemplo de honestidad y sabiduría, además sembró en mi el espíritu de superación y estudio, y a pesar de que hoy ya no está físicamente, donde quiera que se encuentre, él estaría orgulloso de mí, enviándome sus bendiciones.

A mi hermana Idalia, por su comprensión y apoyo en momentos difíciles que hemos pasado.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta, quien es ejemplo de dedicación y entrega al trabajo, porque me brindó sus conocimientos y la oportunidad de realizar este trabajo, pero sobre todo por su amistad y apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Autónoma Metropolitana, porque una vez más me abrió sus puertas para continuar este camino profesional.

Al CONACYT, por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo experimental.

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han estado conmigo de manera personal y profesional en la elaboración y desarrollo de esta tesis. Mis más sinceros agradecimientos a:

Dra. Isabel Guerrero Legarreta, por haber tenido confianza en mí y aceptarme en su grupo de trabajo, por su dirección, apoyo y consejo tanto en el ámbito científico como personal.

Dr. Gustavo Gutiérrez López, por su asesoría y acertadas correcciones y el tiempo dedicado durante el desarrollo de esta tesis.

Dra Edith Ponce Alquicira, por su ayuda en el manejo de equipos y disipar mis dudas en todo momento y por sus acertadas correcciones a este trabajo experimental.

Dra. Araceli Tomasini, por su valiosa ayuda en el uso del HPLC y dedicarme tiempo para ese análisis, y también por sus valiosos comentarios a esta tesis.

Dr. Sergio Huerta, por sus valiosas correcciones y comentarios a este trabajo experimental.

Aquellas personas que no solo me ayudaron y convivieron conmigo en el laboratorio, sino que también forjaron lazos de amistad que perdurarán aún después de terminada esta etapa de mi vida, Elvia, Raquel y Jarumi. También sin olvidar a los demás compañeros: Bacy, Isadora, Yeny, Violeta, Rosy, Vicente, Rodrigo, Ruth.

A mis familiares, parte importante de mi vida: mis queridas tías Liduvina y Oliva, mis primos Damaris, Iran, Martín, Ivan, Israel, Ana y Sally. Sin olvidar a mis entrañables cuñadas Martha, Faby, Betty y Lilia, porque todos ellos siempre me han brindado su cariño y apoyado incondicionalmente.

A mis queridas amigas Lucero y Adriana, porque hemos compartido buenos y malos ratos, pero a pesar del tiempo y la distancia nuestra amistad perdura.

A todos mis profesores durante mi formación académica, que contribuyeron con sus conocimientos y enseñanzas, despertando en mí el interés por las ciencias biológicas.

RESUMEN

El crecimiento de la industria camaronera ha generado gran cantidad de desechos, principalmente la cabeza y caparazón, que no son aprovechados y representan un grave problema de contaminación. El pigmento carotenoides más abundante en los desechos de camarón es la astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno 4,4'-diona), utilizada en la dieta de salmónidos para lograr el tinte rojo-rosado que distingue a estas especies. El ensilado ácido es un proceso previo a la extracción del pigmento, aumentando la conservación del material debido a la acción de ácidos que son adicionados en forma química o producidos por vía microbiana, promoviendo la disminución del pH a niveles suficientemente bajos para evitar el crecimiento de microorganismos no deseables.

El objetivo de esta tesis fue determinar la eficiencia en la extracción de astaxantina a partir de desechos de camarón sujetos a ensilados ácido y bacteriano, así como la cuantificación del pigmento en dichos ensilados. Se estudió también el efecto de los factores ambientales (luz, temperatura y disponibilidad de oxígeno) en la estabilidad de la astaxantina en dos sistemas modelo y en una pasta cárnica simple. Este trabajo se enmarca en el contexto de los procesos de separación en Biotecnología.

La presente tesis fue dividida en tres secciones: en la etapa I se determinaron las condiciones óptimas del ensilado químico y bacteriano en desechos de camarón del Golfo de México (*Litopenaeus aztecus*, camarón café). Para el ensilado químico se probaron tres ácidos (fórmico, acético, propiónico) y sus combinaciones en diferentes concentraciones; se seleccionaron las mezclas más eficientes en la reducción del pH y rendimiento de astaxantina. Estas mezclas fueron ácidos 4%fórmico:4%acético y 4%fórmico:4%propiónico (v/p), las cuales se aplicaron en los desechos logrando disminución de pH de 8.5 a 4.28 (FA) y 4.40 (FP). En el ensilado bacteriano los desechos fueron adicionados con un inóculo de *Pediococcus pentosaceus* (5% v/p) y dextrosa (10%), observándose una disminución de pH de 8.32 a 4.84. Para seleccionar el método de extracción más eficiente, ambos ensilados acidificados fueron sometidos simultáneamente a dos procesos secuenciados: 1) extracción previa del pigmento con una mezcla de disolventes (éter de petróleo:acetona:agua, 15:75:10), seguida por centrifugación (secuencia EC); 2) centrifugación del sustrato y posterior extracción con el sistema de solventes (secuencia CE). En ambos casos se obtuvo un residuo sólido y un licor. Tanto en los ensilados como en sus fracciones se analizó el contenido de cenizas, proteína total y lípidos. La concentración del pigmento fue analizada espectrofotométricamente y determinada como xantofilas totales; asimismo, la astaxantina fue analizada y cuantificada por cromatografía

de líquidos. Durante el proceso de ensilado químico las sales de calcio fueron parcialmente disueltas debido a la acción de los ácidos, disminuyendo el contenido de cenizas con respecto a los residuos frescos (5.5% en EC y 12.7% en CE, en ensilado con ácidos fórmico-acético; 12.6% en EC y 14.6% en CE en el ensilado con ácidos fórmico-propiónico), encontrando diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las fracciones pero no entre las formulaciones. La concentración de proteínas disminuyó no significativamente ($P > 0.01$), ni entre las fracciones ni entre las formulaciones (2.2 y 3.07% con ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico, respectivamente). La concentración de lípidos disminuyó significativamente en los ensilados con respecto al residuo fresco (72 y 19 % en EC y CE con ácido fórmico:acético, y 65.5 y 40% en EC y CE con ácidos fórmico:propiónico) ($P < 0.001$). En el ensilado bacteriano el contenido de cenizas disminuyó, con respecto a los residuos frescos, en ambas secuencias de proceso sin diferencias significativas entre ambos (30%) ($P > 0.01$), al igual que la concentración de proteínas (7%); se encontraron diferencias significativas entre las fracciones con respecto al contenido de cenizas ($P < 0.001$) pero no en la concentración de proteínas ($P > 0.01$). El contenido de lípidos disminuyó significativamente en la secuencia EC (69.1% con 1.88 g/100 g) que en la secuencia CE (1.15% con 6.03 g/100 g) con respecto a los residuos frescos ($P < 0.001$). La mayor concentración de xantofilas totales se obtuvo en el licor del ensilado químico en la secuencia centrifugación-extracción, donde se incrementó la concentración en 30.6 y 23.7% en los residuos tratados con mezclas de ácidos fórmico:acético y fórmico:propiónico, respectivamente, con respecto al residuo fresco, sin encontrar diferencias significativas entre las formulaciones ($P > 0.01$). De igual forma, la mayor concentración de astaxantina se encontró en el licor del ensilado químico, en la misma secuencia CE (7.72 E-03 mg/mL de licor), mientras que en el ensilado bacteriano empleando la misma secuencia CE la concentración de astaxantina en el licor fue de 5.58 E-03 mg/mL. Se concluyó que durante el ensilado ácido la astaxantina no sufrió oxidación. Asimismo, se observó un incremento en la concentración, tanto de xantofilas totales como de astaxantina, debido a que en el ensilado previo a la extracción se hidrolizó el complejo carotenoproteína, liberando los pigmentos carotenoides.

En la etapa II del estudio, y con el fin de comparar el proceso en otra especie de camarón, se realizaron los ensilados químico y bacteriano previos a la extracción del pigmento aplicando el método más eficiente obtenido en la etapa anterior y utilizando desechos de camarón del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, camarón blanco). Los desechos molidos fueron adicionados con la mezcla de ácidos 4%fórmico:4%acético (v/p desechos) observándose reducción del pH de 7.98 a 3.5, comprobándose que fue posible realizar el ensilado mediante el uso de ácidos orgánicos. En el ensilado bacteriano se utilizó el inóculo de *Pediococcus pentosaceus* ensayado

anteriormente, reduciendo el pH de 7.98 a 4.17. Los ensilados fueron almacenados bajo las mismas condiciones y sujetos a las dos secuencias de extracción ya descritas en la etapa anterior: extracción-centrifugación y centrifugación-extracción. En los residuos de *L. vannamei*, se confirmó que durante el ensilado químico hubo una reducción significativa en el contenido de cenizas (23.1 y 15.3% respectivamente para EC y CE) respecto al residuo fresco ($P < 0.001$). La concentración de proteínas tuvo un decremento menor al observado con *L. aztecus* (1.6 y 4.2% para EC y CE, respectivamente), con respecto a los residuos frescos, no encontrando diferencia significativa entre las fracciones ($P > 0.01$). También se observó una disminución significativa en el contenido de cenizas en ensilado bacteriano (27.7 y 19.5% para EC y CE, respectivamente) con respecto a los residuos frescos ($P < 0.001$). La concentración de proteína disminuyó en 6.3 y 3.3 % para EC y CE respectivamente, con relación al residuo fresco, sin presentar diferencias significativas entre las fracciones ($P > 0.01$), observando menor pérdida en estos componentes durante el ensilado químico en comparación al bacteriano. Los resultados obtenidos en la cuantificación del pigmento en desechos de *L. vannamei* siguieron un comportamiento similar a los residuos de *L. aztecus*. En el ensilado químico de residuos de *L. vannamei*, siguiendo la secuencia de procesos CE, se alcanzó la mayor eficiencia en la extracción del pigmento, con incremento en el rendimiento de xantofilas totales de 49.8% con respecto al residuo fresco; en esta misma secuencia de extracción se tuvieron las máximas concentraciones de astaxantina, tanto en el ensilado químico ($7.72 \text{ E-}03 \text{ mg/mL licor}$), como en el bacteriano ($5.383 \text{ E-}03 \text{ mg/mL licor}$), con incremento en la concentración del pigmento del 99 y 40% respectivamente, con relación al contenido inicial en los residuos frescos. Se concluyó que durante el ensilado ocurre una hidrólisis parcial del complejo caroteno-proteína liberando los pigmentos carotenoides e incrementando su rendimiento.

En la etapa III se estudió el efecto causado por factores ambientales (luz, oxígeno, temperatura) en la estabilidad de la astaxantina, empleando dos sistemas modelo, proteico y lipídico, y en una pasta cárnica simple. Los desechos de camarón (*L. vannamei*) fueron ensilados con ácidos 4% fórmico:4% acético y almacenados a 4°C por 24 h; el pigmento fue extraído con la mezcla de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), bajo la secuencia CE. Los solventes fueron evaporados del licor obteniendo un sólido y fue disuelto en acetona dando una concentración de $1.703 \text{ E-}02 \text{ mg astaxantina/mL acetona}$. Se adicionaron alícuotas del extracto en los sistemas modelos: proteico (albúmina de huevo al 1%) y lipídico (aceite de girasol). Las fuentes de variación fueron: aire (ausencia, presencia), iluminación (luz, oscuridad), temperatura (4 y 20°) y tiempo de almacenamiento (1 a 5 semanas). La estabilidad del pigmento en ambos sistemas fue analizada como xantofilas totales y astaxantina. En el sistema proteico las muestras almacenadas en aire/oscuridad/20°C presentaron la mayor degradación de

xantofilas, observando un rápido descenso durante la primera semana de almacenamiento, mostrando una menor degradación en las semanas subsecuentes. El contenido de xantofilas totales fue significativamente afectado por la iluminación, temperatura, disponibilidad de aire y el tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$). Sin embargo, estos factores no tuvieron un efecto significativo en la concentración de astaxantina ($P > 0.01$). Las muestras almacenadas en aire/obscuridad/20°C mostraron altos niveles de oxidación de astaxantina, mientras que las almacenadas sin-aire/luz/4°C presentaron menores niveles de oxidación. En el sistema lipídico, el contenido de xantofilas totales disminuyó en menor proporción (decremento de 4 a 8% respecto al valor inicial) comparado con el sistema proteico (decremento de 65 a 90% respecto al valor inicial). Las muestras almacenadas en condiciones de aire/luz/20°C, aire/oscuridad/4°C y aire/oscuridad/20°C, presentaron altos niveles de degradación (decremento de 7.4, 7.9 y 7.4% respectivamente, con relación al contenido inicial); mientras que las muestras almacenadas sin-aire/luz/4°C y sin-aire/obscuridad/4°C presentaron menor degradación (decremento de 4.8 y 4.1%, respectivamente). Las xantofilas totales fueron significativamente afectadas por la disponibilidad de aire, temperatura y tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$), siendo éste último, el factor que causó mayor efecto. Sin embargo, la disponibilidad de aire, iluminación y la temperatura no tuvieron efecto significativo sobre la astaxantina ($P > 0.01$), que solo fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$). El aceite de girasol actúo como barrera al oxígeno, dando mayor protección a la astaxantina en comparación con el sistema proteico. Asimismo, el contacto entre las moléculas de astaxantina y los antioxidantes naturales y sintéticos añadidos al aceite durante su procesamiento podrían tener un papel importante para retardar la degradación de astaxantina. Se concluyó que en la estabilidad, tanto de xantofilas totales como de astaxantina, las fuentes de variación más importantes fueron la disponibilidad de oxígeno y el tiempo, mientras que la temperatura y la luz no mostraron efectos significativos sobre los pigmentos almacenados durante cinco semanas de estudio. Las xantofilas totales y la astaxantina fueron mas estables en un sistema lipídico que en un proteico. En la pasta cárnica, las concentraciones de xantofilas totales y astaxantina disminuyeron con una degradación severa después de la segunda semana de almacenamiento en todos los tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales añadidas, tanto en xantofilas totales como en astaxantina ($P < 0.001$), así como con respecto al tiempo ($P < 0.001$). Se concluyó que la escasa estabilidad de las xantofilas totales y astaxantina en la pasta cárnica se debió a que éste es un sistema complejo formado por diversos componentes, los cuales no le proporcionaron suficiente protección al pigmento; algunos de estos componentes pudieron ejercer un efecto prooxidante, modificando la estructura y, consecuentemente, la estabilidad del pigmento.

SUMMARY

The considerable grow in shrimp production generates large amounts of wastes, mainly heads and exoskeleton. This material, when not utilized in an efficient way, is a pollution source. The most abundant carotenoid pigment in shrimp wastes is astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β -carotene 4,4-dione), forming part, in many cases, of salmonid diets to obtain the desirable red-orange color distinctive of this fish. Acid ensilation is a process applied prior to pigment extraction that improves shimp wastes preservation due to acid addition from chemical or microbial sources, reducing the substrate pH to values low enough as to prevent the growth of underisable microorganisms. The objective of this thesis was to study astaxanthin extraction from shrimp wastes previously subjected by chemical or microbial ensilation, and to study the extraction efficiency by quantifying the extracted pigment. The effect of environmental factors (light, temperature and oxygen availability) was also studied on astaxanthin stability in two model system and a meat emulsion.

The work was divided into three sections. In section I, the best conditions for chemical and bacterial ensilation were studied in shrimp wastes obtained from the Gulf of Mexico (*Litopenaeus aztecus*, brown shrimp). Three organic acid were tested (formic, acetic and propionic) and combinations at different concentrations; the selected acid mixtures were those giving the lowest pH and the highest astaxanthin extraction yield. These mixtures were: formic (4%)-acetic (4%) acids, and formic (4%)-propionic (4%) acids (v/w), pH was lowered 8.5 to 4.25 and 4.40, respectively. Bacterial ensilation was carried out by adding 5% dextrose to the wastes (v/w) and inoculating a *Pediococcus pentosaceus* strain; substrate pH decreased from 8.32 to 4.84. In order to select the most efficient pigment extraction method, after chemical or bacterial ensilation the substrates were subjected to one of the following process sequences: 1) pigment extraction from the ensiled wastes using a solvent system (petroleum ether:acetone:water, 15:75:10), followed by centrifugation (EC process sequence); 2) centrifugation of the ensiled waste, followed by pigment solvent extraction using the solvent system described before (CE process sequence). In both cases, a solid residue and a liqueur were obtained. Ash, total protein and lipid content were analyzed in each obtained fraction. Pigment concentration was analyzed by spectrophotometry as total xanthophylls and by HPLC and reported as astaxanthin. Calcium salts were dissolved during chemical ensilation due to action of acids, decreasing ash content as compared to the raw material (5.5% in EC, 12.7% in CE in formic-acetic acid mixture; 12.6% in EC, 14.6% in CE in formic-propionic acid mixture), significant differences were found among fractions ($P < 0.001$) but not among acid formulations ($P > 0.01$). There was not significant differences ($P > 0.01$) for formulations or fractions (2.2, 3.07% formic-acetic and formic-propionic,

respectively). Lipid concentration significantly decreased with respect to the non-ensiled wastes (72 and 19%, EC and CE with formic-acetic acids, and 65.5 and 40%, EC and CE with formic-propionic acids) ($P < 0.001$), mainly due to oxidation reactions.

Ash content had similar decrease in the ensiled wastes subject to lactic fermentation in both process sequences bacterial silage (30%) ($P > 0.01$); as well as for protein concentration (7%). Conversely, significant differences were found among fractions with respect to ash content ($P < 0.001$) but not to protein concentration ($P > 0.01$). Lipid content had a significantly higher decrease ($P < 0.001$) in EC (69.1%, 1.88 g/100 g) than in CE (1.15%, 6.03 g/100 g) with respect non ensiled residues. The highest total xanthophylls concentration was observed in the liqueur obtained by chemical ensilation, in the CE process sequence, where it increased from 30.6 and 23.7% in wastes treated with formic-acetic and formic-propionic acids, respectively, with respect to the non-ensiled wastes, but with no significant differences among acid mixtures ($P > 0.01$). In a similar way, the highest Astaxanthin concentration was obtained in chemically ensiled wastes, after the CE process sequence CE (7.723×10^{-3} mg astaxanthin/mL liqueur), whereas in wastes subjected to bacterial ensilation, the same CE sequence produce 5.583×10^{-3} mg astaxanthin/mL liqueur. It was concluded that astaxanthin did not undergo any oxidative change during acid ensilation due to the reducing environment promoted by organic acids.

In order to compare the results when wastes from other shrimp species was used, section II studied chemical and bacterial ensilation giving the highest astaxanthin yield, in wastes from the Pacific coast (*Litopenaeus vannamei*, white shrimp). The ground wastes were mixed with formic (4%)-acetic (4%) acid mixture (v/w); pH decreased from 7.98 to 3.5 was observed. The bacterial ensilation was also carried out inoculating with a *Pediococcus pentosaceus* strain, pH decrease was from 7.98 to 4.17. Ensiled wastes were subjected to the same process sequences described above: extraction-centrifugation (EC) and centrifugation-extraction (CE). As observed before, ash content was significantly reduced (23.1 and 15.3%, EC and CE, respectively) ($P < 0.001$). Protein concentration reduction was less marked as in *L. aztecus* wastes, with no significant differences ($P > 0.01$) with respect to non-ensiled wastes (1.6 and 4.2%, EC and CE, respectively). Similar as with *L. aztecus*, ash content in the bacterial silage significantly ($P < 0.001$) decreased due to calcium salts solubilization at low pH (27.7 and 19.5%, EC and CE, respectively). Protein concentration non-significantly decreased in 6.3 and 3.3%, EC and CE respectively. Pigment content was similar to the one obtained in *L. aztecus* wastes. The highest yield was obtained with chemical ensilation of *L. vannamei*, following the CE process sequence. Total xanthophylls concentration increased 49.8% with respect to non-ensiled wastes. CE process sequence also gave the highest astaxanthin yields both for chemical (7.723×10^{-3} mg

astaxanthin/mL liqueur), and bacterial ensilation (5.383 E-03 mg astaxanthin/mL liqueur), this is an increase of 99 and 40%, respectively with respect to the initial astaxanthin content in non-ensiled wastes. The increase in total xanthophylls and astaxanthin was also due to the carotene-protein complex hydrolysis, releasing the carotenoids and allowing a more efficient extraction.

In section III the effect of environmental factors (light, oxygen and temperature) on astaxanthin stability was studied. Three model systems were used: a protein solution, a lipid and a meat emulsion. Shrimp wastes (*L. vannamei*) were mixed with a formic (4%)- acetic (4%) acid mixture, and stored at 4°C for 24 h; the pigment was extracted with a solvent system (petroleum ether:acetone:water, 15:75:10) by the CE process sequence already described. The solvents were completely evaporated and the solid redissolved in acetone to a final concentration 1.7032 E-02 mg astaxanthin/mL acetone. Aliquots of this pigment extract were added to the model ssystems: protein (1% egg albumin) and lipid (sunflower commercial oil). The sources of variation were: oxygen availability (air and air-free packages), illumination (darkness and under light), temperature (4 and 20°) and storage time (1 to 5 weeks). Pigment stability in both systems was analyzed as total xantophyll and astaxanthin concentration.

Sample stored in air/darkness/20°C in the protein system were severely degraded as observed by a rapid decrease of xanthophylls and astaxanthin content during the first week of storage, and a moderate degradation during the rest of the storage time. Total xanthophylls content was significantly affected by illumination, temperature, oxygen availability and storage time ($P < 0.001$). Conversely, these factors did not significantly affect astaxanthin concentration ($P > 0.01$). Samples stored in air-free/light/ /4°C showed the lowest oxidation level.

Total xanthophylls content in the oil decreased in a lesser extent than in the protein system (4 to 8% in the oil; 65 to 90% in the protein system). Samples stored in air/Light/ /20°C, air/darkness /4°C and air/darkness/20°C showed severe pigment degradation (7.4, 7.9 and 7.4% total xanthophylls decrease, respectively); whereas the samples stored in air-free/light/4°C and air-free/darkness/4°C had less degradation (4.8 and 4.1%, respectively). Total xanthophylls were significantly affected by oxygen availability, temperature and storage time ($P < 0.001$), the last was the factor with the highest effect on pigment degradation. However, oxygen availability, illumination and temperature did not significantly affected astaxanthin degradation ($P > 0.01$), only affected by storage time ($P < 0.001$). Sunflower oil acts as oxygen barrier protecting astaxanthin, which did not occur in the protein system. Natural and synthetic antioxidants added to the commercial oil could also have an effect on astaxanthin prevention to degrade. It was concluded

that total xanthophylls and Astaxanthin stability was mainly affected by oxygen and time, whereas temperature and light did not have significant effects on these pigment during a 5-week storage time.

Total xanthophyll and astaxanthin underwent severe degradation when added to a meat emulsion after two weeks of storage. Significant differences among initial xanthophylls and astaxanthin concentrations and throughout the storage time were found ($P < 0.001$). It was concluded that this degradation was due to the complex system formed by the emulsion system itself and numerous different molecules, some of them may act as prooxidants.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. PANORAMA GENERAL DE LOS PRODUCTOS PESQUEROS	5
2.1.1. Importancia de la pesca	5
2.1.2. La acuicultura	5
2.1.3. Producción pesquera en México	6
2.2. EL CAMARÓN	8
2.2.1. Características	8
2.2.2. Anatomía y composición química	8
2.2.3. Explotación del camarón en el ámbito mundial y en México	10
2.3. APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS DEL CAMARÓN	12
2.3.1. Producción de alimentos balanceados para aves	13
2.3.2. Obtención de quitina	14
2.3.3. Obtención de proteínas y lípidos	15
2.4. PIGMENTOS	16
2.4.1. El color	16
2.4.2. Pigmentos sintéticos y naturales	16
2.4.3. Los pigmentos en los alimentos	20
2.5. LOS CAROTENOIDES	21
2.5.1. Características	21
2.5.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas	22
2.5.3. Carotenos y xantofilas	24
2.5.4. Función biológica	26
2.5.5. Fuentes de obtención	28
2.5.6. Análisis	29

2.6. ASTAXANTINA	29
2.6.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas	29
2.6.2. Estabilidad	31
2.6.3. Función biológica	32
2.6.4. Fuentes de obtención	33
2.6.4.1. Algas	33
2.6.4.2. Levaduras	35
2.6.4.3. Desechos de crustáceos	36
2.6.4.4. Plantas	38
2.6.4.5. Astaxantina sintética	39
2.6.5. Importancia y usos de astaxantina	39
2.6.5.1. Pigmentación de salmónidos	39
2.6.5.2. Dietas de aves	40
2.6.5.3. Cosmetología	41
2.6.5.4. Usos diversos	41
2.7. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE DESECHOS DE CRUSTÁCEOS	41
2.7.1. Extracción con disolventes orgánicos	42
2.7.2. Extracción con aceites vegetales y animales	43
2.7.3. Ensilados	44
2.7.3.1. Ensilado químico	44
2.7.3.2. Ensilado bacteriano	46
3. OBJETIVOS	51
3.1. OBJETIVO GENERAL	52
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	52
4. JUSTIFICACIÓN	54
5. HIPÓTESIS	56
6. MATERIALES Y MÉTODOS	58
6.1. ETAPA I. ESTUDIOS EN DESECHOS DE CAMARÓN DEL GOLFO DE MÉXICO (<i>Litopenaeus aztecus</i> , camarón café)	58
6.1.1 Materia prima	58
6.1.2. Ensilado químico	58

6.1.2.1. Formulaci3n de 6cidos org6nicos y sus mezclas	58
6.1.2.2. Preparaci3n del ensilado qu6mico	60
6.1.2.3. Secuencia de procesos de extracci3n de pigmentos	60
6.1.3. Ensilado bacteriano	61
6.1.3.1. Preparaci3n del cultivo iniciador	61
6.1.3.2. Fermentaci3n	61
6.1.3.3. Extracci3n del pigmento de residuos fermentados	61
6.1.4. An6lisis F6sicoqu6micos	65
6.1.4.1. pH	65
6.1.4.2. Humedad	65
6.1.4.3. Cenizas	66
6.1.4.4. Prote6na total	66
6.1.4.5. L6pidos totales	67
6.1.5. An6lisis de pigmentos carotenoides	68
6.1.5.1. Determinaci3n y cuantificaci3n de xantofilas totales	68
6.1.5.2. Identificaci3n y cuantificaci3n de astaxantina	68
6.1.5.3. An6lisis de est6ndares de carotenoides	69
6.1.6. Dise1o experimental y an6lisis estad6stico	69
6.2. ETAPA II. ESTUDIOS EN DESECHOS DE CAMAR3N DEL PAC6FICO (<i>Litopenaeus vannamei</i> , camar3n blanco)	70
6.2.1 Materia prima	70
6.2.2 Ensilado qu6mico	71
6.2.3. Ensilado bacteriano	71
6.2.4. Identificaci3n y cuantificaci3n de xantofilas totales y astaxantina	71
6.2.5. Dise1o experimental y an6lisis estad6stico	72
6.3. ETAPA III. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ASTAXANTINA EN SISTEMA MODELO Y REAL	72
6.3.1. Obtenci3n de los extractos	72
6.3.2. Estabilidad de astaxantina en sistemas modelo	73
6.3.2.1. Sistema aceite-pigmento	73
6.3.2.2. Sistema prote6na-pigmento	73
6.3.2.3. Dise1o experimental y an6lisis estad6stico de sistemas lip6dico y prot6ico	74

6.3.3. Cinética de degradación del pigmento	75
6.3.3.1. Análisis estadístico	75
6.3.4. Estabilidad de la astaxantina en una emulsión cárnica simple	75
6.3.4.1. Emulsión cárnica simple	75
6.3.4.2. Diseño experimental y análisis estadístico	76
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
7.1. ETAPA I. ESTUDIOS EN DESECHOS DE CAMARÓN DEL GOLFO DE MÉXICO (<i>Litopenaeus aztecus</i> , camarón café)	79
7.1.1. Materia prima	79
7.1.2. Formulación de mezclas de ácidos orgánicos	80
7.1.3. Ensilado químico de los residuos de camarón (<i>L. aztecus</i>)	85
7.1.3.1. Condiciones óptimas del ensilado químico	85
7.1.3.2. Efecto de la secuencia de proceso en los parámetros fisicoquímicos	86
7.1.4. Ensilado bacteriano de los residuos de camarón (<i>L. aztecus</i>)	99
7.1.4.1. Características del cultivo iniciador	99
7.1.4.2. Fermentación	99
7.1.4.3. Efecto de la secuencia de procesos en la extracción de pigmentos	101
7.1.5. Identificación y cuantificación de astaxantina y astaceno	107
7.1.5.1. Análisis de estándares de carotenoides	108
7.1.5.2. Astaxantina en el ensilado químico	108
7.1.5.3. Astaxantina en el ensilado bacteriano	110
7.1.5.4. Distribución de astaxantina y astaceno en las fracciones de los ensilados	112
7.2. ETAPA II. ESTUDIOS EN DESECHOS DE CAMARÓN DEL PACÍFICO (<i>Litopenaeus vannamei</i> , camarón blanco)	114
7.2.1. Materia prima	114
7.2.2. Ensilado químico de los residuos de camarón (<i>L. vannamei</i>)	115
7.2.2.1. Contenido de humedad, proteína, ceniza y lípidos del ensilado químico	115
7.2.2.2. Disminución de pH en el ensilado fórmico-acético	117
7.2.2.3. Efecto de la secuencia de extracción del pigmento en los parámetros fisicoquímicos	117

7.2.3. Ensilado bacteriano en residuos de camarón de <i>L. vannamei</i>	119
7.2.3.1. Fermentación	119
7.2.3.2. Efecto de la secuencia de procesos en la extracción de pigmentos	121
7.2.3.3. Identificación y cuantificación de xantofilas totales y astaxantina	123
7.2.4. Comparación de los ensilados	127
7.3. ETAPA III. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE ASTAXANTINA	129
7.3.1. Estabilidad de xantofilas totales y astaxantina	129
7.3.1.1. Sistema proteína-pigmento	129
7.3.1.2. Sistema aceite-pigmento	134
7.3.1.3. Pasta cárnica	138
7.3.2. Cinética de degradación del pigmento y sus parámetros	142
8. CONCLUSIONES	146
9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	150
10. BIBLIOGRAFÍA	152
11. ANEXOS	168
PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales especies marinas capturadas en México	7
2	Volumen de la producción pesquera por acuicultura en México	7
3	Anatomía del camarón	9
4	Distribución de la producción camaronícola en México	11
5	Producción de camarón (1997-2007)	12
6	Estructura química del isopreno	22
7	Estructura química del β -caroteno	23
8	Estructura de algunos carotenos	25
9	Estructura de algunas xantofilas	26
10	Funciones biológicas de los carotenoides	27
11	Estructura química de la astaxantina (3S,3'S)	31
12	Isómeros de la astaxantina	31
13	Fermentación láctica homofermentativa (ruta Embden-Meyer)	50
14	Fermentación láctica heterofermentativa (ruta del ácido 6-fosfogluconico)	50
15	Obtención de pigmentos y análisis de ensilados ácido y bacteriano (secuencia de procesos extracción-centrifugación)	64
16	Obtención de pigmentos y análisis de ensilados ácido y bacteriano (secuencia de procesos centrifugación- extracción)	65
17	pH de los ensilados tratados con ácidos orgánicos a diferentes concentraciones	82
18	pH del ensilado después del tratamiento con combinaciones de ácidos fórmico-acético	83
19	pH del ensilado después del tratamiento con combinaciones de ácidos fórmico-propiónico	83
20	pH y contenido de xantofilas totales en ensilados químicos con diferentes combinaciones de ácidos orgánicos	85

21	Disminución del pH en residuos de camarón en ensilado químico	86
22	Contenido de humedad en los ensilados y sus fracciones	89
23	Contenido de cenizas en los ensilados químicos y sus fracciones	91
24	Concentración de proteína de los ensilados químicos y sus fracciones	92
25	Concentración de lípidos en los ensilados químicos y sus fracciones	95
26	Contenido de xantofilas totales en ensilado químico de <i>L. aztecus</i>	97
27	pH en residuos de camarón inoculados con <i>P. pentosaceus</i>	100
28	Contenido de humedad en las fracciones del ensilado bacteriano	103
29	Contenido de cenizas en las fracciones del ensilado bacteriano	104
30	Contenido de proteínas en las fracciones del ensilado bacteriano	105
31	Contenido de lípidos en las fracciones del ensilado bacteriano	106
32	Contenido de xantofilas totales en ensilado bacteriano	108
33	Cromatogramas del ensilado químico obtenido por los procesos de extracción-centrifugación y centrifugación-extracción	111
34	Cromatograma del ensilado bacteriano producido por el proceso de extracción-centrifugación	112
35	Cromatograma del ensilado bacteriano bajo el proceso de centrifugación-extracción	112
36	Concentración de astaxantina y astaceno en licores obtenidos del ensilado químico	114
37	Concentración de astaxantina y astaceno en licores obtenidos del ensilado bacteriano	114
38	Contenido de humedad, cenizas, proteína y lípidos en la materia prima y en los ensilados	116
39	Análisis proximal del residuo sólido y el licor obtenidos en los procesos de extracción centrifugación y centrifugación-extracción en residuos de <i>L. vannamei</i>	120
40	Disminución del pH en residuos de camarón <i>L. vannamei</i> en ensilado bacteriano	121

41	Análisis fisicoquímicos de los residuos frescos y ensilado bacteriano	122
42	Análisis proximal del residuo sólido y el licor obtenidos en los procesos de extracción centrifugación y centrifugación-extracción en residuos de <i>L. vannamei</i>	124
43	Contenido de xantofilas totales en ensilado químico y bacteriano en <i>L. vannamei</i>	126
44	Concentración de astaxantina en los licores obtenidos en el ensilado químico y bacteriano	127
45	Concentración de xantofilas totales en el sistema proteína-pigmento	132
46	Concentración de astaxantina en el sistema proteína-pigmento	134
47	Concentración de xantofilas totales en el sistema aceite-pigmento	136
48	Concentración de astaxantina en sistema aceite-pigmento	138
49	Concentración de xantofilas totales en la pasta cárnica	141
50	Concentración de astaxantina en la pasta cárnica	143
51	Cinética de degradación de astaxantina	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición química de camarón silvestre y cultivado	10
2	Composición proximal del cefalotórax de camarón	10
3	Colorantes sintéticos permitidos en la Unión Europea y FDA, y su situación en varios países	19
4	Algunos pigmentos naturales utilizados como colorantes	20
5	Contenido de carotenoides en varias fuentes de desechos de crustáceos	38
6	Principales bacterias lácticas usadas en fermentaciones industriales	51
7	Concentración de ácidos empleados en los estudios preliminares de ensilados de desechos molidos de camarón	60
8	Mezclas seleccionadas de ácidos orgánicos para el ensilado de desechos molidos de camarón	60
9	Análisis realizados en los ensilados y sus fracciones	66
10	Diseño experimental en bloques divididos (Etapa I)	71
11	Diseño experimental en bloques divididos (Etapa II)	73
12	Diseño totalmente al azar en arreglo factorial completo $2^3 \times 5$ (Etapa III)	76
13	Formulación de emulsión cárnica empleada	77
14	Diseño totalmente al azar en arreglo factorial completo 5×5 (pasta cárnica)	78
15	Composición proximal de los residuos camarón café (<i>Litopenaeus aztecus</i>)	80
16	Composición de los ensilados químicos y sus fracciones (Etapa I)	88
17	Composición de los ensilados bacterianos y sus fracciones (Etapa I)	102
18	Tiempos de retención de estándares de carotenoides	109
19	Composición proximal obtenida en los residuos de camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	115

20	Composición de los ensilados químicos y sus fracciones (Etapa II)	119
21	Composición del ensilado bacteriano y sus fracciones (Etapa II)	123
22	Efecto de factores ambientales en la concentración de xantofilas totales en el sistema modelo proteico	131
23	Efecto de factores ambientales en la concentración de astaxantina en el sistema modelo proteico	133
24	Efecto de factores ambientales en la concentración de xantofilas en el sistema modelo lipídico	135
25	Efecto de factores ambientales en la concentración de astaxantina en sistema modelo lipídico	137
26	Concentración de xantofilas totales con respecto a la cantidad de astaxantina añadida en la pasta cárnica durante el tiempo de almacenamiento	140
27	Concentración de astaxantina residual con respecto a la cantidad de astaxantina añadida durante el tiempo de almacenamiento de pasta cárnica	142
28	Cinética de degradación de astaxantina: k , $t_{1/2}$ y R^2	144

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los productos marinos han sido explorados en función del mercado potencial de los mismos, debido a la gran variedad de materias primas que se derivan de éstos, ya que además del alimento obtenido del músculo de algunos de ellos, también son una fuente de materiales tan variados como proteínas, enzimas y pigmentos, ampliamente utilizados en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica (Ohshima, 1998).

Entre estos productos marinos se encuentra el camarón. Su producción en México rebasa las 190,000 toneladas métricas (TM) al año, de las cuales el 40% se distribuye para consumo nacional y el resto es exportado (SAGARPA, 2008) colocando a nuestro país entre los veinte principales productores. Cabe destacar que sólo 55% del animal es comestible y el restante 45% está constituido por el cefalotórax o cabeza, y el caparazón que no son comestibles, y representa alrededor de 95,000 TM de desperdicios, que de no ser aprovechados constituyen una fuente importante de contaminación tanto en las zonas de captura como en las granjas camaronícolas. Para los productores, el problema de la utilización de desechos de camarón radica en la facilidad de descomposición de éstos en condiciones ambientales. Los residuos de camarón se producen durante la mayor parte del año, aumentando los volúmenes entre los meses de Septiembre a Noviembre.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diona, β,β -caroteno) es el pigmento carotenoide más abundante en los desechos de crustáceos, es utilizada principalmente en la acuicultura para la formulación de dietas para salmónidos, con el fin de incrementar su color. Los salmones y animales acuáticos no pueden sintetizar este pigmento *de novo*, por lo que tienen que adquirirlo a través de su alimento (Hirschberg, 2001). Actualmente, casi la totalidad del mercado mundial de astaxantina es cubierto por pigmentos sintéticos, de alto precio comercial (US\$ 2,500/kg); sin embargo, el uso de colorantes sintéticos es cada vez más restringido debido a su posible toxicidad, incrementándose el interés por encontrar nuevas fuentes naturales del pigmento. Muchos estudios han sido desarrollados para la obtención de astaxantina a partir de desechos de crustáceos usando varios métodos, tales como la extracción directa con disolventes orgánicos (Meyers y Bligh, 1981; Sachindra y col., 2006) o con aceites vegetales y animales (Shahidi y Synowiecki, 1991; Chen y Meyers, 1982a; Sachindra y Mahedrakar, 2005a). Recientemente otros métodos han sido estudiados, como el ensilado ácido (Rouvinen, 2001) y la fermentación láctica (Armenta y col., 2002; Holanda y Neto, 2006; Sachindra y col., 2007); en

estos métodos se realiza un ensilado como un proceso previo a la extracción del pigmento, aumentando la conservación de la materia prima y mejorando la extracción. De manera general el ensilado ofrece diversas ventajas, ya que la tecnología utilizada es relativamente simple y se lleva a cabo en un tiempo corto (Meyers y Benjamín, 1987; Aranson, 1994; Torrissen y col., 1981). Los ácidos orgánicos y minerales se adicionan con el fin de promover un descenso rápido de pH en el sustrato y así evitar el crecimiento de microorganismos no deseables. En el ensilado bacteriano se adiciona un inóculo de bacterias altamente acidificantes, produciéndose ácido *in situ* (Frazier, 1993; Hall y De Silva, 1994). Se ha reportado que este proceso incrementa la concentración de astaxantina en comparación con los residuos sin fermentar debido a que se estabiliza la estructura del carotenoide (Armenta, 2002). Posteriormente, se realiza la extracción del pigmento usando aceites o disolventes orgánicos (Omara-Alwala y col., 1985; Chen y Meyers, 1982a; Armenta, 2002). Se considera que un ensilado, químico o bacteriano, es eficiente si el sustrato cambia de un estado semisólido a un estado líquido, al mismo tiempo que el pH disminuye.

Químicamente, la astaxantina se presenta en tres formas isoméricas; su estabilidad en la naturaleza se debe a la unión éster de este carotenoide con una lipoproteína y, en el caso de los crustáceos, con una matriz de quitina. A pesar de ello, la astaxantina es susceptible a degradarse por factores ambientales (luz, oxígeno, temperatura, etcétera) debido a su naturaleza isoprenoide. Asimismo, durante el proceso de ensilado su estructura puede cambiar, dando como resultado compuestos derivados (Khachik y col., 1988). Por ello, es necesario analizar los materiales conteniendo astaxantina para identificar y cuantificar este compuesto, y verificar el grado de posible oxidación. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido utilizada en la determinación de compuestos pertenecientes a varias familias químicas, entre otros a los carotenoides (Skoog y col., 2000), además de ser una herramienta cuantitativa valiosa para la determinación de los compuestos separados.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eficiencia del ensilado químico y bacteriano en desechos de camarón como métodos para la extracción de astaxantina, así como identificar y cuantificar a los pigmentos carotenoides presentes en los ensilados. Se estudió, además, la estabilidad de la astaxantina en sistemas modelo lipídico, proteico y una pasta cárnica simple, almacenados bajo varios factores ambientales (luz, oxígeno y temperatura).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama general de los productos pesqueros

Los productos marinos constituyen uno de los rubros económicos de mayor importancia en países con litoral. Los recursos pesqueros y acuícolas son parte importante del quehacer económico y social por ser fuente importante de alimentos, empleo e ingresos económicos para la población, además de que aportan insumos para la industria y generan divisas por la venta de productos de alto valor (Cifuentes, 1997).

2.1.1. Importancia de la pesca

Se estima que las pesquerías aportan 16% del consumo mundial de proteínas, siendo esta proporción considerablemente más elevada en algunos países en desarrollo y en regiones que dependen directamente de los recursos marinos (FAO, 2009). La mayor producción mundial de la pesca de captura y acuicultura en la última década se dio en 2008, con 143.7 millones TM (FAO, 2009), lo que equivale a un suministro *per capita* de 16.7 kg, de esta cifra, 92 millones TM provienen de la pesca de captura (82 millones se obtuvieron en aguas marinas y 10 millones se capturaron en aguas continentales), el valor de su venta fue estimado en 91,200 millones de dólares, mientras que 51.7 millones TM fueron producidas por acuicultura. De los principales productores pesqueros, China continúa siendo el líder mundial con alrededor de 17 millones TM, seguido por Perú con 9.6 millones TM, Estados Unidos 5 millones TM, Indonesia con 4.9 millones TM, Japón 4.3 millones TM y Chile con 4.9 millones TM (FAO, 2009).

2.1.2. La acuicultura

Esta consiste en la producción de plantas o animales acuáticos en sistemas controlados, donde su crecimiento es manejado y mejorado por el hombre. La acuicultura contribuye con más de la mitad de la producción pesquera mundial y es el sector de producción de alimentos de origen animal con mayor crecimiento y desarrollo desde finales de la década de los 80's. En 2006, proporcionó 47% del suministro mundial de pescado para la alimentación humana. Se estima que la acuicultura superará a la pesca de captura como fuente de pescado para la alimentación; en 2006 la producción registrada para acuicultura alcanzó 51.7 millones TM, sin incluir a las plantas acuáticas, con un valor de 78,800 millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 8.8%, mientras que la pesca de captura ha crecido solamente 1.2% (FAO

Acuacultura, 2006). Las principales especies producidas por acuacultura son los peces (47.4%), las plantas acuáticas (23.4%), los moluscos (22.3%) y los crustáceos (6.2%).

Asia domina ampliamente la producción mundial por acuacultura con 89% del volumen total y 77% del valor total (FAO, 2009). China representa 69% del total mundial en términos de cantidad y 49% del valor total de la producción mundial; este país produce 77% del total mundial de carpas y 82% de ostras. Noruega y Chile son los dos mayores productores de salmón cultivado con 33 y 31%, respectivamente, de la producción mundial (FAO, 2009). La acuacultura es relativamente nueva en América Latina, pero su potencial es muy grande y con una buena planificación se podrán establecer programas importantes. Los principales países que la desarrollan son Brasil, Cuba, Chile, Ecuador, El Salvador, México, Paraguay y Puerto Rico.

La producción de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) son especies introducidas a diversos países; actualmente, su producción es sustancialmente mayor que en sus regiones de origen. En 2004, en la región de Asia y el Pacífico la producción de tilapia fue de 1.2 millones TM comparada con 212,000 TM producidas en África de donde es nativa, mientras que para el camarón blanco fue de 1.1 millones TM en Asia comparada con 266,000 TM producidas en América Latina y el Caribe de donde es nativo (FAO Acuacultura, 2006).

2.1.3. Producción pesquera en México

México cuenta con 11,592 km de litoral, lo que significa un gran potencial de recursos pesqueros. Sin embargo, la actividad pesquera no está lo suficientemente desarrollada y casi dos tercios de la producción pesquera nacional proviene principalmente solo de cinco estados: Sonora, Sinaloa, Baja California, Baja California Sur y Veracruz. Cabe señalar que los cuatro primeros, en conjunto, representaron 70.3% del volumen total de la producción pesquera y acuícola nacional en 2008 (CONAPESCA, 2008). Los productos pesqueros no siguen un procesamiento industrial que permita darles valor agregado y llevarlos a mercados de alto precio, como lo hacen otros países. Además, 81.8% de la captura pesquera nacional se concentra en el litoral del Pacífico, principalmente en la región noroeste (Gómez, 2002). Según datos reportados por CONAPESCA (Anuario, 2008) las principales especies capturadas fueron la sardina, el camarón y los túnidos. En el caso de la sardina se registró un volumen de 211,083 TM (30% del total nacional). El camarón con 196,289 TM, aunque es la segunda especie en

volumen, es la primera en valor comercial a nivel nacional. Los túnidos (atún, barrilete y bonito) ocupan el tercer lugar con una producción de 91,075 TM (Figura 1).

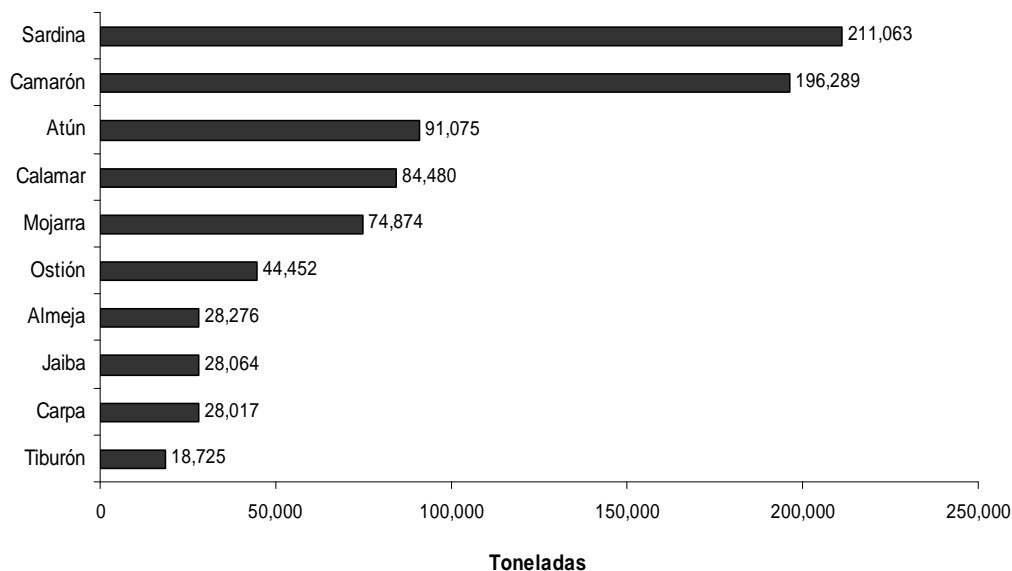


Figura 1. Principales especies marinas capturadas en México, Peso vivo (CONAPESCA, 2008)

México muestra una tendencia de crecimiento importante en acuacultura, principalmente por el cultivo de camarón y el crecimiento de la maricultura (Figura 2). Mientras que la captura de crustáceos mantiene sus niveles producción, la camaronicultura ha crecido con una tasa media de 20.9% desde 1990 a la fecha. En el ámbito internacional, México ocupó el séptimo lugar en 2008 en la producción de camarón cultivado (CONAPESCA, 2008).

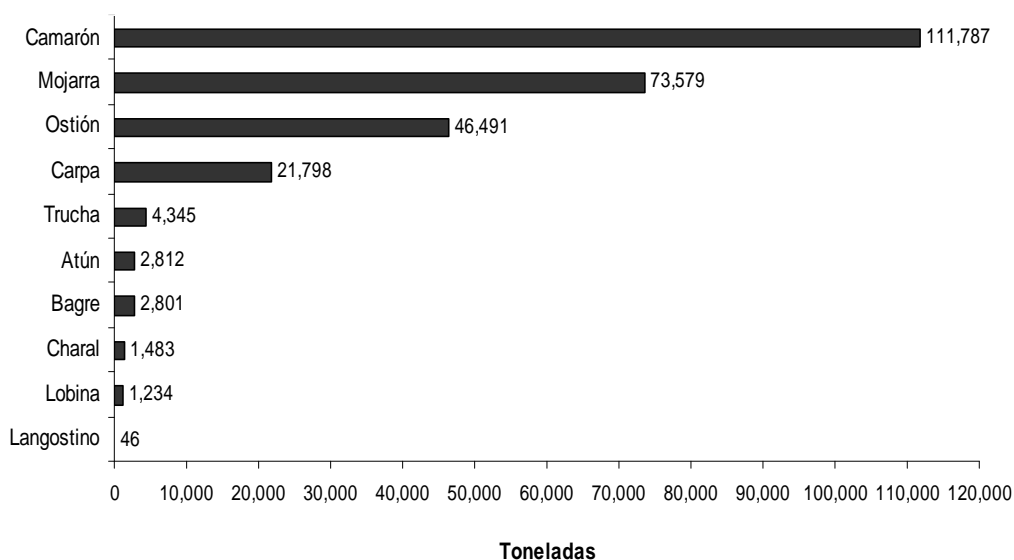


Figura 2. Volumen de la producción pesquera por acuacultura en México (CONAPESCA, 2008).

2.2. El camarón

2.2.1. Características

El camarón es un crustáceo, decápodo, perteneciente al *phylum Arthropoda*, género *Penaeus* (*Litopenaeus*), generalmente mide de 10 a 15 centímetros de longitud, de forma y color variable, según la especie. Presenta patas pequeñas, bordes de las mandíbulas fibrosos, cuerpo comprimido y cola muy prolongada respecto al cuerpo. Se les puede encontrar tanto en cuerpos de agua dulce como en agua salada. Su principal característica es la presencia de un exoesqueleto secretado por la epidermis, de origen quitinoso el cual contiene carbonato de calcio dándole dureza y proporcionando soporte externo, además tiene la función como barrera protectora (Barnes, 1984; Arias y col., 1995).

2.2.2. Anatomía y composición química

El cuerpo del camarón se divide en tres regiones principales: cefalotórax, abdomen y telson (cola) (Figura 3). Los apéndices del cefalotórax son: anténulas, antenas, mandíbulas, maxilípedos y periópodos; en el abdomen se encuentran los pleopodos o apéndices natatorios; en el telson se ubican los uropodos. El cefalotórax es una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón que contiene la cabeza y los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensiles y dos caminadoras. En la cabeza tiene una cresta rígida y dentada, un par de ojos y dos mandíbulas con varios apéndices frente a la boca que le ayudan en su alimentación. El abdomen está dividido en seis segmentos conteniendo a los intestinos, dichos segmentos se encuentran fusionados entre sí, ligados por debajo con extremidades flexibles unidas a un par de brazos considerados como piernas que también pueden ser utilizadas para llevar su alimento a la boca. Al igual que el cefalotórax, el abdomen está cubierto por un caparazón, el cual está formado de quitina, proteínas y sales minerales (carbonato de calcio y fosfatos, principalmente) que le dan la dureza característica. El último de los segmentos que forman el abdomen termina en una punta fina llamada telson; por debajo se encuentra la cola natatoria (Armenta, 2002; Luna, 2003). Los órganos sensoriales del camarón son las anténulas que se encuentran frente a la boca, estas son móviles y sensibles; contienen células receptoras las cuales tienen un papel similar al del oído humano, además aquí se localizan las células del gusto. El sentido del tacto es muy fino, ya que en las extremidades tiene pelillos capaces de detectar movimientos ligeros (Armenta, 2002; Luna 2003).

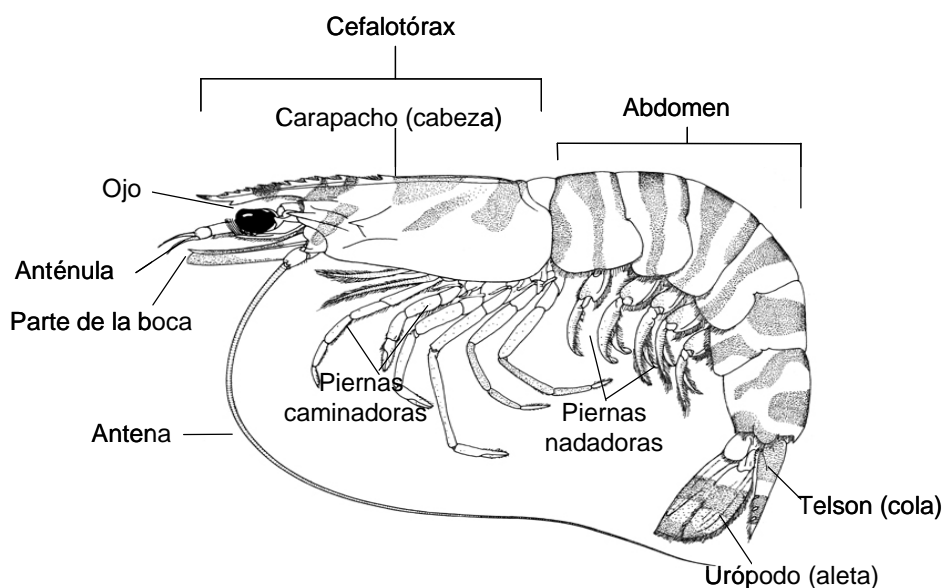


Figura 3. Anatomía del camarón (Guadarrama, 1997).

El camarón es considerado un alimento altamente nutritivo, contiene entre 75-80% de humedad, 18-20% de proteínas y alrededor de 1% de grasa (Charley, 1987). El agua es el mayor componente de la parte comestible y es el factor determinante de los atributos sensoriales de los productos comerciales (Armenta, 2002). En general, los camarones son ricos en proteínas y bajos en calorías. Una ración de 100 g contiene cerca de 20 g de proteínas y entre 90-100 cal. Las proteínas son de alta calidad, conteniendo concentraciones adecuadas de los aminoácidos esenciales, principalmente ácidos aspártico y glutámico (Shahidi y Synowiecki, 1991); asimismo la fracción lipídica contiene ácidos grasos esenciales. La composición química de los camarones varía de acuerdo con la alimentación, hábitat, especie, edad y estación del año (Andrade, 2000). En la Tabla 1 se muestra la composición química de camarones silvestres y cultivados en el que se observa un nivel alto de proteína en ambos productos, así como un contenido bajo de lípidos. Otro componente químico importante en el camarón es la quitina, polímero de aminoazúcares [β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina] y cuyo contenido varía entre 13 a 35% en peso seco. La quitina se encuentra esterificada con proteínas formando una red muy estable. Las sales minerales unidas a esta red le dan gran dureza al caparazón, que protege el cuerpo y los órganos vitales durante la vida adulta de estos crustáceos.

Tabla 1. Composición química de camarón silvestre y cultivado (100 g) (Wong, 2000).

Composición (%) (base húmeda)	Camarón entero de cultivo	Camarón entero marino
Energía (Kcal/100)	92.0	95.0
Humedad	76.5	76.1
Proteína	20.1	20.3
Lípidos	0.9	0.9
Cenizas	1.6	1.3
Lípidos	1.0	1.4

En la fracción lipídica se encuentran disueltos los compuestos responsables del aroma, sabor y color característicos del camarón, así como los pigmentos carotenoides liposolubles, responsables del color. En la Tabla 2 se muestra la composición proximal del cefalotórax.

Tabla 2. Composición proximal del cefalotórax de camarón (Guadarrama, 1997).

Componente	% base seca
Proteína cruda	47.70
Cenizas	26.86
Fibra cruda	19.35
Grasa	4.63
Carbohidratos	2.47

2.2.3. Explotación del camarón en el ámbito mundial y en México

El camarón continúa siendo el producto marino más rentable a nivel mundial, manteniendo un excelente precio comercial por encima de cualquier otra pesquería debido a sus cualidades nutricionales y elevada aceptación por los consumidores. Además, el camarón es fácil de encontrar en todo el mundo, tanto en sistemas de agua dulce como en agua salada, convirtiéndolo en un importante recurso pesquero y alimenticio.

En 2008, la producción mundial de camarón capturado y cultivado ascendió a 6 millones TM, de las cuales 60% fue destinado al comercio internacional; representó en ese año 17% del total del valor del comercio internacional de productos pesqueros (FAO, 2009). El volumen de las capturas mundiales de camarón fue de 3.4 millones TM anuales, siendo Asia la zona más importante en cuanto a la pesca de camarón. En ese año, los principales países productores de

camarón de captura fueron China (1,471,575 TM), India (366,464 TM), Indonesia (235,050 TM), Canadá (139,829 TM), Vietnam (107,900 TM) y Tailandia (67,903 TM). Otros países con menor producción son Estados Unidos, México, Japón y Brasil (FAO, 2009). La producción acuícola mundial de camarón contribuye con 43% (2.6 millones TM); las tres principales especies que rebasan el 75% del total de la producción acuícola de camarón son el camarón tigre gigante (*L. monodon*), el camarón carnosos (*L. chinensis*) y el camarón blanco (*L. vannamei*) (FAO, 2009).

En el ámbito nacional, México se colocó como el octavo productor de camarón con un volumen total de 196,289 TM en peso vivo en 2008, cifra superior en 6.28% a la obtenida durante 2007. De este volumen, la producción proveniente de la actividad acuícola representó el 66.3% del total (130,201 TM); la producción de camarón de altamar representó el 22.5% (44,261 TM) y la de esteros y bahías 11.1% (21,827 TM) en datos reportados por CONAPESCA, 2008 (Figura 4).

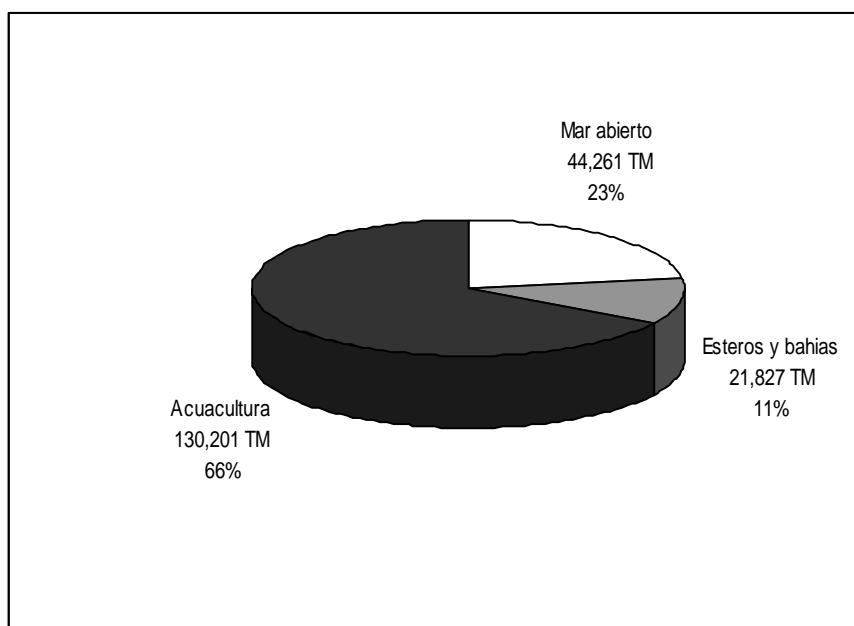


Figura 4. Distribución de la producción camaronícola en México (Anuario, CONAPESCA, 2008).

En la Figura 5 se muestra la producción de camarón de 1997 a 2007. Cabe señalar que los niveles de producción pesquera por captura se mantuvieron constantes, mientras que los de producción en acuicultura aumentaron considerablemente.

Las principales especies de camarones que se encuentran en los litorales mexicanos son: el camarón azul (*L. stylirostris*), blanco (*L. vannamei*), café (*L. californiensis*), rojo (*L. brevisrostris*) y blanco del sur (*L. occidentalis*).

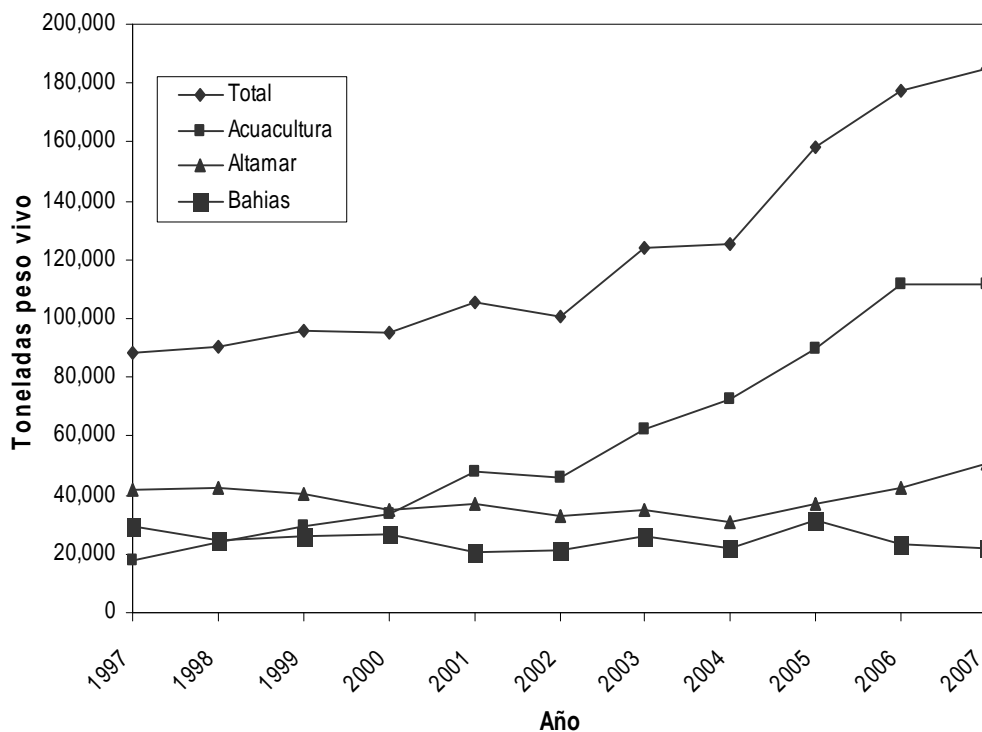


Figura 5. Producción de camarón (peso vivo) 1997-2007 (CONAPESCA, 2008).

En el Golfo de México las capturas en mar abierto se componen principalmente de camarón café (*L. aztecus*). En sistemas de camaronicultura, la especie de mayor importancia es el camarón blanco (*L. vannamei*), principalmente por su tolerancia a las variaciones de los parámetros físicoquímicos y su capacidad de resistencia a enfermedades. En menor escala se utilizan *L. stylirostris* y *L. californiensis* (CONAPESCA, 2008).

2.3. Aprovechamiento de los subproductos del camarón

El camarón es procesado para su exportación de diversas formas con el fin de incrementar su vida de anaquel: congelado, salado, cocido, etcétera. Al limpiar este crustáceo para su comercialización se acumulan desechos que consisten en caparazón, cabezas, patas y vísceras (Hansen e Illanes, 1984), materiales altamente perecederos. En algunas épocas del año se acumulan en exceso, lo que dificulta su manejo antes de su descomposición, generando una contaminación considerable en las zonas de captura (Sachindra y col., 2007). En México solo una pequeña fracción de los desechos de camarón producidos son secados y molidos para la elaboración de harinas de camarón destinadas para alimentación animal, o para la producción de caldos y sopas (Carranco y col., 2003).

Considerando los volúmenes de producción anual en México, se estima que se producen alrededor de 95,000 TM anuales de desperdicios de camarón, los cuales representan un foco de contaminación. Ante la creciente producción de camarón cultivado, es de suponerse que en los próximos años la cantidad de estos desechos aumentará y, por consiguiente, el problema de contaminación se agravará. Por consiguiente, el aprovechamiento de los subproductos del camarón es de gran importancia, tanto desde el punto de vista económico como de los materiales que se obtienen de ellos, como las harinas, los hidrolizados de proteínas, los pigmentos, la quitina, las enzimas, etcétera (Torrissen y col., 1981; Babu y col., 2008). Estos materiales tienen aplicación en industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética, por mencionar algunas. Debido a su alto valor agregado, la producción de materiales a partir del aprovechamiento de los subproductos de camarón pueden reducir los costos de producción en el procesamiento global del crustáceo, además de minimizar su impacto ambiental (Sachindra y col., 2005a; Akdes y col., 2007). El aprovechamiento de los desechos de camarón no necesita de una tecnología sofisticada, y puede llevarse a cabo a través de tecnologías “limpias” (Bhaskar y col., 2007). Asimismo, en el caso de la extracción de astaxantina, el uso de colorantes sintéticos en la industria alimenticia es cada vez más restringido, por lo que continuamente se buscan fuentes de pigmentos naturales que sustituyan a los pigmentos sintéticos.

2.3.1. Producción de alimentos balanceados para aves

De manera particular, la pigmentación de algunos productos avícolas es un aspecto importante para la comercialización de éstos, primordialmente porque los consumidores asocian al color con la calidad de los alimentos. Un ejemplo es la tonalidad amarilla en la piel del pollo y la yema del huevo con la calidad de los mismos (Lai y col., 1996). Por esta razón, es común que en las dietas que se formulan para pollos de engorda y gallinas ponedoras se incluyan xantofilas de fuentes naturales de pigmentos tales como el maíz amarillo, el gluten de maíz, la harina de alfalfa, extractos de xantofilas de la flor de cempasúchil, así como pigmentos sintéticos (cantaxantina) (Cuca y col., 1990). Entre las nuevas fuentes de pigmentos incluidas en las dietas de animales se han evaluado las algas, los pastos y algunas harinas de crustáceos (García y Alcalá, 1998). En la industria avícola, el empleo de los pigmentos representa entre 3 y 10% del costo de producción. Los carotenoides permitidos por la FDA y la OMS como aditivos en alimentación avícola son: luteína, zeaxantina, cantaxantina y astaxantina (Becerril y col., 1988). Arellano y col. (1997) encontraron que al incorporar niveles desde 0, 3, 6 y 9% de harina de cabezas de camarón en dietas para pollos, la yema de huevo incrementó su color en la misma proporción que las cantidades adicionadas de la harina.

En otro estudio, Gernat (2001) reportó el efecto de la sustitución de la harina de soya en la dieta de gallinas por desechos de camarón deshidratado en concentraciones de 0, 20, 40, 50 y 80%. Los resultados mostraron que estos desechos pueden ser utilizados en altas concentraciones en estas dietas sin causar efectos negativos en la producción de huevo y mejorando la coloración de la yema. Carranco y col. (2003) evaluaron el efecto de la incorporación de 10, 20 y 25% de harina de cabezas de camarón en raciones para gallinas ponedoras sobre la concentración de pigmento rojo de la yema y la calidad general del huevo. Con la inclusión de 20% de harina de cabezas de camarón se detectó la mayor coloración en la yema del huevo, mientras que con 25% se observó una disminución de astaxantina en yema, por lo que los autores concluyeron que para proporcionar la coloración amarilla a la yema, no debe adicionarse harina de cabezas de camarón en una proporción mayor al 25%.

2.3.2. Obtención de quitina

La quitina (del griego χιτών chitón - túnica, envoltura) es un polisacárido que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, constituyendo el segundo polímero más abundante después de la celulosa. Está constituida por moléculas de β -(1,4)-N-acetil-glucosamina (Coward y Kelly, 2006), se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos (caparazones), alas de insectos, exoesqueleto de artrópodos, así como también en las paredes celulares de algunos hongos y algas (Shirai y col., 1996; Lares-Velázquez, 2006).

Este compuesto ha despertado gran interés en los investigadores debido a que anualmente se obtienen en el mundo grandes volúmenes (120,000 TM) a partir de los desechos de crustáceos, los cuales contienen entre 14 y 35% de quitina asociada con proteínas; por otro lado, la quitina es de lenta degradación en el medio ambiente, por lo que presenta problemas de contaminación. Es considerada como el componente más importante en los desechos de crustáceos; el quitosano es el derivado principal de la quitina, que puede ser obtenido mediante un proceso químico o enzimático de desacetilación (Horton y col., 1993).

A pesar de que existen diversas fuentes industriales de quitina, como los hongos *Mucor rouxi* y *Choanephora cucurbitarum*, con 30 y 28% de quitosana respectivamente, y las diatomeas marinas, *Cyclotella cryptica* y *Thalassiosira fluviatilis*, la principal fuente para la obtención de este polímero son los desechos de los crustáceos, especialmente de los caparazones del cangrejo, langosta y camarón, debido al fácil acceso a la materia prima en las plantas procesadoras de estas especies (No y col., 1989; Majeti, 2000; Lares-Velázquez, 2006). En el

caso del camarón y el cangrejo, la quitina representa de 14 a 27% y de 13 a 15%, respectivamente.

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de extracción empleado. Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas y dependen en gran medida de las características de la fuente de crustáceo de que se trate, ya que la composición de los desechos varía de una especie a otra. En cutículas de crustáceos, la quitina está íntimamente asociada con las proteínas, sales inorgánicas (como el carbonato de calcio) y pequeñas cantidad de lípidos y pigmentos, así que el aislamiento comprende varias etapas de purificación. El proceso comercial para la recuperación de quitina implica tres operaciones básicas:

1. Eliminación del residual proteico: desproteínización por álcali a temperatura moderada
2. Eliminación de la materia inorgánica: desmineralización con ácidos diluidos
3. Eliminación de pigmentos carotenoides y lípidos con solventes orgánicos

La extracción de la quitina se puede realizar después de la extracción de la fase oleosa, aunque las condiciones de proceso pueden ser adaptadas para obtener características específicas de la quitina, de acuerdo con el fin al que se le destine. Recientemente, los procesos enzimáticos y biotecnológicos han sido utilizados en la obtención de quitina. La fermentación bacteriana ha sido sugerida como una alternativa tecnológica para el pre-tratamiento de desechos de camarones, teniendo la ventaja de permitir la recuperación de enzimas, proteínas y pigmentos, además de la obtención de la quitina (Cira y col., 2002).

La quitina y el quitosano tienen numerosas aplicaciones en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica. Se utilizan como agentes espesantes, gelificantes, dispersantes, en productos médicos o en cosméticos, así como en la elaboración de pinturas, textiles, en el tratamiento de aguas residuales y como suplemento dietético (Pacheco y col., 2009). Se ha establecido que el quitosano no puede ser digerida por los seres humanos, así que está considerada como fibra dietética con un contenido calórico cero.

2.3.3. Obtención de proteínas y lípidos

A partir de los desechos de crustáceos pueden ser obtenidos hidrolizados proteicos los cuales tienen un buen balance de aminoácidos esenciales, principalmente ácidos aspártico y glutámico, con un patrón de distribución similar a la materia prima original (Shahidi y Synowiecki, 1991). Asimismo, se ha observado actividad proteolítica en los desechos de

crustáceos, lo cual hace posible considerar la posibilidad de recuperación de algunos componentes como enzimas, principalmente proteasas (Shirai y col., 1996).

En los desechos de camarón se encuentran pequeñas cantidades de lípidos. Estos, al igual que en ciertas variedades de peces también contienen ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) reportados por algunos autores (Guillou, 1995).

2.4. Pigmentos

2.4.1. El color

De manera general, el color puede ser definido como aquella parte de la energía radiante que el ser humano percibe mediante la estimulación de la retina del ojo a longitudes de onda entre 380 y 780 nm. El color de un objeto no es una propiedad del mismo ni de la luz que incide sobre este, es el efecto de un estímulo sobre la retina que el nervio óptico transmite al cerebro, donde este último lo integra. El estímulo, a su vez, consiste en una luz reflejada o transmitida por el objeto, a partir de una iluminación incidente (Cheftel, 1992).

El color es un factor importante para valorar la calidad de un alimento; la aceptación o rechazo de un producto por parte del consumidor depende en gran medida de su apariencia y color. Ambos, apariencia y color, son los atributos de calidad más importantes de los alimentos debido a nuestra capacidad y facilidad para percibir estas características ya que son las primeras evaluadas por el consumidor al adquirir los alimentos (Fennema, 1995). Los colores de los alimentos se deben a diferentes compuestos, algunos de los cuales se producen durante su manejo y almacenamiento. Sin embargo, el color en los alimentos es el resultado de la presencia de las sustancias pigmentantes que contienen o que se añaden.

2.4.2. Pigmentos sintéticos y naturales

De acuerdo a la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), un colorante o pigmento es aquel compuesto obtenido por la síntesis o artificio similar o extraído, aislado o derivado, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente, y que cuando es añadida o aplicada a alimentos, medicamentos o cosméticos, por sí misma es capaz de impartir color (Hayward, 1992; Tafoya y García, 1993).

En México, la Secretaría de Salud enfoca la definición de pigmento al origen de las sustancias pigmentantes, caracterizándolas como aquellas obtenidas de los vegetales, animales, minerales o por síntesis química, y que es empleada para impartir o acentuar el color, sin especificar su uso o aplicación (Diario Oficial, 1995).

Del conjunto de los aditivos alimentarios, el grupo de los colorantes es, probablemente, el que mayor polémica ha originado entre los consumidores. Frecuentemente, se les considera aditivos de dudosa utilidad por cuanto no influyen en la calidad del producto respecto a su conservación o calidad nutritiva. Sin embargo, debe considerarse que algunas sustancias, como el β -caroteno o la riboflavina, no son solo colorantes sino también nutrientes.

La industria de pigmentos es una de las de mayor número de ventas a nivel mundial; se producen 700 TM/año de pigmentos naturales y sintéticos; los sintéticos tienen un volumen anual de ventas de 400 millones de dólares, de los cuales el 50% está dirigido a la industria textil y el 25% a la industria alimentaria. Por su parte, el mercado mundial de pigmentos naturales representa 940 millones de dólares al año en ventas y se estima un crecimiento del 4% anual (Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

De acuerdo con su origen o procedencia, los colorantes pueden clasificarse en tres grandes grupos: naturales, idénticos a naturales y sintéticos (Dalzell, 1997). Los colorantes sintéticos son aquellos que no son generados por la naturaleza sino son producidos por síntesis química. Por el contrario, los pigmentos naturales son generados por vegetales o animales, o bien encontrados en minerales; los idénticos a naturales también son producidos por síntesis química, pero con características semejantes a los naturales, aunque algunas veces este grupo está incluido en los colorantes sintéticos. Actualmente existe la tendencia a utilizar, cuando es posible, colorantes naturales en lugar de los sintéticos ya que se cree que son inocuos y, por tanto, sin riesgo para la salud humana (Hendry y Houghton, 1996). Esto ha motivado a que los colorantes sintéticos hayan sido estudiados en forma exhaustiva en lo que respecta a su efecto sobre la salud, más aún que los colorantes naturales. Esto ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque existen grandes variaciones de un país a otro (Noonan y Meggos, 1980). Los colorantes sintéticos ofrecen diversas ventajas tales como firmeza de color, bajo costo, alto poder tintóreo, homogeneidad entre lotes y carecen de aroma o sabor; sin embargo, su incorporación a los alimentos sigue siendo motivo de preocupación para los consumidores por lo que cada vez se trata de restringir más su uso.

Por el contrario, los pigmentos naturales ofrecen menores ventajas y su obtención aún es costosa, pero al estar considerados como inocuos han tenido gran auge en la industria alimentaria y su mercado de ventas ha aumentando.

Los colorantes sintéticos utilizados en alimentos deben cumplir con ciertos requisitos básicos con el fin de prevenir riesgos para la salud de los consumidores y garantizar su utilidad. Los requisitos exigidos son inocuidad, pureza química, gran poder tintóreo, facilidad de incorporación al alimento; estabilidad a la luz, al calor y a los cambios de acidez y alcalinidad; compatibilidad con los productos que van a teñir, no impartir olores ni sabores desagradables para no alterar las características del alimento que colorean y economía (Calvo, 1999).

En Estados Unidos, desde 1938 el uso de colorantes está controlado por la FDA, organismo que reconoce dos categorías de colorantes: los certificados y los exentos de certificación. La certificación consiste en realizar análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos a los colorantes que garanticen la salud de los consumidores. La designación “certificados FD&C” significa que el colorante cumple con las normas gubernamentales. Los colorantes certificados se engloban en cuatro clases químicas: compuestos tipo azo, trifenilmetano, xantana e índigo. Además, se requiere que cuando se utilicen aparezca en el etiquetado la frase “colorante añadido”. La lista actual de colorantes certificados permitidos contiene siete productos de uso general, todos ellos condicionados a buenas prácticas de elaboración. También se incluye dos colorantes adicionales, Anaranjado B y Cítrico No. 2, aunque su uso se limita a aplicaciones específicas.

Las autoridades legislativas de la Unión Europea intentaron uniformizar los colorantes de los países del Mercado Común; sin embargo esto no fue posible y, dependiendo del país, se permite el uso de determinados colorantes (Tabla 3), asignándose a los permitidos un número que se coloca antes de la letra E de Europa (Francis, 1999). En México, la reglamentación de aditivos coloridos esta a cargo de la Secretaría de Salud a través del Reglamento de Aditivos de Alimentos. En dicho reglamento se mencionan los colorantes órgano-sintéticos permitidos en alimentos. Existe gran semejanza entre las reglamentaciones que permiten el uso de los pigmentos sintéticos, aprobadas en México y en los Estados Unidos.

Los colorantes naturales no requieren de certificación, al igual que los químicamente idénticos a los naturales, aunque están sujetos a las mismas pruebas de seguridad y calidad que los sintéticos y deben ajustarse a ciertas limitaciones en cuanto a la cantidad máxima permitida en un alimento.

Tabla 3. Colorantes sintéticos permitidos en la Unión Europea y FDA, y su situación en varios países (Fennema, 1995; Francis, 1999).

Nombre	Clave Unión Europea	Nombre FDA	Situación legal			
			Unión Europea	Estados Unidos	Canadá	Japón
Eritrosina	E 123	FD&C Rojo No. 3	+	+	+	+
Azul brillante	---	FD&C Azul No. 1	+ c	+	+	+
Indigotina	E 132	FD&C Azul No. 2	+	+	+	+
Tartrazina	E 102	FD&C Amarillo No. 5	+ d	+	+	+
Amarillo subset	E 104	FD&C Amarillo No. 6	+ e	---	---	---
Rojo allura	---	FD&C Rojo No. 40	---	+	+	---
Amarillo 2G	E 107		+ f	--	---	---
Ponceau 4R	E 124		+ d	---	---	+
Carmoisina	E 122		+ d,e,g	---	---	---
amaranto	E 123	FD&C Rojo No. 2	+ d	---	+	---
Rojo 2G	E 128		+ f	---	---	---
Azul patentado	E 131		+ d	---	---	---
Verde S	E 142		+ d,e,g	---	---	---
Pardo FK	E 154		+ f	---	---	---
Pardo chocolate HT	E 155		+ h	---	---	---
Negro PN	E 151		+ d,e	---	---	---

+ a Permitido para uso en alimentos

b En Noruega están prohibidos los colorantes sintéticos

c Permitido en Dinamarca, Irlanda y Holanda

d Prohibido en Finlandia

e Prohibido en Portugal

f Permitido sólo en Irlanda

g Prohibido en Suecia

h Permitido en Holanda e Irlanda

Entre los pigmentos naturales que tienen mayor consumo y valor comercial como colorantes de alimentos se encuentran las antocianinas, betalaínas, carotenoides, flavonoides, curcumina, bixina y crocetina.

La Tabla 4 enlista algunos pigmentos naturales utilizados en alimentos y exentos de certificación. La Secretaría de Salud refiere que aunque estos colorantes no requieren de certificación, deben cumplir con ciertas especificaciones químicas y toxicológicas.

En la industria alimentaria los colorantes naturales pueden emplearse como polvos o líquidos y en ocasiones el polvo se prepara como aceite esencial u oleorresina (Calvo, 1999). Los colorantes en polvo tienen la ventaja de economizar costos de transporte y almacenamiento, además de garantizar una mejor conservación de sus propiedades. En México, el mercado de

los colorantes naturales está cubierto por los amarillo-naranja (55%), rojos (25%) y colorantes de otro tipo (20%). Nuestro país se puede convertir en productor de colorantes naturales si se explotan las fuentes potenciales de estos pigmentos.

Tabla 4. Algunos pigmentos naturales utilizados como colorantes (Guerrero y col., 2006).

Achiote, annato (extracto de semilla de <i>Bixa orellana</i>)	Éster apocarotenoico
Azafrán (estigmas de <i>Crocus sativus</i>)	Extracto de color uva (antocianina)
β -apo-8'-carotenal	Extracto de cáscara de uva (enocianina)
β -caroteno	Harina y extracto de cempasúchil <i>Tagetes erecta</i> (solo para alimento animal)
Betabel deshidratado	Harina de semilla de algodón, cocida, tostada parcialmente
Cantaxantina	Jugo de frutas
Clorofila	Jugo de vegetales
Color caramelo	Pimentón (polvo y oleoresina)
Cochinilla (extracto de <i>Coccus cacti</i>)	Riboflavina
Cúrcuma (polvo y oleoresina) de rizoma de <i>Curcuma longa</i>	

2.4.3. Los pigmentos en los alimentos

Los alimentos deben su color a estas sustancias pigmentantes que contienen de manera natural; sin embargo, estos pigmentos pueden descomponerse en presencia de luz, oxígeno, metales, altas temperaturas y debido a la acidez o alcalinidad del medio. Es por ello que en la industria alimentaria los colorantes son adicionados por las siguientes razones: 1) devolver o intensificar el color en los alimentos cuando el color natural ha sido disminuido por el procesamiento; 2) asegurar uniformidad en tonos y evitar variaciones en la intensidad de los mismos; 3) como indicador visual de la calidad del producto; 4) conservar la identidad y el carácter de los alimentos (Francis, 1999; Fennema, 1995; Rodríguez, 2002).

En términos generales, los pigmentos naturales relacionados con los alimentos se dividen en ocho tipos: clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides, betalainas, taninos, hemopigmentos y otros. La mayoría se encuentran en productos vegetales, aunque los

carotenoides también se pueden encontrar en crustáceos y algunos microorganismos como levaduras y algas (Guerrero y col., 2006).

2.5. Los carotenoides

2.5.1. Características

El estudio de los carotenoides se inició en 1831 cuando Wackenroder logró aislar estos compuestos en su forma cristalina a partir de la zanahoria (*Daucus carota* L.), desde entonces han sido objeto de numerosas investigaciones a cerca de sus funciones y propiedades (Guerrero y col., 2006).

Los carotenoides son un grupo numeroso de pigmentos ampliamente difundidos en la naturaleza, responsables del color amarillo, naranja y rojo de diversos productos como frutas y verduras (jitomate, piña, cítricos), raíces (zanahoria), flores (cempasúchil y girasol), semillas (achiote), músculo de algunos peces (salmón y trucha), invertebrados (camarón, langosta) y plumaje de algunos flamencos y canarios. También se han encontrado en algas (*Haematococcus sp.*), bacterias (*Corynebacterium poinsetiae*) y levaduras (*Phaffia rhodozyma*), aunque en este caso, se producen cuando se encuentran sujetos a condiciones extremas. Se encuentran en las hojas verdes de plantas, aunque en éstas hacen su aparición cuando la clorofila desaparece durante el invierno. Cabe aclarar que la presencia de carotenoides en animales es debido a su ingesta en la dieta, ya que éstos no pueden sintetizarlos *de novo* (Rodríguez-Amaya, 1999a; Negeswara y col., 2005; Guerrero y col., 2006). Se han identificado en la naturaleza más de 600 de estos compuestos, con una producción estimada en 100 millones de TM/año; la mayor parte de esta cantidad en forma de fucoxantina en diversas algas, y de los tres principales carotenoides de las hojas: luteína, violaxantina y neoxantina (Meléndez-Martínez, 2004). Otros, como el β -caroteno se produce en menor proporción, pero se encuentra muy difundido (Fennema, 1995; Francis, 1999).

Además de impartir color, los carotenoides sirven para la absorción de energía luminosa y, por tanto, tienen poder antioxidante al interrumpir las reacciones mediadas por radicales libres, sin modificar su estructura. Además, algunos de ellos son precursores de la vitamina A, entre otras funciones (De la Fuente y col., 2006; Babu y col., 2008).

2.5.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los carotenoides son hidrocarburos polienicos, por tanto presentan cadenas de dobles enlaces conjugados (Guerrero y col., 2006). Esta parte de la molécula, denominada cromóforo, es la responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y explica el color intenso de estos compuestos. El espectro de absorción tiene máximos cuyas longitudes de onda dependen del número de los dobles enlaces. Se requiere de, al menos, siete enlaces conjugados para que estos compuestos produzcan color (Rodríguez-Amaya, 1999a; De Man, 1999). La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos (Figura 6), unidas por enlaces covalentes, de tal manera que la disposición de las unidades de isopreno se encuentran invertidas desde el centro de la molécula (Rodríguez Amaya, 1999b).

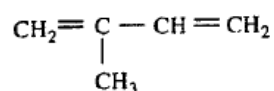


Figura 6. Estructura química del isopreno.

Debido a esta estructura, los carotenoides pueden dar como resultado un gran número de isómeros geométricos con las configuraciones *cis* y *trans*. La gran mayoría de los carotenoides en la naturaleza se encuentran en la forma *all-trans*, solo se conocen unos pocos isómeros *cis* los cuales se encuentran en los tejidos vegetales, especialmente en algas (Guerrero y col., 2006), que se utilizan como fuente de carotenoides (Fennema, 1995). El doble enlace *cis* ocasiona un impedimento estérico entre los átomos de hidrógeno y los grupos metilo más cercanos, es por ello que los isómeros *cis* son termodinámicamente menos estables que la forma *trans*. Cabe señalar que solo los dobles enlaces en posición *trans* son biológicamente activos (Fennema 1995; Rodríguez-Amaya, 1999b).

Las modificaciones en la estructura química pueden ser debidas a reacciones de hidrogenación, isomerización o migración del doble enlace, entre otras, dando como resultado una gran diversidad de estructuras (Rodríguez-Amaya, 1999b; Rodríguez, 2002). Otros carotenoides pueden tener estructuras carbonadas más cortas; son los apocarotenoides (Fennema, 1995).

Los carotenoides más abundantes son α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina y la luteína. El β -caroteno es generalmente usado como ejemplo de la estructura básica de carotenoides

(Figura 7); éste tiene dos anillos de β -ionona en los extremos de la molécula, unidos por un sistema de doble enlaces conjugados (Francis, 1999).

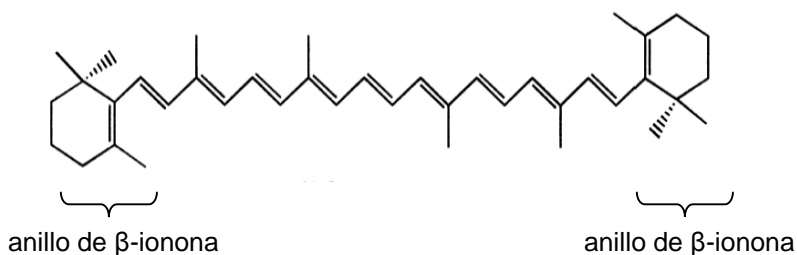


Figura 7. Estructura química del β -caroteno.

Los carotenoides en peces y crustáceos están asociados con proteínas (carotenoproteínas o lipoglucoproteínas). En invertebrados, como el camarón, el cangrejo y la langosta, el carotenoide astaxantina forma complejos carotenoproteicos azules, verdes o púrpuras. Durante la cocción, la desnaturalización de la proteína libera la astaxantina y se manifiesta el color rojo-naranja de estos crustáceos (Francis, 1999; Armenta, 2002; Luna, 2003). Los pigmentos unidos con proteínas son más estables que la forma libre; esta molécula combinada facilita la interacción con medios acuosos (Rodríguez-Amaya, 1999a ; Armenta, 2002).

Debido a su estructura altamente conjugada e insaturada, los carotenoides son susceptibles de sufrir oxidación (combinación con oxígeno) e isomerización (cambio en la geometría del doble enlace) durante el procesamiento de alimentos. Factores como la luz, la temperatura, la exposición a disolventes orgánicos y los tratamientos con ácidos promueven la isomerización de la forma *trans* a la *cis* (Fennema, 1995). Sin embargo, la principal causa de degradación de carotenoides es la oxidación, que ocurre especialmente en los dobles enlaces y depende del oxígeno disponible. El proceso de oxidación y la subsiguiente desintegración de los carotenoides se inician en un extremo de la molécula; éste no es un proceso al azar, ya que siempre ocurren en el extremo abierto antes que en anillo terminal de ionona. A medida que se saturan las dobles ligaduras y finalmente se rompen, el color característico de estos compuestos va desapareciendo (Mordi y col., 1993). La luz, las altas temperaturas, los metales, y los peróxidos favorecen la oxidación, la cual puede ser inhibida por antioxidantes como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C) (Rodríguez Amaya, 1999b; Guerrero y col., 2006). Los carotenoides también se oxidan en presencia de lipoxigenasas, no de forma directa sino a través de la formación de hidroperóxidos.

La estabilidad de los pigmentos carotenoides a la oxidación depende del medio en el que se encuentran. En los tejidos de las plantas, los carotenoides se encuentran protegidos de la oxidación; sin embargo, la lesión física de los tejidos o extracción de los carotenoides aumenta su susceptibilidad, por lo tanto los carotenoides son mucho más estables a la oxidación en su forma natural que en los sistemas puros. Como consecuencia de la oxidación e isomerización, además de la pérdida de color, ocurre la disminución de sus funciones biológicas. Asimismo, la degradación de los carotenoides también se asocia con el desarrollo de sabores y olores desagradables. (Rodríguez.Amaya, 1999b).

2.5.3. Carotenos y xantofilas

Químicamente los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos son hidrocarburos poliinsaturados, solubles en éter de petróleo, hexano y tolueno, y poco solubles en etanol. Ejemplos de estos son licopeno, α y β -caroteno (Figura 8).

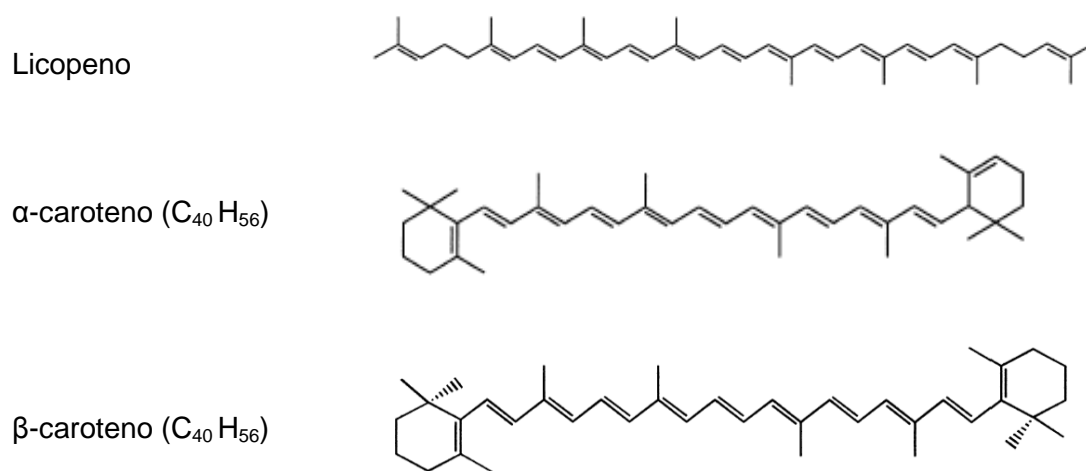


Figura 8. Estructura de algunos carotenos.

Las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenos. Las funciones oxigenadas más comunes son los grupos hidroxilo (OH) en luteína y zeaxantina; ceto (C=O) en cantaxantina, o ambos como en astaxantina (Calvo, 1989). También se pueden encontrar los grupos aldehído (CHO), carboxi (CO₂H), metoxi (OMe) y epoxi (epóxidos 5,6 ó 5,8); ejemplos de estos compuestos son la fucoxantina, la luteína y la violaxantina. Las xantofilas son solubles en

metanol, etanol y éter de petróleo. Las xantofilas son las más abundantes en la naturaleza, aunque el β -caroteno es el más utilizado como colorante en alimentos (Rodríguez-Amaya, 2001). En la Figura 9 se muestran algunas estructuras de xantofilas.

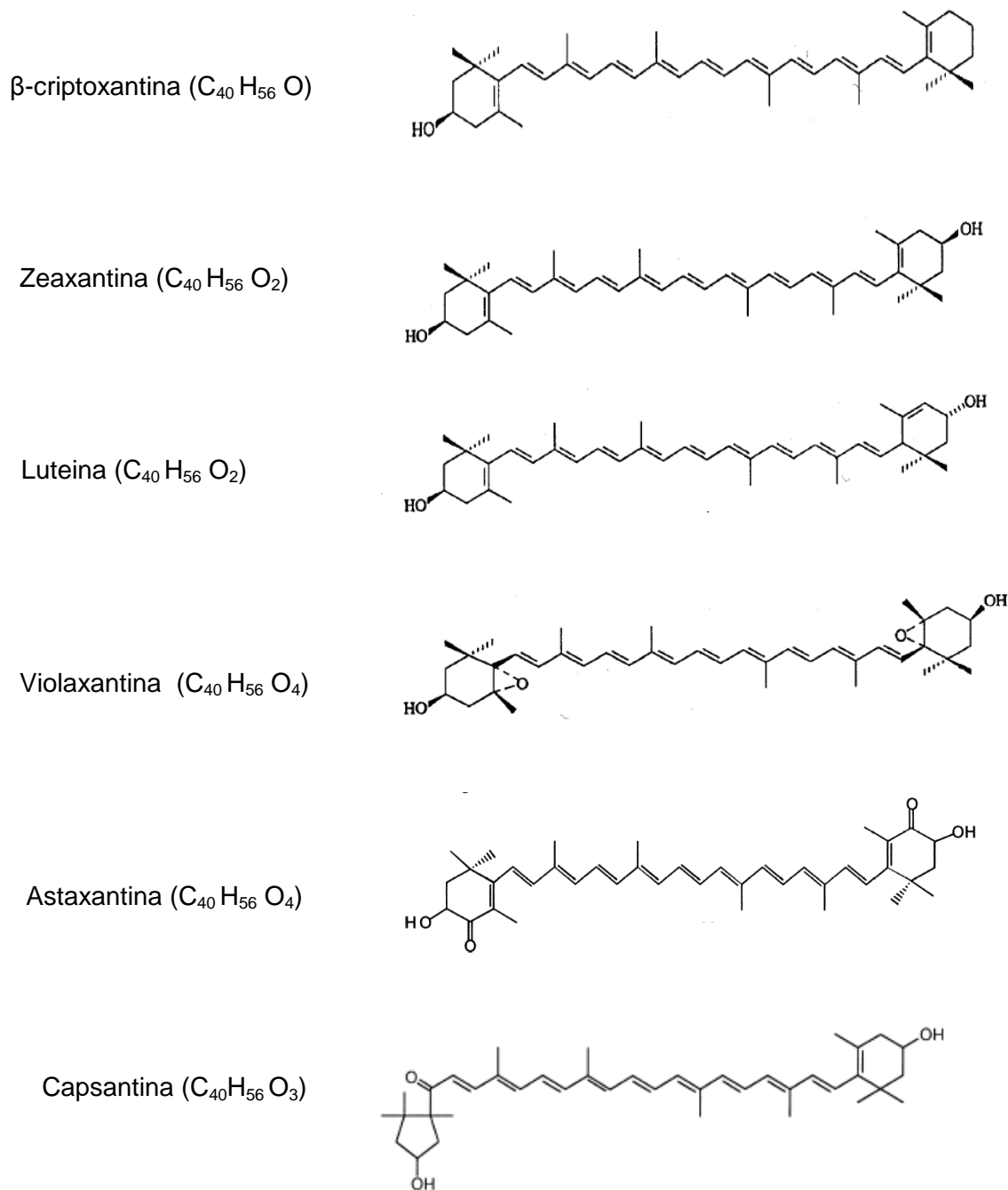


Figura 9. Estructura de algunas xantofilas.

Los carotenoides, sean carotenos o xantofilas pueden ser acíclicos (licopeno), monocíclicos o bicíclicos. La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, formando uno o dos anillos β -ionona de seis miembros o anillos ϵ (denominados α -ionona). El monocíclico γ -caroteno tiene un anillo β , mientras los bicíclicos β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y astaxantina tienen dos de estos anillos. Los bicíclicos α -caroteno y luteína tienen cada un anillo β y un anillo ϵ (Rodríguez Amaya, 1999b).

2.5.4. Función biológica

La importancia de los carotenoides en los alimentos va más allá de su rol como pigmentos naturales. Debido a sus características se han atribuido a estos compuestos funciones y acciones biológicas importantes. En la Figura 10 se muestran algunas de las principales funciones biológicas de los carotenoides. Se ha encontrado que tienen mayor actividad biológica los que presentan nueve o más dobles enlaces conjugados y grupos en los extremos de su estructura, siendo los estudiados el β -caroteno, el licopeno, la luteína y la zeaxantina (Edge y col., 1997; Armenta, 2002).

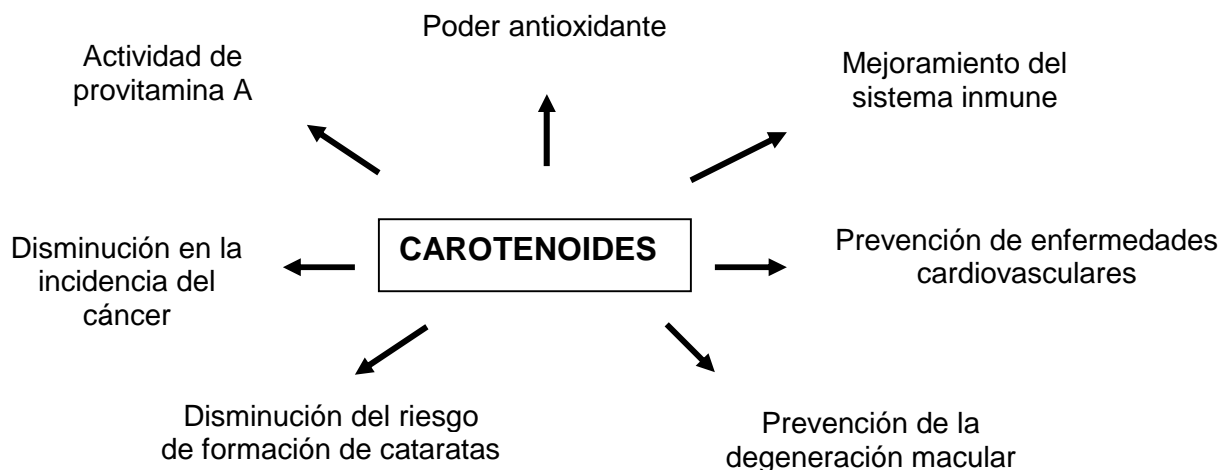


Figura 10. Funciones biológicas de los carotenoides.

Algunos estudios epidemiológicos indican que el consumo de alimentos ricos en carotenoides está relacionado con un menor riesgo de incidencia de enfermedades crónicas, aunque los resultados no son concluyentes (Su y col., 2002; Krinsky, 2005). Esto ha motivado que se intensifique la investigación al respecto, y más recientemente, el interés se ha centrado en la

presencia de isómeros de los carotenoides en la dieta, inducidos por el procesado y su significado fisiológico.

Durante años se ha estudiado el papel que desempeñan los carotenoides en la dieta humana y animales en relación a su capacidad como precursores de la vitamina A (Britton, 1996; Su y col., 2002). El más importante como provitamina A es el β -caroteno, tanto en términos de bioactividad como de amplia incidencia. Otros carotenoides con esta característica son α -caroteno y β -criptoxantina. La condición fundamental para que posean actividad vitamínica es que tengan ciclado y sin oxidar al menos uno de los anillos de los extremos de la estructura, ya que la mucosa intestinal de los animales superiores los oxida y los transforma en retinal. Por consiguiente, varios de los carotenoides más comunes, como el licopeno, la zeaxantina y la luteína no tienen valor como provitamina A, aunque son muy importantes como pigmentos (Rodríguez-Amaya, 1999a).

Los radicales libres (hidroxilo y peróxido) y las formas altamente reactivas del oxígeno (oxígeno singulete, O_2) son producidas en el cuerpo durante las reacciones y procesos metabólicos normales, llegando a dañar a las células. Algunos factores como la contaminación ambiental, el humo de tabaco y la luz ultravioleta, entre otros factores, pueden elevar la producción de estas especies reactivas. La alta concentración de estos compuestos puede dañar el ADN, las proteínas y las membranas lipídicas. Se ha considerado que estos radicales libres están relacionados con algunas enfermedades crónicas del corazón y de los pulmones, así como artritis e incluso el cáncer (Nishino 1997; Krinsky y Johnson, 2005). Se han desarrollado diversas investigaciones sobre el papel que desempeñan los carotenoides como antioxidantes contra el efecto dañino que provocan los radicales libres producto del metabolismo celular (Shimidzu y col., 1996; Moreno-Álvarez y col., 1999; Padrón y Moreno-Álvarez, 1999; Stahl y Sies, 2003). Las dobles ligaduras inhiben el efecto del oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y los radicales libres, por lo que tiene actividad inhibitoria en la oxidación de las grasas (Liu y Osawa, 2007; Chen y col., 2007). Algunos estudios relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, por lo que son considerados compuestos anticancerígenos; estos estudios reportan que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de vegetales y frutas ricos en carotenoides (Meléndez-Martínez y col., 2004). Se ha asociado el consumo de frutas y verduras con la disminución del 30 a 50% en la incidencia de varios tipos de cáncer de pulmón, estómago y piel (Zeigler, 1989; Mayne y col., 1994; Su y col., 2002). También se ha relacionado el consumo de carotenoides con el aumento de actividad del sistema inmune y la disminución del riesgo de

enfermedades degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares, degeneración macular relacionada a la edad y formación de cataratas (Mayne, 1994; Krinsky, 2005). Estos efectos biológicos se han atribuido también a la propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres y la captura del oxígeno singulete (Palozza y Krinsky, 1992).

Cabe señalar que la mayoría de los estudios sobre la actividad antioxidante de los carotenoides se han llevado a cabo *in vitro*, aunque en los últimos años el número de ensayos *in vivo* ha aumentado considerablemente (Meléndez-Martínez y col., 2004).

2.5.5. Fuentes de obtención

Debido a su amplia distribución en la naturaleza, las fuentes de carotenoides son variadas. En vegetales, los carotenoides están presentes en los cloroplastos de todas las plantas superiores, en mayor abundancia se encuentran luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina, y en pequeñas cantidades zeaxantina, β -criptoxantina y anteraxantina. En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del jitomate.

En ciertos frutos ocurre que algún carotenoide, además de ser mayoritario, se limita a una sola especie de plantas. La capsantina y la capsorrubina se encuentran casi exclusivamente en frutos del género *Capsicum*; son los principales pigmentos que dan color al pimiento rojo. Además, el patrón de carotenoides en un mismo fruto varía en función de factores como la variedad y las condiciones climáticas, entre otros. La luteína se extrae de las flores caléndulas, como el cempasúchil, y se encuentra en bajas concentraciones en otras flores y en frutas; la zeaxantina es aislada de algas y maíz, mientras que la criptoxantina se obtiene de cítricos y frutos tropicales (Guerrero y col., 2006).

Los carotenoides se incorporan en los organismos animales a través de la dieta y se almacenan en el tejido adiposo sin transformarse. La yema del huevo debe su color a dos xantofilas: luteína y zeaxantina, y a trazas de β -caroteno, mientras que la astaxantina es responsable del color rosado de la carne del salmón. En ocasiones, algunos carotenoides como la astaxantina, se unen a proteínas originando las carotenoproteínas en los crustáceos que confieren colores verdosos o azulados, si bien cuando estos complejos se desnaturalizan durante la aplicación de calor se pone de manifiesto el color rojo del carotenoide.

2.5.6. Análisis

Los carotenoides son compuestos lipofílicos, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como acetona, etanol, éter etílico, tetrahidrofurano y cloroformo. En los procedimientos de extracción para la separación cuantitativa de los carotenoides se utilizan disolventes orgánicos que deben penetrar en la matriz hidrofílica, como hexano o éter de petróleo en frío, en ausencia de luz. También se emplean mezclas de solventes como hexano-acetona para este fin. Casi todos los carotenoides son estables a los álcalis, por ello se debe realizar una saponificación preliminar con hidróxido de potasio en metanol para facilitar su purificación. Se han desarrollado métodos cromatográficos para la separación de carotenoides utilizando cromatografía en capa fina en poliamidas, silicagel, celulosa, etcétera. Aunque existen diversos métodos analíticos para su cuantificación, la más empleada es la basada en la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) debido a que se puede llevar a cabo a bajas temperaturas, en ausencia de luz y aire, además de presentar alta sensibilidad por los grupos dienos conjugados. Aunque se pueden utilizar columnas de fase normal, son más utilizadas las de fase reversa, especialmente las de octadecilsilano (C₁₈). Se presentan retos analíticos especiales cuando hay que separar e identificar ésteres de carotenoides, isómeros *cis-trans* e isómeros ópticos (Guerrero y col., 2006; Fennema, 1995). Los carotenoides absorben luz en la región visible con máximos entre 430 a 480 nm, aunque muchos de estos compuestos presentan desplazamientos espectrales después de reaccionar con diversos agentes químicos; estos cambios se emplean en su identificación.

2.6. Astaxantina

La astaxantina es el principal pigmento encontrado en animales acuáticos tales como salmón, trucha, camarón, langosta, etcétera (Shahidi y col., 1994; Higuera-Ciapara, 2006; Liu y Osawa, 2007). En la naturaleza, la astaxantina es sintetizada solo por las microalgas, las levaduras y algunas bacterias, que después pasan a ser parte de la cadena alimenticia. Los salmones y otros animales acuáticos no pueden sintetizar este pigmento, por lo que tienen que adquirirlo a través de la dieta (Lorenz y Cysewsky, 2000; Hirschberg, 2001). Por esto, la astaxantina es utilizada principalmente en acuicultura para la pigmentación de salmónidos, debido a que proporciona el color característico al músculo de salmón, el cual le da exclusividad a su imagen como alimento.

2.6.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas

Este oxicarotenoide (3,3'-dihidroxi, 4,4'-diona, β,β -caroteno) pertenece al grupo de las xantofilas. Como otros carotenoides está formado por ocho unidades de isopreno (Figura 11).

La fórmula de este carotenoide es $C_{40}H_{52}O_4$, con un peso molecular aproximado de 596.85, se distingue por tener una cadena polienica de once dobles enlaces conjugados proporcionando un intenso color rojo-naranja característico (Higuera-Ciapara, 2006); en forma pura se presenta como cristales de color violeta oscuro. Fue identificado químicamente por Kühn y Sorenson (1983). Su punto de fusión de $215^{\circ}C$, es insoluble en soluciones acuosas pero soluble en diclorometano, cloroformo, acetona, dimetilsulfoxido y otros solventes polares.

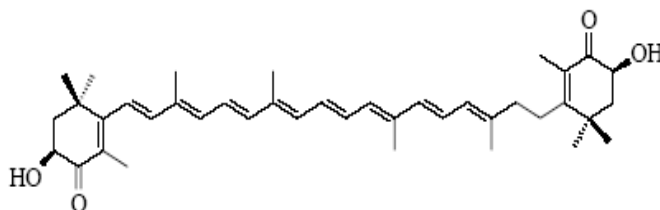


Figura 11. Estructura química de la astaxantina (3S,3'S).

La molécula de astaxantina presenta dos carbonos asimétricos en las posiciones C3 y C3' de los anillos bencénicos, los varios enantiómeros de la molécula son consecuencia de las distintas formas en que los grupos hidroxilo se unen a los centros asimétricos de los átomos de carbono (Figura 12). Se observan tres configuraciones: los enantiómeros idénticos (3R, 3'R y 3S, 3'S) y la forma meso (3R, 3'S), todos en configuración *all-trans* (Turujman y col., 1997; Lorenz y Cysewski, 2000; Britton y col., 2008). Los estereoisómeros forman una mezcla racémica en una proporción 1:2:1. La astaxantina sintética es una mezcla de estos tres isómeros.

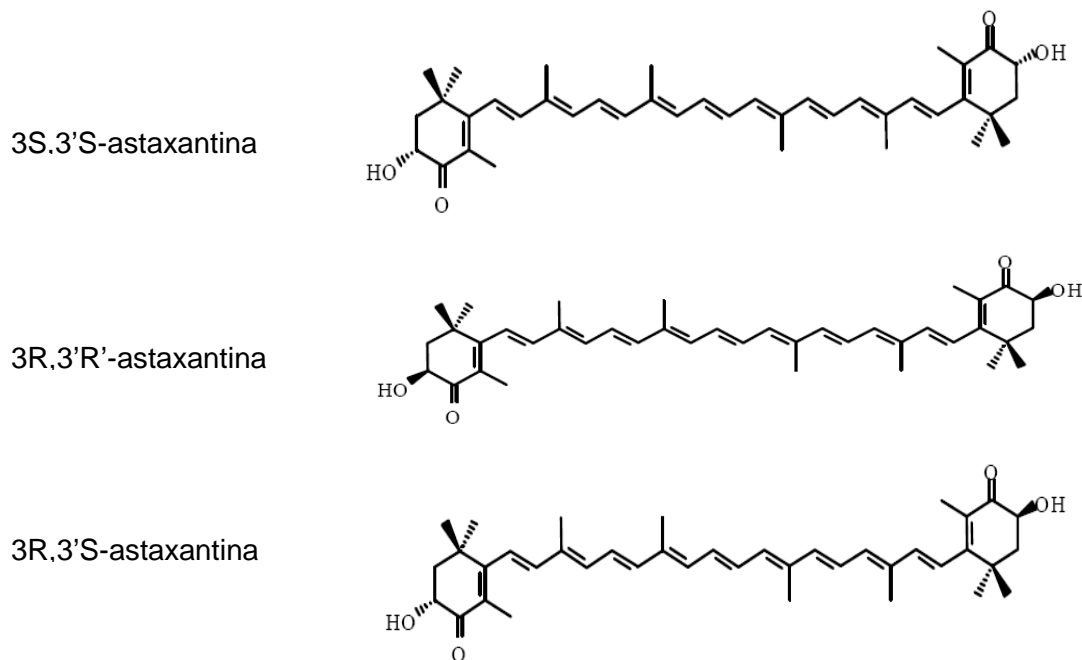


Figura 12. Isómeros de la astaxantina.

En los tejidos animales, alrededor del 10% de la astaxantina está libre; sin embargo, los grupos hidroxilos pueden estar esterificados con ácidos grasos (oleico y linolénico) formando monoésteres o diésteres, o conjugada con proteínas (carotenoproteínas) del exoesqueleto o del músculo (Guillou y col., 1995; Guerin y col., 2003; Akdes y col., 2007); en su forma libre es particularmente sensible a la oxidación. La astaxantina comparte muchas de las funciones filológicas atribuidas a los carotenoides; sin embargo, la presencia de los grupos hidroxilo y ceto en cada anillo de β -ionona explica algunas de las características únicas de este compuesto, tales como una alta actividad antioxidante y una mayor polaridad que otros carotenoides (Guerin y col., 2003; Liu y Osawa, 2007).

2.6.2. Estabilidad

Los isómeros *all-trans* isómero se convierten fácilmente a mezclas *cis-trans*, especialmente a 9-*cis* y 13-*cis* debido a factores como exposición a la luz, calor y presencia de ácidos (Johnson y An, 1991; Higuera-Ciapara, 2006). Yuan y Chen (1999) observaron que la velocidad de isomerización depende del disolvente orgánico, decreciendo en el siguiente orden:

diclorometano > cloroformo > diclorometano:metanol (25:75) > metanol > acetonitrilo > acetona > sulfóxido de dimetilo

Estos investigadores concluyeron que, para inhibir esta reacción, deben evitarse los disolventes clorados y altas temperaturas. Liu y Osawa (2007) encontraron que los isómeros *cis*-astaxantina, especialmente 9-*cis* astaxantina, tiene un mayor poder antioxidante que *all-trans* astaxantina.

La oxidación de astaxantina es debida principalmente a la presencia de oxígeno, el cual causa el rompimiento de los dobles enlaces de la cadena polienica y, en consecuencia, la pérdida de color. El producto obtenido de la oxidación es el astaceno; Meyers y Bligh (1981) encontraron que los carotenoides contenidos en crustáceos sometidos a un proceso de extracción a altas temperatura en presencia de oxígeno se oxidan a astaceno, el cual presenta características diferentes a la astaxantina. Otros factores también influyen en el proceso de oxidación como la luz, temperaturas superiores a los 40°C, y la presencia de ácidos y álcalis.

Debido a su alta inestabilidad, es importante buscar alternativas para la protección y estabilidad de la molécula de astaxantina y evitar su posible deterioro. Se han propuesto diversos métodos

tales como la microencapsulación y la introducción del pigmento en un sistema lipídico o proteico. El proceso de microencapsulación es realizado por la formación de una matriz polimérica o capa alrededor de un compuesto para proteger su actividad biológica de los factores ambientales. Los métodos empleados están basados en la preparación de una emulsión entre el carotenoides y la matriz de encapsulado, seguida por un proceso de secado. Entre las matrices más utilizadas están los hidrolizados de almidón y gelatina. Higuera-Ciapara y col. (2004) estudiaron la microencapsulación de astaxantina sintética en una matriz de quitosano utilizando glutaraldehído como compuesto de unión a través del método de emulsión múltiple. Chen y col. (2007) reportaron el uso de β -ciclodextrina para producir complejos para recubrir astaxantina. Kittikaiwan y col. (2007) encapsularon las células homogenizadas de *H. pluvialis* recubiertas con quitosano. Todos estos investigadores encontraron que el respectivo método de encapsulación protegió y estabilizó a la astaxantina; la principal desventaja es la pérdida de carotenoides durante el proceso de secado y que el producto obtenido no presenta buena estabilidad (Higuera-Ciapara y col., 2004).

2.6.3. Función biológica

Se ha reportado que la astaxantina tiene hasta diez veces mayor capacidad antioxidante que el β -caroteno, la luteína y la zeaxantina (Miki, 1991; Palozza y Kinsky, 1992; Tanaka y col., 1995; Yamane y col., 1997) y 100 veces más que la vitamina E (Jorgensen y Skibsted, 1993; Nishigaki y col., 1994; Shimidzu y col., 1996). Por ello, las propiedades antioxidantes de la astaxantina han sido asociadas con la reducción de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas (Tso y Lam, 1996; Guerin y col., 2003), la protección contra la fotooxidación por rayos ultravioleta, la prevención de cataratas y de enfermedades cardiovasculares, entre otras (Negeswara y col., 2005; Pashkow y col., 2008).

La aplicación de astaxantina como nutracéutico, principalmente como antioxidante para la prevención y tratamiento de varias enfermedades, ha ganado popularidad sobre todo en enfermedades tales como el cáncer (Tanaka y col., 1995; Jyonouchi y col., 2000; Nishino y col., 2005; Kittikaiwan y col., 2007), la degeneración macular relativo a la edad (Santocono y col., 2007; Parisi y col., 2008), la inflamación de la mucosa intestinal (Kurashige y col., 1990), las úlceras producidas por *Helicobacter pylori* (Bennedsen y col., 2000; Wang y col., 2001) y la estimulación del sistema inmune (Jyonouchi y col., 2000). Sin embargo, las investigaciones sobre los beneficios de la astaxantina en la salud humana son recientes y se han llevado a cabo principalmente *in vitro*.

Además de la función de la astaxantina en la pigmentación del músculo de peces y crustáceos, y como recursos dietario de provitamina A, este compuesto puede desempeñar otras funciones biológicas importantes en animales acuáticos principalmente en la reproducción, la resistencia a enfermedades (Lorenz y Cysewsky, 2000), como antioxidante, aumento del sistema inmune, fotoprotección, y crecimiento (Higuera-Ciapara y col., 2004; Chen y col., 2007). La mayoría de estas actividades biológicas se relacionan al poder antioxidante de la molécula, debido a las dobles ligaduras conjugadas y a los grupos hidroxilo y ceto en los anillos.

2.6.4. Fuentes de obtención

La producción de astaxantina es de fuentes variadas, las más importantes son las algas *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewsky, 2000; Del Río, 2005), la levadura *Phaffia rhodozyma* (Tangeras y Slinde, 1994; Yuan y Chen, 2000), los desechos de crustáceos (camarón) (Armenta y col., 2002), las bacterias marinas *Xanthophyllomyces dendrohous*, *Bacillus circulans* y *Agrobacterium aurantiacum* (Yuan y Chen, 2000) y algunas plantas de *Adonis* sp (Cunningham Gantt, 2005). Comercialmente la astaxantina es producida por síntesis química por las empresas Roche-DSM^{MR} (Suiza) bajo el nombre de Carophyll pink 10%^{MR} y por BASF^{MR} (Alemania) con el nombre Lucatin pink^{MR}.

2.6.4.1. Algas

En agua dulce, el alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* ha sido reconocida durante muchos años como la mejor fuente natural de astaxantina (Kobayashi y col., 1999; Lorenz y Cysewsky, 2000) ya que puede acumular hasta el 4% de su peso seco como pigmento. Sin embargo, esta microalga no es fácil de cultivar y presenta ciertas dificultades al cosechar el pigmento en cantidades apreciables. Uno de los principales inconvenientes es que se trata de un producto del metabolismo secundario; durante el crecimiento activo no se sintetiza la astaxantina, solo cuando cesa la división celular se inicia la producción y se acumulan en grandes cantidades. *H. pluvialis* tiene tasas de crecimiento bajas, lo que constituye uno de los principales problemas para su producción a gran escala, debilitando sus posibilidades de uso como fuente natural del pigmento. Sin embargo, el desarrollo de un medio de cultivo óptimo para su crecimiento así como una tecnología adecuada de cultivo incrementa la producción de biomasa hasta niveles óptimos (Domínguez y col., 2006).

H. pluvialis es la principal fuente natural con el más alto contenido de astaxantina, alcanzando hasta 5 g/kg de materia seca, el 85% de los carotenoides corresponde a astaxantina, 80% son

ésteres (70% astaxantina monoéster unida a ácidos grasos, 10% astaxantina diéster) y 5% se encuentra en forma de astaxantina libre; 4% luteína, 5% cantaxantina y 6% β -caroteno (Almendras y Sabelle, 1999; Lorenz, 1999). La astaxantina libre y sus mono y diésteres se han encontrado como isómeros 3S, 3'S (Johnson y An, 1991; Lorenz y Cysewsky, 2000). Lorenz y Cysewsky (2000) reportaron que *H. pluvialis* contiene de 1.5-3% de astaxantina (base seca), ganando aceptación en acuicultura y otros mercados como una forma concentrada de astaxantina natural. Sin embargo, el costo de producción de la microalga es alto, US\$ 5-20 / kg en peso seco.

La producción de astaxantina es inducida bajo ciertas condiciones de estrés durante el crecimiento (alta irradiación, limitación de nitrógeno, etcétera), las células se enquistan y la astaxantina se acumula en el citoplasma en grandes cantidades, de tal forma que el color cambia de verde a rojo (Yong y Lee, 1991). En la primera etapa de producción, el crecimiento del alga se realiza en un fotobioreactor bajo condiciones óptimas; en la segunda etapa estas condiciones son cambiadas promoviendo el estrés, a esta etapa se le llama carotenogénesis. Posteriormente, las células se rompen liberando a la astaxantina al medio, que finalmente es secada (Bjerkeng y col., 2007; Kittikaiwan y col., 2007). El pigmento secado puede ser encapsulado o extraído para ser incluido en formulaciones (Guerin y col., 2003; Olaizola, 2003). Naturose^{MR} es el nombre comercial de una fuente natural de astaxantina obtenida de *H. pluvialis* cultivada en Kona, Hawai por Cyanotech Corporation, donde el clima y la pureza del agua permiten que la microalga produzca permanentemente el pigmento (Lorenz, 1999). Actualmente en Japón ha sido aprobado el uso de astaxantina de *H. pluvialis* como pigmento para alimentación de peces. Adicionalmente, la Canadian Food Inspection Agency aprobó el uso de esta alga para ser usada también en alimentación de salmónidos, y en varios países europeos se autoriza para consumo humano (Lorenz y Cysewsky, 2000). Se ha probado también el uso de esporas lisadas de *H. pluvialis* como fuente pigmentante en truchas arcoiris (Sommer y col., 1991) pero con baja eficiencia debido al elevado porcentaje de esterificación de la astaxantina presente y a una incompleta ruptura de las esporas de la microalga.

Otra alga (*Chlorophyceae*) también ha sido probada como fuente de astaxantina (Torrissen y col., 1989). Estos autores encontraron que las algas de este género tienen la habilidad de sintetizar gran cantidad de astaxantina, cantaxantina y otros pigmentos bajo ciertas condiciones de estrés (deficiencia de nitrógeno), aunque también reportan la baja utilización de estos pigmentos en los peces debido a que un gran porcentaje de esta astaxantina está en forma de ésteres. Markovits (1991) señala que a pesar de que las microalgas son la fuente natural con el más alto contenido

de astaxantina, se han realizado menores intentos de explotación comercial de estos organismos a causa de un menor grado de desarrollo de las tecnologías de su cultivo en comparación con organismos heterotróficos como las levaduras.

2.6.4.2. Levaduras

Entre las levaduras que producen astaxantina, solamente *Phaffia rhodozyma* es de importancia comercial. Pertenece a la familia *Cryptococaceae* que sintetiza, además de astaxantina, β y γ -carotenos a partir de la fermentación de azúcares. Una característica notable de *P. rhodozyma* es la presencia del isómero óptico poco común 3R, 3'R de astaxantina (Andrewes y Starr, 1976). El perfil y la concentración de astaxantina dependen de las condiciones ambientales y los sustratos usados durante el cultivo, así como de la genética de la cepa (Johnson, 1989; Johnson y An, 1991; Visser y col., 2003).

Las cepas silvestres de *P. rhodozyma* aisladas a la fecha contienen hasta 500 mg carotenoides/kg de levadura en peso seco, de los cuales de 40 a 95% corresponde a astaxantina en forma libre y el resto a foenicaxantina y otros carotenoides menos importantes (β -caroteno, equinenona) (Andrewes y col., 1976). Por lo que para que la producción sea viable comercialmente es necesario obtener cepas mutantes con un mayor contenido de astaxantina. En procesos de fermentación industrial mediante programas de selección y aislamiento de estas cepas mutantes, se ha llegado a concentraciones de 3,000 ppm o más de astaxantina (Johnson, 1989). Se han reportado algunas cepas hiperproductoras de astaxantina que producen más de 10,000 mg astaxantina/kg, para ser inoculadas en fermentadores a escala comercial (Johnson, 2003) y de 18,000 mg astaxantina/kg para cultivos de laboratorio en laboratorio (Kusdiyantini y col., 1998). No obstante que *P. rhodozyma* sintetiza astaxantina como su principal carotenoide (85-95%), los costos de producción de los procesos actuales son elevados debidos principalmente a la baja producción por cepas de tipo silvestres, así como la escasez de medios de cultivo más baratos que soporten un proceso a gran escala (Ramirez-Córdova, 2000).

Johnson y col. (1980) indican que, en comparación con otras levaduras, *P. rhodozyma* tiene un bajo contenido de proteínas, aunque con un buen balance de aminoácidos esenciales para salmónidos (excepto metionina), un alto contenido de lípidos (con predominio de los ácidos palmítico, oléico y linoléico) que podrían promover la absorción intestinal de la astaxantina, y un alto contenido de vitaminas del complejo B, especialmente niacina (1,520 ppm).

P. rhodozyma se caracteriza por poseer una pared celular compuesta principalmente por quitina aunque también se encuentran polisacáridos unidos a proteínas ricas en cistina y lípidos. La astaxantina contenida esta protegida por la pared celular que debe ser eliminada por procesos mecánicos y digestión enzimática, con el objeto de que la astaxantina sea disponible. Los estudios de pigmentación con *P. rhodozyma* en dietas para salmónidos, crustáceos y yema de huevo en pollos indican la importancia de romper la pared celular para aumentar su biodisponibilidad (Johnson y col., 1977; Gentles y Haard, 1991). Por lo tanto, el grado de ruptura de la pared celular de *P. rhodozyma* es importante para la biodisponibilidad de astaxantina. Por ello, diversos estudios relacionados con este tema han sido reportados en la literatura (Johnson y col., 1980; Fang y Wang, 2002; Storebakken y col., 2004a, b).

2.6.4.3. Desechos de Crustáceos

Los desechos de crustáceos son generados durante el proceso de recuperación de la porción comestible de cangrejos, camarones y langostas, están constituidos por sales minerales (15-35%), proteínas (25-50%), quitina (25-35%), lípidos y pigmentos (Lee y Peniston, 1982). Los pigmentos carotenoides en estos residuos han sido estudiados y cuantificados por diversos investigadores (Kelley y Harmon, 1972; Meyers y Bligh, 1981; Shahidi y Synowiecki, 1991; González-Gallegos y col., 1997; Higuera-Ciapara y col., 2006). Tales trabajos han reportado que el contenido de carotenoides en desechos de camarón y cangrejo varía entre 19 y 148 $\mu\text{g/g}$ dependiendo de la especie (Tabla 5). El pigmento mas abundante encontrado en desechos de crustáceos es la astaxantina, la cual puede encontrarse en forma libre, esterificada o formando complejos con proteínas (caroteno-proteínas), siendo ésta la fuente natural de pigmentos para los salmónidos silvestres (Shahidi y Synowiecki, 1991). Se ha reportado que del total de carotenoides en exoesqueleto de crustáceos, la astaxantina comprende del 84-99%, mientras que en los órganos internos representa del 70-90%. Sachindra y col. (2005b) reportaron que la mayor distribución de carotenoides en el cuerpo de cuatro diferentes especies de camarón fue encontrada en la cabeza (153 $\mu\text{g/g}$) y caparazón (104.7 $\mu\text{g/g}$) de la especie *P. stylifera* mientras que los componentes del cuerpo de *P. indicus* mostraron los mas bajos niveles.

Tabla 5. Contenido de carotenoides en varias fuentes de desechos de crustáceos.

Fuente	astaxantina total mg/100 g	astaxantina (%)			otros carotenoides	referencia
		libre	monoester	diester		
camarón <i>P. borealis</i>	14.7	3.95	19.72	74.29	zeaxantina	Shahidi y Synowiecki, 1991
camarón <i>P. borealis</i>	4.97	8	22.5	69.5		Torrissen y col., 1981
camarón <i>P. borealis</i>	3.09	5.6	18.5	75.9		Guillou y col., 1995
cangrejo <i>P. clarkii</i>	153	40.3		49.4	astaceno	Meyers y Bligh, 1981
cangrejo blanco <i>C. opilio</i>	11.96	21.16	5.11	56.57	luteína, zeaxantina	Shahidi y Synowiecki, 1991

En camarón, los carotenoides se acumulan en el exoesqueleto, los cuales unidos a proteínas (carotenoproteínas) dan una coloración característica de la especie (Schiedt y col., 1993; Luna 2003).

Se han realizado numerosos de estudios para evaluar la utilización de los productos derivados del camarón y otros crustáceos como fuentes pigmentantes para las empresas salmoneras (Bjerkeng, 2000; White y col., 2002; Ponce-Palafox y col., 2004; Oliveira y col., 2007). El uso de estos desechos de crustáceos son de gran interés por dos razones: son altamente percederos y crean un ambiente de contaminación; y son fuentes de proteínas, quitina y carotenoides (Hall y da Silva, 1994; Armenta, 2002; Pacheco y col., 2009). Sin embargo, y debido a que los desechos contienen menos de 1000 µg/g de astaxantina, esto implicaría la incorporación de grandes cantidades como ingrediente de las dietas (10-25%). Una forma de procesamiento del subproducto es a través de la transformación de esta biomasa dentro de las dietas. Una forma de utilización es a través de la harina de residuos de crustáceos, aunque la producción de ésta a través de proceso de calentamiento, oxida a los pigmentos (Olsen y Jacobsen, 1995). Una desventaja adicional de las harinas es el alto contenido de quitina y cenizas lo cual significa una disminución en la disponibilidad para formulacion de dietas (Guillou y col., 1995). Para evitar este problema se han diseñado métodos alternativos; uno de ellos es el ensilado, el cual consiste en adicionar ácidos orgánicos o inorgánicos a los desechos para reducir la contaminación bacteriana (Chen y Meyers, 1983; Guillou y col., 1995). Durante este tratamiento, las sales de calcio son parcialmente disueltas a pH bajo (4-5), dando como resultado un incremento en la concentración de astaxantina y una alta digestibilidad de la misma (Torrissen y

col., 1981). Alternativamente, los pigmentos se extraen con aceite de pescado (Chen y Meyers, 1982a, 1982b; Omara-Alwala y col., 1985) y pueden ser adicionados directamente como ingredientes en las dietas. De manera similar los procesos de recuperación de proteínas y pigmentos en forma de un complejo estable son una excelente fuente de ambos compuestos (Simpson y col., 1992). Las harinas y extractos de aceites de crustáceos que contienen carotenoides también han sido investigados con resultados que dependen del contenido de pigmento en los desechos y al método de extracción aplicado. El uso de estas fuentes pigmentantes depende de los costos de producción implicados y de la disponibilidad de la astaxantina presente. En algunos procesos de extracción se producen isómeros y derivados de astaxantina que no pueden ser absorbidos por los salmónidos.

2.6.4.4. Plantas

Las flores de plantas del género *Adonis* sp., encontrada en el sur de Europa y considerada una maleza por los productores de trigo es una de las raras fuentes del reino vegetal que ha sido reportada como fuente de ésteres de astaxantina (Markovits, 1991; Cunningham y Gantt, 2005).

Existen procedimientos, como el reportado en la solicitud de patente chilena no 00674-1991 para extraer astaxantina a partir de cabezuelas de flor y pétalos de la cepa NCIMB 40309 (National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, Escocia) de la planta *Adonis aestivalis*, la cual contiene alrededor de 200-350 µg de astaxantina por cabezuela de flor, representando 80% de los carotenoides en la planta (Markovits, 1991). El procedimiento consiste en extracciones con solventes orgánicos mixtos y posterior eliminación de los glucósidos presentes. Kamata (1990) estudió la utilización de extractos y pétalos enteros de *Adonis aestivalis* como fuente de pigmento para truchas arco iris; los extractos confirieron un color rosado brillante a la carne de las truchas, pero los peces alimentados con pétalos tuvieron una mortalidad de 38% de la población lo que fue interpretado como resultado de la presencia de glucósidos tóxicos en los pétalos.

El extracto de pimentón rojo o páprika (*Capsicum anuum*) que contiene capsantina y capsorrubina puede ser utilizado como fuente de pigmentación y puede reemplazar hasta 50% de la astaxantina utilizada en las dietas de trucha arco iris y salmón del atlántico (Hannasch y Nelson, 1990). El extracto de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), que contiene alrededor de un 2% de astaxantina, se utiliza en alimentación de aves y en salmones, conociéndose el producto comercial para salmones como Florafil-Ax^{MR} (Veterquímica Ltda, México).

2.6.4.5. Astaxantina sintética

Esta es una molécula idéntica a la producida por organismos vivos en la naturaleza; consiste de una mezcla 1:2:1 de isómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R). Actualmente es la principal fuente de carotenoides usada en la acuicultura. Los mayores productores de astaxantina sintética son Roche-DSM (Suiza) y BASF (Alemania) (Lucantin pink) (Ernst, 2002).

La cantaxantina sintética (Carophyll red^{MR}) fue el pigmento usado originalmente en el cultivo comercial de salmónidos, sin embargo, en la última década ha sido reemplazada en forma progresiva por la astaxantina sintética (Carophyll pink^{MR}). La capacidad de retención se estima entre un 4 al 20% (Torrissen y col., 1989; Bjerkeng y col., 1990). El contenido de estos pigmentos no debe exceder los 50 mg/kg de peso debido a que la tasa de retención disminuye al incrementarse el nivel de carotenoides dietarios (Torrissen y col., 1985). La similitud de tono e intensidad de color similar a salmónidos silvestres, su estabilidad en músculo cuando es sometido a congelación, su disponibilidad en forma de peletizado seco, entre otras características, hace que la astaxantina sintética sea, pese a su precio, de muy amplio mercado. La astaxantina presente en Carophyll pink^{MR} de Roche-DSM es empacada en cápsulas de gelatina y carbohidratos y además la adición de antioxidantes como etoxiquina y palmitato de ascorbilo (Almendras y Sabelle, 1999). La etiqueta de este pigmento sintético indica que contiene un 10% de astaxantina libre con una combinación de isómeros en equilibrio, y además la adición de emulsificantes y estabilizantes (Armenta, 2002).

2.6.5. Importancia y usos de astaxantina

2.6.5.1. Pigmentación de salmónidos

El mercado de la astaxantina se centra en la acuicultura como fuente de pigmentación para especies como trucha arco iris y salmón. El color del músculo de los salmónidos es el resultado de la absorción y depósito de la astaxantina consumida, aumentando así su valor comercial (Goodwin, 1984). El uso de astaxantina o cantaxantina como agentes pigmentantes en acuicultura ha sido bien documentado en publicaciones por más de dos décadas (Chen y Meyers, 1982b; No y Storebakken, 1991; Putnam, 1991). El principal criterio para la aceptación de salmónidos por parte del consumidor es el impacto visual dado por la coloración rosada de su carne. Por consiguiente, el grado de pigmentación es un factor primordial en la determinación del precio de mercado del salmón, en cualquiera de sus formas de presentación (Torrissen e Ingebrigten, 1992).

Los carotenoides tienen la capacidad de unirse a nivel muscular al complejo actina-miosina (Bjerkeng y col., 1992). La intensidad de la pigmentación se relaciona con la cantidad de pigmento retenido en el músculo, la cual varía de acuerdo a diversos factores fisiológicos como peso del pez, tasa de crecimiento, maduración y factores genéticos y dietarios, así como la fuente de pigmentos, concentración en la dieta y contenido de lípidos (Torrissen y col., 1995).

Cabe señalar que para obtener una adecuada pigmentación se deben tomar en cuenta diversos factores como la cantidad y calidad del pigmento, la forma libre o esterificada de los carotenoides, la salud y edad del pez, así como los antecedentes genéticos ya que algunas especies muestran selectividad en la absorción de carotenoides (Kalinowski y col., 2007). Dada la fuerte expansión de la salmonicultura y la necesidad de pigmentar estos peces, se ha generado una gran demanda mundial por fuentes pigmentantes. Kalinowski y col. (2007) estudiaron el efecto que tiene la suplementación de la dieta del pargo (*Pargus pargus*) con harina de residuos de camarón. Varios estudios fisiológicos y nutricionales realizados en crustáceos, principalmente camarón, han sugerido que la astaxantina incrementa la tolerancia al estrés de estos animales, mejora el sistema inmune, actúa como protector intracelular y tiene efecto durante el crecimiento larvario. Por ello, el uso de astaxantina en la acuicultura es importante, no solo desde el punto de vista de pigmentación para incrementar la aceptación del consumidor, sino también como nutriente en el crecimiento y reproducción de especies de alto valor comercial (Higuera Ciapara y col., 2006).

Se ha reportado que la astaxantina natural presenta mayor actividad biológica que la sintética. Bjerkeng y col. (2007) compararon dos dietas con diferentes fuentes de astaxantina, una fue suplementada con un cultivo de *Phaffia rhodozyma* y la otra con Lucantin^{MR}. La conclusión del estudio fue que la primera dieta tuvo mayor rendimiento en la pigmentación del músculo. Estos resultados son similares a los reportados por Tangeras y Slinde (1994).

2.6.5.2. Dietas de aves

La astaxantina también es utilizada en dietas para pollos con el fin de obtener pigmentación en la piel y en la yema de mayor aceptabilidad para el consumidor, aunque se ha reportado también el uso exitoso de combinaciones de pigmentos naturales (García y Alcalá, 1998).

2.6.5.3. Cosmetología

Pese a su color altamente aceptable, la astaxantina se emplea en forma limitada en la industria cosmética debido a su inestabilidad a la luz y oxígeno. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado cremas para el cuidado de la piel conteniendo astaxantina, haciendo uso de sus propiedades antioxidantes que protege del daño de la radiación ultravioleta y reduce eficientemente la deposición de la melanina y formación de manchas oscuras. Al mismo tiempo, es usada como colorante natural para lápices labiales que previenen lesiones por rayos ultravioleta (Dufossé y col., 2005). La astaxantina tiene una capacidad antioxidante 100 veces mayor que los antioxidantes comunes, como la Vitamina E. Se ha comercializado como Swedish Beauty Complexes (cápsulas 100 mg), un poderoso antioxidante derivado de algas de mares suecos.

2.6.5.4. Usos diversos

El uso de astaxantina para humanos es principalmente como suplemento alimenticio. En nutrición humana, la astaxantina ha ido ganando popularidad como complemento dietético debido a su alto poder antioxidante. Actualmente, varios productos derivados de astaxantina están disponibles en el mercado y son promovidos como agentes anticancerígenos, antioxidantes, como agente que disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y como antiinflamatorios, así como inmunoestimulantes (Guerin y col., 2003; Higuera-Ciapara y col., 2006). Desde 2005 están disponibles al público suplementos obtenidos de astaxantina de *Hematococcus sp.*

2.7. Procesos de obtención de astaxantina a partir de desechos de crustáceos

Se han desarrollado varios métodos para la extracción de astaxantina a partir de desechos de los crustáceos. Entre los más utilizados están los que emplean disolventes orgánicos (Meyers y Bligh, 1981; Chen y Meyers, 1982a; Sachindra y col., 2005b, Sachindra y col., 2006, Gimeno y col., 2007). También se han utilizado fluidos supercríticos, como CO₂, que se prefieren sobre los disolventes orgánicos por su poca toxicidad y no dañan a los compuestos termolábiles. La desventaja de los fluidos supercríticos es que no son específicos para la extracción de un compuesto determinado (De la Fuente y col., 2006; Babu y col., 2008; Hong y col., 2009). Asimismo, la extracción de pigmentos de desechos de crustáceos se realiza empleando aceites orgánicos, ya sea vegetales como el aceite de soya (Chen y Meyers, 1982a; Omara-Alwala y

col., 1985; Sachindra y Mahendrakar, 2005a), el aceite de palma (Akdes y col., 2007), y aceites animales tales como aceite de hígado de bacalao (Shahidi y Synowiecki, 1991).

El principal problema que se presenta durante la extracción de los carotenoides es que se encuentran unidos a proteínas, a quitina o a ambos (Armenta y Guerrero, 2008), dificultando su extracción, por lo que se han diseñado otros métodos, como la aplicación de hidrólisis enzimática previa para liberar a los carotenoides (Cano-López y col., 1987; Akdes y col., 2007; Babu y col., 2008). Otras metodologías reportan a los ensilados tanto químico (Guillow y col., 1995; Torrissen y col., 1981; Sachindra y col., 2007), como microbiano (Fagbenro 1996; Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002; Armenta y col., 2002; Bhaskar y col., 2007; Sachindra y col., 2007; Gimeno y col., 2007), como un proceso previo a la extracción del pigmento, aumentando el rendimiento del mismo. En el proceso de extracción los pigmentos deben ser protegidos por medio de la adición de antioxidantes como BHA y BHT, ácido ascórbico y en algunos casos α -tocoferol (Wong, 1989).

En los procesos de obtención de astaxantina es importante, en primer lugar, considerar que se maneja un compuesto muy sensible al oxígeno, la luz y la temperatura, y que muchas de sus características también pueden ser modificadas por la exposición a álcalis y ácidos. Por lo tanto, durante los procesos de extracción deben de ser considerados estos factores para evitar modificaciones o pérdida del pigmento. Asimismo, estos factores pueden incidir directamente en la calidad y cantidad de la astaxantina obtenida (Chen y Meyers, 1983).

2.7.1. Extracción con disolventes orgánicos

Meyers y Bligh (1981) utilizaron un sistema ternario éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10 v/v/v) para la extracción de carotenoides en desechos de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) obteniendo concentraciones de 153 μg pigmentos totales/g identificados como ésteres de astaxantina, en proporciones de 49.4% astaxantina esterificada, 40.3% sin esterificar y 10.3% de astaceno. Sachindra y col. (2006) probaron varios disolventes y sus combinaciones (acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, etilacetato, etilmetil cetona, éter de petróleo y hexano) en la extracción de pigmentos de residuos de camarón (*Litopenaeus indicus*), concluyendo que con la combinación de alcohol isopropílico:hexano (60:40) se consiguió el rendimiento óptimo (43.9 $\mu\text{g/g}$), seguida por alcohol isopropílico (40.8 $\mu\text{g/g}$) y acetona (40.6 $\mu\text{g/g}$). Para todos los casos se utilizó una proporción 5:1 disolvente:desechos. Estos autores también encontraron que el menor rendimiento fue obtenido con los disolventes no polares, éter de petróleo (12.1 $\mu\text{g/g}$) y hexano (13.1 $\mu\text{g/g}$).

2.7.2. Extracción con aceites vegetales y animales

La extracción de astaxantina utilizando aceites contribuye al incremento en la estabilidad del pigmento debido a que éste proporciona una barrera al oxígeno, dando protección y prevención contra la oxidación. Chen y Meyers (1982a) emplearon este método de extracción, realizando previamente una hidrólisis enzimática en desechos de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), probando cinco enzimas proteolíticas; posteriormente extrajeron los pigmentos carotenoides con aceite de soya en diferentes concentraciones respecto a los residuos de camarón. El uso de la proteasa comercial Mylezyme^{MR} incrementó en 58% la liberación de astaxantina; los autores concluyeron que el mayor rendimiento fue obtenido con la proporción 1:10 residuo:aceite, a 80-90°C por 30 min, siendo además la concentración pigmento:aceite más adecuada para ser utilizada en dietas para salmónidos. Armenta y col. (2002) también emplearon una hidrólisis enzimática previa a la extracción; la concentración de astaxantina aumentó a partir de los residuos tratados enzimáticamente con respecto a los desechos sin hidrolizar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gildberg y col. (2001), quienes reportaron una concentración mayor de astaxantina en los sedimentos que quedan después de separar el licor residual, el cual además es rico en proteínas y carotenoides, por lo que se puede utilizar como suplemento en dietas de salmónidos. La fracción sólida es rica en quitina, por lo que se puede destinar a diversos usos (Bhaskar y col., 2007).

Shahidi y Synowiecki (1991) extrajeron quitina y pigmentos, principalmente astaxantina y sus ésteres, a partir de desechos de camarón (*Pandalus borealis*) y del cangrejo de nieve (*Chionoectes opilio*) utilizando diferentes temperaturas y varias proporciones de aceite de hígado de bacalao. Los resultados mostraron que la mayor recuperación de carotenoides (74.23%) fue con la proporción 1:2 desechos:aceite a 60°C; el aceite de bacalao, además, es rico en ácidos grasos ω 3. Sachindra y Mahendrakar (2005a) realizaron un estudio para determinar el rendimiento en la extracción de carotenoides en desechos de camarón utilizando diversos aceites vegetales; los resultados mostraron que el mayor rendimiento fue obtenido con el aceite de girasol, en comparación con otros aceites, como soya, mostaza y coco. Las condiciones óptimas para la extracción fue en la proporción 2:1 a 70°C por 150 min, aunque el rendimiento dependió de la proporción aceite:residuo, el tiempo y la temperatura. Akdes y col. (2007) extrajeron astaxantina de camarón tigre (*Penaeus monodon*) usando aceite de palma a 50, 60 y 70°C, siguiendo la cinética de degradación durante el proceso. Estos autores concluyeron que la mayor estabilidad de astaxantina fue entre 30 y 70°C, y disminuyó a 80 y 90°C.

2.7.3. Ensilados

El ensilado es un proceso de conservación de material biológico mediante el uso de ácidos para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición. Este proceso es una alternativa para la utilización de desechos de pescado y de crustáceos; presenta las ventajas de ser relativamente sencillo y posible de adaptar a las necesidades del proceso. El ensilado de pescado ha sido considerado como una forma de utilizar los desechos para la recuperación de proteínas de alta calidad para la alimentación de pollos, cerdos y otras especies (Raa y col., 1982; Vizcarra-Magaña, 1999; Llanes-Iglesias y col., 2007). La transformación de los desechos de pescado y su preservación puede ser hecha por una acidificación biológica producida por fermentación, utilizando bacterias acidificantes (lácticas, acéticas o propiónicas, o ensilado bacteriano) (Llanes-Iglesias y col., 2007) o por acidificación química por el uso de ácidos inorgánicos y/o orgánicos (Faid y col., 1994; Vizcarra-Magaña, 1999; Toledo y col., 2007). Estas tecnologías han servido de antecedente para su aplicación en desechos de camarón. Se han reportados diversos métodos de ensilado ácido (Omara-Alwala y col., 1985; Guillou y col., 1995; Torrissen y col., 1981). De manera similar, el ensilado por fermentación ha sido estudiado para determinar el efecto de diferentes carbohidratos, cultivos de bacterias utilizadas en la fermentación y la calidad del ensilado fermentado (Fagbenro, 1996; Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002; Armenta y col., 2002; Gimeno y col., 2007; Sachindra y col., 2007). Diversos autores han investigado la aplicación del ensilado bacteriano como pretratamiento del proceso tradicional para la obtención de quitina (Shirai y col., 2001; Cremades y col., 2001; Cira y col., 2002).

2.7.3.1. Ensilado químico

El ensilado de desechos de camarón puede ser un proceso eficiente para la obtención de astaxantina. A pH bajo, la astaxantina es más estable debido a que promueve un ambiente reductor por lo que la estabilidad de los carotenoides se incrementa (Armenta, 2002); por otra parte, se produce una conversión del diéster a monoéster (Torrissen y col., 1981). Mientras el pH se mantenga entre 4 y 5, el ensilado se puede almacenar a temperatura ambiente por varios meses; sin embargo, conforme avanza la hidrólisis, se liberan aminoácidos que amortiguan el pH del medio, aunado a esto las sales de calcio liberadas neutralizan al ácido aumentando el pH (Fagbenro y col., 1996).

El ensilado químico consiste en la adición de ácidos orgánicos y/o minerales (principalmente fórmico, acético, propiónico, sulfúrico y clorhídrico, solos o en combinaciones) al material

biológico, desechos de crustáceos, en el caso de esta tesis. Al ser agregados, disminuye el pH del sustrato rápidamente evitando el crecimiento de microorganismos no deseables y proporcionando una mayor conservación del material a un relativo bajo costo. Posteriormente, se extraen los pigmentos usando aceites orgánicos o disolventes (Torrissen y col., 1981; Chen y Meyers, 1982a; Omara-Alwala y col., 1985). Las concentraciones de ácido utilizadas son, por lo general, muy bajas; sin embargo, una de las desventajas de utilizar ácidos es que estos son corrosivos, lo que puede ocasionar subproductos altamente contaminantes (Neiva, 1986; Bello y col., 1994; Evers y Carroll, 1996; Armenta, 2002) y deterioro significativo del equipo. Sin embargo este proceso también presenta algunas ventajas, ya que utiliza una tecnología sencilla, además que puede desarrollarse a varias escalas sin disminuir su eficiencia (Meyers y Benjamín, 1987).

Aranson (1994) ha recomendado el uso de combinaciones de ácidos orgánicos e inorgánicos debido a su forma de acción y para reducir los costos del proceso ya que los orgánicos son más costosos; sin embargo, el empleo de ácidos orgánicos presenta la ventaja de que los ensilados no tienen que ser neutralizados al final del proceso y pueden ser utilizados directamente en las dietas de peces, si éste es el fin del ensilado. Según Bello (1994), el pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso del ensilado, ya que refleja el desarrollo del proceso y la calidad del ensilado, e indica cualquier cambio que pudiera afectar al producto. Además del pH, deben ser considerados como índices de calidad del producto otros parámetros como contenido de humedad, cenizas, proteínas y lípidos.

La forma de acción de los ácidos orgánicos débiles es a través de la reducción de pH del sistema; su efecto en la célula microbiana es por migración del ácido no disociado a través de la membrana celular, disociándose dentro de la célula e interrumpiendo algunos procesos metabólicos (Wilson y col., 2000). Cuando se alcanza un valor de pH 4 en el material ensilado, se inicia una hidrólisis de las proteínas presentes, asociadas con el exoesqueleto del camarón. La velocidad de hidrólisis depende de la materia prima y de la temperatura (Meyers y col., 1981).

Guillou y col. (1995) estudiaron el ensilado químico en desechos *P. borealis* utilizando ácidos sulfúrico, fosfórico y propiónico durante tres meses, y determinaron el efecto de este proceso en algunos componentes inestables, como la astaxantina (libre, mono y diesterificada) y ácidos grasos poliinsaturados. Los resultados mostraron que una pequeña cantidad del pigmento rojo (presumiblemente astaxantina) permanecía unida en los desechos sin ensilar después de la

extracción, mientras que en los desechos ensilados se recuperó el total de pigmento. Asimismo se detectaron mayores concentraciones de ácidos grasos en los desechos ensilados.

Torrissen y col. (1981) utilizaron desechos de camarón (*Pandalus borealis*) adicionados con 4.8% (v/p) de una mezcla de ácidos sulfúrico y propiónico a 4-5°C por 21 días. Los autores obtuvieron un ensilado estable a pH 4, con una conversión gradual del diéster a monoéster durante el almacenamiento. La astaxantina presente en este ensilado presentó mejor digestibilidad en trucha arcoiris (71%) en comparación con los residuos frescos o secados (45%). Al final del almacenamiento (21 días) se obtuvo un rendimiento mayor de 73 mg/kg en comparación con los residuos frescos (49.7 mg/kg). Por lo anterior, estos autores concluyen que las dietas hechas a base de residuos ensilados favorecen la coloración del músculo de salmónidos. La digestibilidad de los nutrientes aumenta al llevar a cabo la hidrólisis, el grado de ésta determina la calidad nutricional debido a que se producen aminoácidos, péptidos activos y amoniaco, además se liberan los ácidos grasos y carotenoides lo que facilita su extracción (Fagbenro y col.,1996). Las limitantes para el uso de dietas para animales formulada con desechos ensilados de camarón son las siguientes: 1) se debe neutralizar el pH ácido; 2) se puede producir una disminución en la calidad nutricional de la dieta si el ensilado representa más de 25% de la materia seca en la dieta; 3) se pueden generar sabores indeseables en el producto final debido a los compuestos que le dan olor y sabor al camarón, disueltos en la fase oleosa (Neiva, 1986).

2.7.3.2. Ensilado bacteriano

El ensilado bacteriano incluye a varios tipos de fermentación: acética, propiónica y láctica. Consiste en utilizar un inóculo de bacterias seleccionadas produciendo ácido *in situ* a partir de una fuente de carbohidratos tales como malta, melazas, yuca, dextrosa, etcétera (Evers y Carroll, 1996). Este método está basado en una fermentación natural; es una de las formas más antiguas para la preservación de alimentos. Los microorganismos responsables de la fermentación pueden provenir de la microflora natural del sustrato o bien ser cultivos iniciadores puros, los cuales son seleccionados y adicionados (Frazier, 1993). Como resultado de la producción de ácido y disminución del pH se inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición causantes de la degradación del sustrato.

Los procesos de fermentación de pescado en países escandinavos, incluyendo las formas artesanal e industrial, han servido como antecedente para el desarrollo de tecnologías similares

en países tropicales, dirigidas a la conservación y aprovechamiento de desechos de materiales acuáticos, que por razones estacionales o por su localización geográfica, presentan problemas de disponibilidad y de acumulación. Un proceso alternativo para la extracción de astaxantina de desechos de crustáceos es el ensilado bacteriano, empleando cepas seleccionadas de bacterias lácticas; es un método eficiente y ecológicamente limpio para recuperar materiales de alto valor (Hall y De Silva, 1994), incrementando la estabilidad del pigmento debido a que se promueve un ambiente reductor (Chen y Meyers, 1983; Guerrero y col., 1996). Las bacterias son inoculadas a los desechos produciéndose ácido láctico a partir de una fuente de carbohidratos adicionada y disminuyendo el pH del sustrato, por lo que el proceso de estabilización de los residuos es menos severo que el proceso tradicional ácido-álcali (Hall y De Silva, 1994; Frazier, 1993; Armenta y col., 2002).

Después de algunas horas de ensilado, las bacterias lácticas son predominantes; el pH disminuye entre 5.0 y 3.8, dependiendo de la cepa empleada. Un buen ensilado cambiará al sustrato de un estado sólido a uno semilíquido en 2 o 3 días (Hall y Da Silva, 1994). La eficiencia del ensilado depende de varios parámetros intrínsecos y ambientales: la composición del sustrato, la fuente de carbono, la temperatura, la cantidad y tipo de inóculo, entre otros. Evers y Carroll (1996) realizaron estudios de la fermentación láctica en desechos de camarón y cangrejo utilizando melazas como fuente de carbono; observaron que a medida que se incrementa el nivel de melazas también se incrementaba la concentración de ácido láctico, y por consiguiente el descenso del pH. Fagbenro (1996) y Bhaskar y col. (2007), utilizaron *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici* CRF2182, respectivamente, como cultivos iniciadores. Fagbenro (1996) concluyó que con 5% (p/p) de inóculo, 15% (p/p) de melaza como fuente de carbono y almacenado por 7 días a 30°C se tenían las condiciones óptimas para un buen ensilado, mientras que Bhaskar y col. (2007) utilizaron 5% (v/p) de inóculo, 15% (p/p) de glucosa, durante 72 h a 37°C. Sachindra y col. (2007) estudiaron la recuperación de carotenoides por métodos fermentativos a partir de *Litopenaeus indicus*, utilizando diferentes concentraciones del cultivo iniciador, *Lactobacillus plantarum* y glucosa como fuente de carbono. Concluyeron que los niveles óptimos fueron a pH 4.1 con 20.5% de glucosa, 19.5×10^4 células/g del cultivo iniciador y 72 días. Cira y col. (2002) reportaron el empleo de 10% de sacarosa y 5% de cultivo iniciador para la fermentación de *Litopenaeus* sp.; estos autores observaron una disminución del pH 7.4 a 4.6 en 96 horas, permitiendo la conservación del ensilado por tres meses.

De manera general, las ventajas que ofrece el ensilado bacteriano son las siguientes: 1) es más económico y menos peligroso en su uso que el químico; 2) se pueden producir algunos agentes inhibidores de microorganismos patógenos, como las bacteriocinas; 3) el producto final no necesita neutralización; 4) el valor nutricional del producto es mayor que en el ensilado químico (Hall y De Silva, 1994). Adicionalmente, este proceso aumenta la estabilidad de los desechos de camarón y facilita la recuperación de otros productos de alto valor comercial como la quitina, las enzimas (principalmente proteasas) y los pigmentos (astaxantina) (Armenta y col., 2002).

Bacterias lácticas

La fermentación láctica es uno de los métodos más antiguos para la preservación de material biológico perecedero. Es un proceso microbiano muy complejo, en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante (Shirai y col., 1996). Las bacterias lácticas han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran interés al ser empleadas en la industria farmacéutica y de alimentos (Wilches, 2005) y como cultivos probióticos para humanos y animales (Saxelin y col., 1999; Topisirovic y col., 2006). Sin embargo, estas bacterias también han sido asociadas con algunos tipos de descomposición de los alimentos (Cabeza-Herrera, 2006). Las bacterias lácticas son Gram+, comparten una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, como la morfología cocoide o bacilar, la incapacidad de esporular, de carácter microaerófilico o anaerobio facultativo, con ausencia de citocromos y catalasa negativa. Son tolerantes a concentraciones relativamente altas de ácidos y pH más bajos que el resto de las bacterias (\leq pH 5). Una de las características más importantes de este grupo de bacterias es su capacidad de fermentar azúcares, produciendo ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, como metabolito final mayoritario (Frazier, 1993). De acuerdo a su metabolismo fermentativo se pueden diferenciar en homofermentadoras las cuales producen virtualmente como único producto de fermentación ácido láctico, y las heterofermentadoras que producen otros productos además de ácido láctico, como etanol, ácido acético, acetaldehído y CO₂ (Larpen, 1995). En las Figuras 13 y 14 se muestran las rutas de fermentación homofermentativa y heterofermentativa.

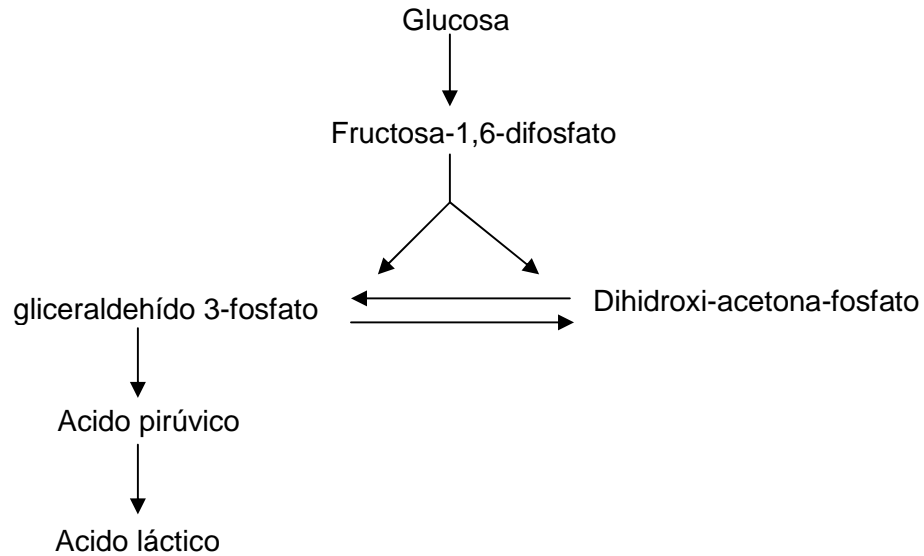


Figura 13. Fermentación láctica homofermentativa (ruta de Embden-Meyerhoff) (Larparent, 1995).

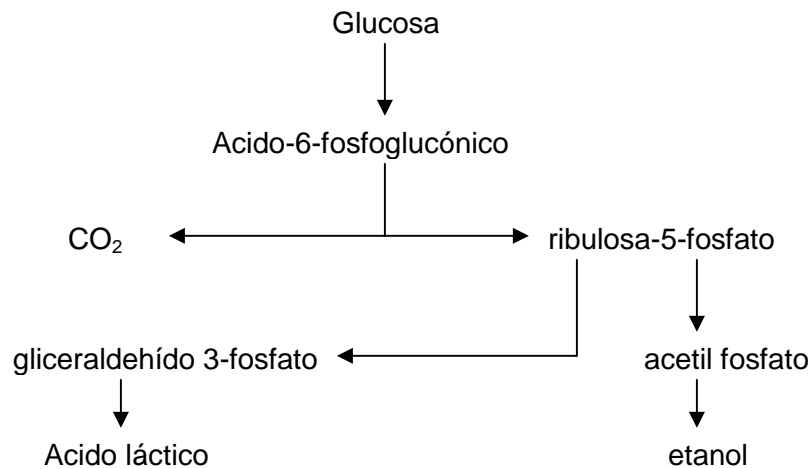


Figura 14. Fermentación láctica heterofermentativa (ruta del ácido 6-fosfogluconico) (Larparent, 1995).

Aunque la taxonomía de las bacterias lácticas ha estado sometida a una gran controversia, se acepta que los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* constituyen el núcleo central de este grupo. No obstante, los estudios taxonómicos recientes sugieren que dentro de las bacterias lácticas se deben incluir los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*,

Tetragenococcus y *Vagococcus* y *Bifidobacterium* (Casaus Lara, 2000). En la Tabla 6 se muestran algunas especies de esos géneros. De estos géneros, *Lactobacillus* (56 especies), *Streptococcus* (39) y *Bifidobacterium* (29) son los más numerosos. Asimismo, la secuenciación del ARNr 16S ha permitido determinar a profundidad las relaciones filogenéticas existentes entre las bacterias lácticas, lo que ha puesto de manifiesto su heterogeneidad y el hecho de que algunos grupos filogenéticos no correspondan con la clasificación actual basada en caracteres fenotípicos (Casaus Lara, 2000). Algunas bacterias han sido aisladas de alimentos marinos como el camarón y pescado envasados al vacío (Dass, 1999).

Tabla 6. Principales bacterias lácticas usadas en fermentaciones industriales (adaptado de Casaus Lara, 2000).

Género	Tipo de fermentación	Especie
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	<i>L. acidophilus</i>
		<i>L. casei</i>
		<i>L. coryniformis</i>
		<i>L. curvatus</i>
		<i>L. plantarum</i>
	Heterofermentativo	<i>L. salivarius</i>
		<i>L. brevis</i>
		<i>L. buchneri</i>
		<i>L. fermentum</i>
		<i>L. viridescens</i>
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>P. acidilactici</i>
		<i>P. cerevisiae</i>
		<i>P. pentosaceus</i>
<i>Enterococcus</i>	Homofermentativo	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. faecium</i>
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativo	<i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativo	<i>S. boris</i>
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	<i>L. mesenteroides</i>

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Estudiar la eficiencia de extracción de astaxantina a partir de desechos de camarón sujetos a ensilados ácido y bacteriano, y la estabilidad de la astaxantina extraída al añadirse a dos sistemas modelo (proteico y lipídico), y a una pasta cárnica simple.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de ensilados químico (con ácidos orgánicos) y bacteriano (inóculo seleccionado de bacterias lácticas) en residuos de camarón para la obtención de astaxantina.
- Con base en el contenido de carotenoides (xantofilas totales) y astaxantina en los residuos frescos y en los ensilados (químico y bacteriano), determinar el efecto del proceso en el rendimiento del pigmento.
- Comparar la eficiencia del proceso en dos variedades de camarón: *Litopenaeus aztecus* (camarón café) del Golfo de México, y *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) del Pacífico.
- Comparar la eficiencia del ensilado químico y ensilado bacteriano en dos procesos secuenciados de extracción de astaxantina-centrifugación del residuo, con respecto al rendimiento.

4. JUSTIFICACIÓN

4. JUSTIFICACION

México es el séptimo productor de camarón en el mundo, duplicando la producción en la década 1997-2007, de 88,500 a 185,000 TM anuales. En estos años los niveles de producción por captura se mantuvieron constantes, mientras que los relacionados con la acuicultura aumentaron considerablemente (CONAPESCA, 2007). Debido a que la parte comestible del camarón constituye aproximadamente 55% del peso total, 45 a 50% de las cantidades indicadas arriba son desechos (cerca de 90,000 TM/año), representando un foco de contaminación en las zonas productoras o de desembarco. La astaxantina, el pigmento mayoritario en los desechos de camarón, es el compuesto de mayor valor agregado en estos residuos. Asimismo, en los últimos años el interés por este pigmento ha ido incrementándose a medida que se le conocen otras propiedades además de las pigmentantes, como antioxidante, inmunoregulador, antiinflamatorio y agente anticarcinogénico.

En la actualidad, la mayor parte de astaxantina es obtenida sintéticamente mediante procesos químicos, y en menor escala a partir de la microalga *H. pluvialis*. Sin embargo, debe considerarse que la astaxantina es de gran importancia comercial debido a su alto precio en el mercado. El costo del pigmento sintético es alrededor de US\$ 2,500 / kg, con un mercado mundial anual de US\$ 200 x 10⁶. Aunque la mayor participación de este mercado es del pigmento sintético, la demanda por parte de los consumidores por productos naturales ha abierto nuevos mercados a la astaxantina de fuentes naturales. Por ello, es necesario estudiar nuevos procesos de obtención de este pigmento, con rendimientos competitivos, para ser utilizado en alimentación animal y con aplicaciones para humano en alimentos y farmacia.

Uno de los procesos que incrementan el rendimiento en la extracción del pigmento es el ensilado de los desechos empleando ácidos de forma química (orgánicos y/o inorgánicos) o por vía microbiana (fermentación) con el fin de reducir la contaminación microbiana, estabilizar la estructura de los carotenoides y aumentar la disponibilidad de los pigmentos, en especial la astaxantina.

5. HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

Los pigmentos carotenoides presentes en los residuos de camarón (*Litopenaeus* sp.) pueden ser eficientemente extraídos del residuo, previamente estabilizado por medio de un proceso de ensilado ácido o bacteriano. La astaxantina puede ser recuperada del ensilado por disolventes orgánicos y empleada en sistemas alimentarios.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y METODOS

La presente tesis fue dividida en tres etapas:

ETAPA I. Consistió en los estudios para determinar las condiciones óptimas de los ensilados químico y bacteriano en desechos de camarón del Golfo de México (*Litopenaeus aztecus*, camarón café) para la extracción de pigmentos carotenoides.

ETAPA II. Con el fin de conocer la repetitividad de los resultados obtenidos en la Etapa I, se aplicaron las condiciones de los ensilados químico y bacteriano en la extracción de pigmentos carotenoides de desechos de camarón capturados en el Pacífico (*Litopenaeus vannamei* o camarón blanco).

ETAPA III. Se estudió el efecto de parámetros ambientales en la estabilidad de la astaxantina, empleando dos sistemas modelo, proteico y lipídico, y una pasta cárnica simple.

6.1. Etapa I. Estudios en desechos de camarón del Golfo de México (*Litopenaeus aztecus*, camarón café)

6.1.1 Materia prima

Se utilizaron desechos de camarón (cefalotórax) de la especie *Litopenaeus aztecus* (camarón café) procedentes de la costa del Golfo de México (Tampico, Tamps.) adquiridos en la Central de Abastos “La Nueva Viga” de la Ciudad de México. Los desechos fueron transportados al laboratorio bajo condiciones de congelación y posteriormente molidos en un molino para carne Sanitary^{MR} México D.F, México) a través de un cedazo de ¼”, y se almacenaron en bolsas de plástico a una temperatura de -20° C hasta su uso.

6.1.2. Ensilado químico

6.1.2.1. Formulación de ácidos orgánicos y sus mezclas

Para determinar las condiciones del ensilado, se realizaron estudios preliminares utilizando tres ácidos orgánicos: fórmico, acético y propiónico (Baker), los cuales han sido ampliamente reportados en la literatura como medio para disminuir el pH por debajo de 4.5 en ensilados

(Winter y Feltham, 1983; Arason, 1994; Rouvinen, 2001). Los desechos de camarón molidos fueron adicionados individualmente con cada uno de estos ácidos en varias concentraciones. Se probó también el efecto de mezclas de ácidos (fórmico-acético y fórmico-propiónico), reportadas en estudios anteriores en diferentes concentraciones (Winter y Feltham 1983, Arason, 1994; Rouvinen, 2001) (Tabla 7). En todos los tratamientos se adicionó 0.01% de una mezcla de butilhidroxianisol (BHA) y butilhidrotolueno (BHT) en proporción 1:1 (p/p). Todas las muestras fueron colocadas en frascos ámbar y almacenadas a 4°C durante 24 horas.

Tabla 7. Concentración de ácidos empleados en los estudios preliminares de ensilados de desechos molidos de camarón (% p/v desechos/ácido).

Mezcla fórmico-acético		Mezcla fórmico-propiónico	
Ácido fórmico	Ácido acético	Ácido fórmico	Ácido propiónico
0.75	0.75	1.0	1.5
1.0	1.0	1.5	2.0
1.5	2.0	2.0	3.0
2.0	3.0	3.0	4.0
3.0	3.5	4.0	
3.5	4.0		
4.0			

De los estudios preliminares, se seleccionaron las 8 mezclas que más rápidamente abatían el pH a valores $3 < \text{pH} < 4.5$; estas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezclas seleccionadas de ácidos orgánicos para el ensilado de desechos molidos de camarón (% p/v desechos/ácido).

Mezcla fórmico-acético		Mezcla fórmico-propiónico	
Ácido fórmico	Ácido acético	Ácido fórmico	Ácido propiónico
3	3	3	3
2	2	2	2
3	4	3	4
4	4	4	4

Los desechos de camarón fueron adicionados con cada una de las mezclas seleccionadas y se almacenaron bajo las condiciones ya descritas. Se tomaron muestras de los tratamientos a las 0, 18, 24 y 48 h; los pigmentos se extrajeron por el método descrito en el inciso 6.3.1. El pH del

ensilado se analizó de acuerdo al inciso 6.1.4.1 y las xantofilas totales del licor extraído por el método descrito en el inciso 6.1.5.1. El criterio de selección fue la disminución de pH y el contenido de xantofilas totales en el licor.; por este criterio se seleccionaron las mezclas de ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico.

6.1.2.2. Preparación del ensilado químico

Una vez determinados el tipo y concentración de los ácidos a utilizar en el ensilado químico, éste se llevó a cabo empleando las siguientes mezclas, por separado:

4% ácido fórmico 4%-ácido acético (v/p desechos)

4% ácido fórmico 4%-ácido propiónico (v/p desechos)

50 g de desechos previamente molidos se colocaron en frascos ámbar y se adicionó la mezcla de ácidos correspondiente (7.4 mL), se agitó suavemente y se tapó. Se almacenó durante 24 h a 4°C, midiendo el pH al inicio y final del proceso. Posteriormente, los ensilados fueron sometidos a la extracción del pigmento con una mezcla de disolventes orgánicos que consistió en éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) en una proporción 1:10 p/v, de acuerdo a lo reportado por Meyers y Bligh (1981) y Armenta (2002). Al final del tiempo de almacenamiento se obtuvo un residuo sólido y un licor, éste último conteniendo los pigmentos.

6.1.2.3. Secuencia de procesos de extracción de pigmentos

Previamente se determinó el método de extracción del pigmento, con base en el orden de aplicación de las operaciones de extracción y centrifugación, con el fin de seleccionar el más eficiente. Estas secuencias fueron:

- **Extracción-centrifugación (EC).** La extracción de los pigmentos se llevó a cabo empleando el sistema de disolventes ya indicado, durante 3 h en agitación constante a 200 rpm en una incubadora de agitación orbital Lab-Line^{MR} modelo 3525 (Melrose Park, Illinois) a temperatura ambiente y evitando la luz. Se separó el licor y el residuo sólido por centrifugación a 7000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MI (Palo Alto, California) con rotor JA-14, recuperando el sobrenadante. El residuo sólido se lavó con 25% del volumen de la mezcla de disolventes utilizada, se agitó a las mismas condiciones indicadas por 20 min, y se centrifugó nuevamente a las condiciones ya descritas; ambos licores se juntaron para eliminar la variabilidad. Al licor y al residuo sólido se le realizaron los análisis fisicoquímicos que se indican en el inciso 6.1.4.

- **Centrifugación-extracción (CE).** El ensilado acidificado (10 g) fue centrifugado a 15,000 rpm durante 20 min, obteniéndose un residuo sólido y un licor. En ambas fracciones se extrajo el pigmento bajo las mismas condiciones de extracción mencionadas en el párrafo anterior. Se llevaron a cabo los análisis fisicoquímicos indicados en el inciso 6.1.4. al licor y al residuo sólido.

En las Figuras 15 y 16 se resumen las etapas seguidas en el ensilado químico.

6.1.3. Ensilado bacteriano

6.1.3.1. Preparación del cultivo iniciador

El cultivo iniciador utilizado en la fermentación consistió en *Pediococcus pentosaceus*, aislado de desechos de camarón de aguas tropicales y amablemente proporcionado por la Dra. Zainoha Zakaira (Universidad Tecnológica de Malasia). Se utilizó como medio de propagación un caldo MRS (Bioxon), se incubó a 30°C por 48 h. Una vez reactivada se inocularon 10 mL del cultivo en matraces con 90 mL de caldo MRS; se incubó a 30°C por 24 h, midiéndose la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU^{MR} 650 (Fullerton, California) a $\lambda = 535$ nm, hasta obtener DO=2. Las bacterias lácticas fueron identificadas por tinción de Gram para asegurar la pureza del cultivo (Pérez y col., 2004)

6.1.3.2. Fermentación

La fermentación láctica de los desechos de camarón se llevó a cabo según la metodología descrita por Armenta (2002), que consistió en adicionar 10% de dextrosa anhidra (Baker) y 5% (v/p) del cultivo iniciador (DO=2) a los desechos colocados en frascos ámbar, el tiempo total de fermentación fue de 48 h a 30°C. Se registró el pH de 12 h a 48 h. Posteriormente, los ensilados fueron sometidos a la extracción del pigmento con la mezcla de disolventes orgánicos descrita anteriormente, obteniendo un residuo sólido y licor, a los cuales se les realizaron los análisis fisicoquímicos indicados en el inciso 6.1.4.

6.1.3.3. Extracción del pigmento de residuos fermentados

De la misma forma que se llevó a cabo en el ensilado químico, los ensilados obtenidos de la fermentación láctica fueron sujetos a la extracción del pigmento por una de las dos secuencias

de proceso, de forma similar a las descritas en el inciso 6.1.2.3., aunque en este caso los desechos de camarón fueron previamente fermentados.

- Extracción-centrifugación (EC). Extracción previa del pigmento con disolventes orgánicos y posterior centrifugación.
- Centrifugación-extracción (CE). Centrifugación previa de los ensilados acidificados, y posterior extracción del pigmento.

Asimismo, en ambos procesos las fracciones obtenidas en el residuo sólido y en el licor fueron analizadas de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 6.1.4. En las Figuras 15 y 16 se resumen las etapas seguidas en el ensilado bacteriano.

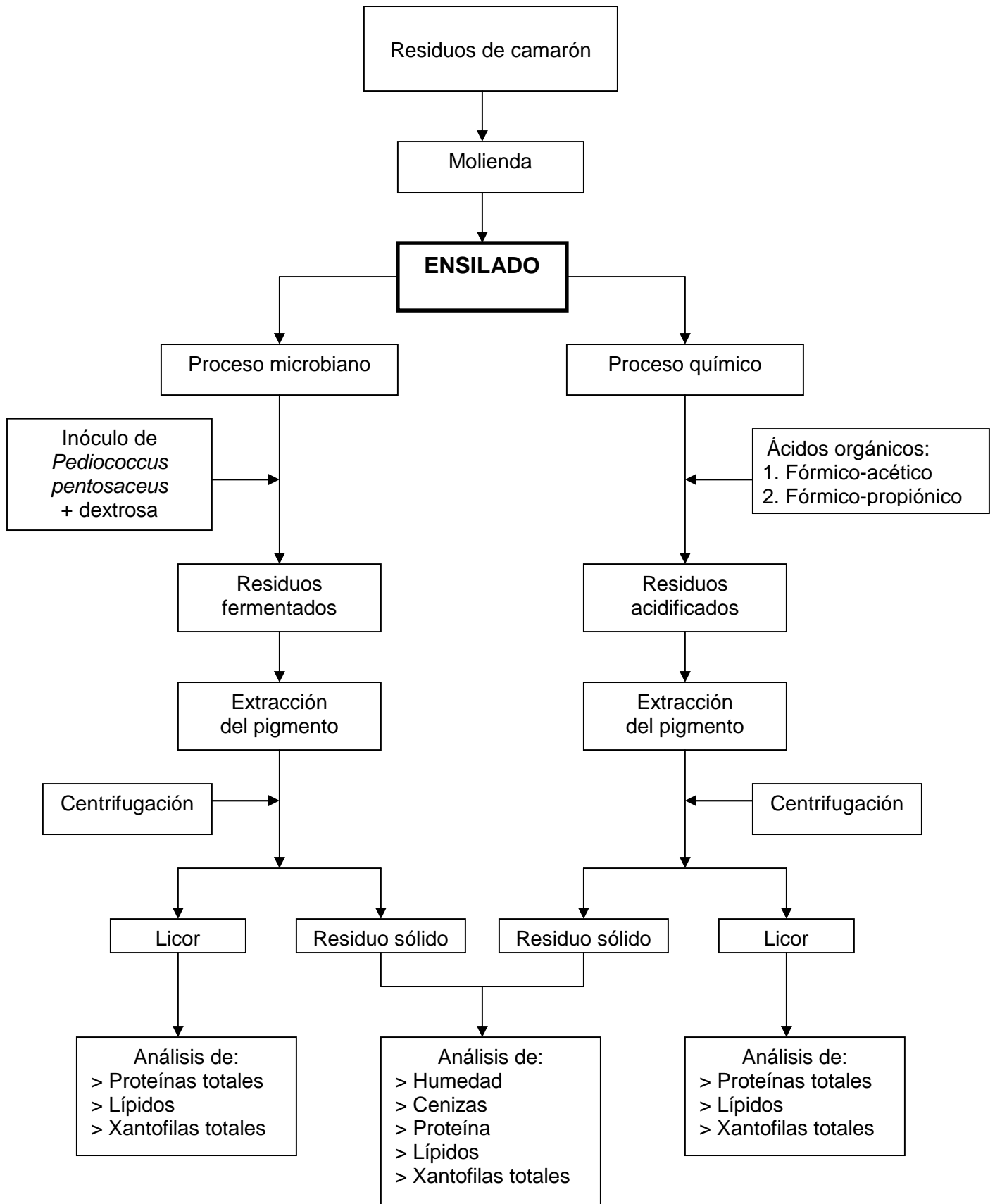


Figura 15. Obtención de pigmentos y análisis de ensilados ácido y bacteriano (secuencia de procesos extracción-centrifugación).

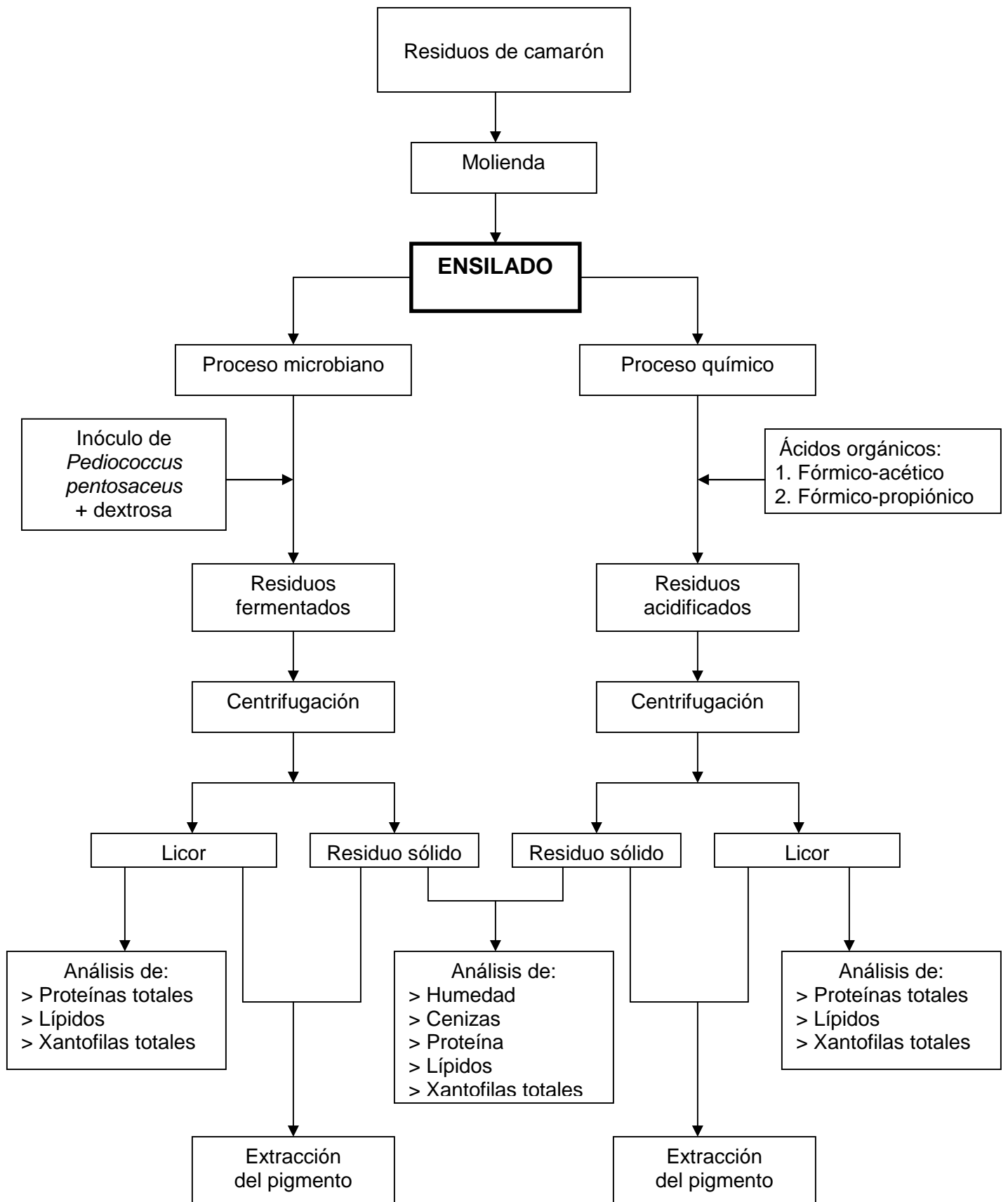


Figura 16. Obtención de pigmentos y análisis de ensilados ácido y bacteriano (secuencia de procesos centrifugación- extracción).

6.1.4. Análisis Fisicoquímicos

En la Tabla 9 se muestran los análisis realizados a cada una de las fracciones obtenidas de los ensilados en la Etapa I. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 9. Análisis realizados en los ensilados y sus fracciones.

Fracción	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Pigmentos
Residuo fresco	X	X	X	X	X
Ensilado	X	X	X	X	ND
Licor	ND	ND	X	X	X
Residuo sólido	X	X	X	X	X

ND: no determinado

6.1.4.1. pH

A 1 g de muestra se le agregaron 9 mL de agua destilada; se homogeneizó y se midió el pH en un potenciómetro ISE Beckman (Fullerton, California) previamente calibrado con una solución amortiguadora de sodio y potasio a pH 4 y 7.

6.1.4.2. Humedad

Se siguió el método reportado en AOAC (2001), el cual se basa en la pérdida de peso de la muestra por la evaporación del agua libre. Cinco gramos de desechos de camarón fueron colocados en cápsulas de porcelana de fondo plano, puesta previamente a peso constante, que se colocó en un horno de secado (Ríos Rocha, modelo HS-41, México D.F.) a 80°C durante 24 h. Al término de este tiempo se enfrió y pesó, registrándose el peso final. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso de la muestra antes y después del secado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{[A - B]}{A} \times 100$$

donde:

A: peso de la muestra húmeda (g)

B: peso de la muestra seca (g)

6.1.4.3. Cenizas

Se empleó la técnica de calcinación en mufla convencional (AOAC, 2001); este método se fundamenta en que la materia orgánica es calcinada, quedando como residuo algunas sales minerales y óxidos, considerados como cenizas. Para realizar este análisis se empleó la muestra procedente de la determinación de humedad, se colocó en un crisol puesto previamente a peso constante, calentó en forma suave en una parrilla eléctrica hasta que se carbonizó, evitando la formación de hollín. Después, fue incinerada en una mufla marca Lindberg (México D.F.) incrementando poco a poco la temperatura hasta alcanzar 550-600°C donde se mantuvo durante 1.5 h. Al concluir este tiempo, la muestra se enfrió hasta temperatura ambiente; se registró el peso final. Se calculó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{A \times 100}{B}$$

donde:

A: peso de las cenizas (g)

B: peso de la muestra fresca (g)

6.1.4.4. Proteína total

Se utilizó el método de Kjeldahl con las modificaciones reportadas por Pearson y Tauber (1984), el cual se fundamenta en la digestión de la materia orgánica por ácido sulfúrico, formándose sulfato de amonio que, en presencia de NaOH, libera amoníaco, el cual en contacto con una solución de ácido bórico, forma borato de amonio que se titula con ácido clorhídrico para determinar la cantidad de nitrógeno total liberado de la muestra. Un gramo de muestra pesada en papel filtro (Whatman) se colocó en un matraz micro Kjeldahl de digestión. Se agregaron 1.5 g de mezcla catalizadora formada por sulfatos de potasio pentahidratado y de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) (Baker) en una proporción 10:1, 2 perlas de vidrio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (Baker). Las muestras se digirieron en un digestor Kjeldahl (Labconco modelo 0000134-AE) por 4 h; se neutralizaron con NaOH al 50%. Las muestras neutralizadas se destilaron en un equipo micro Kjeldahl Labconco y titularon con una solución valorada de HCl 0.1 N (Baker). El contenido de nitrógeno total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(V_m - V_b) \times N \times (\text{meq})}{PM} \times 100$$

donde:

%N: nitrógeno total

V_m: volumen de HCl consumido en la titulación de la muestra

V_b: volumen de HCl consumido en la titulación del blanco

N: normalidad del HCl

meq: miliequivalentes del Nitrógeno (0.014007)

PM: peso de la muestra, en gramos

El contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por un factor de 6.25

$$\% \text{ Proteína cruda} = (\% \text{ Nitrógeno}) \times (6.25)$$

6.1.4.5. Lípidos totales

Se utilizó el método de Soxhlet, indicado por AOAC (2001), que se basa en la solubilidad de los lípidos en disolventes orgánicos. Una vez extraído el material lipídico, el disolvente es recuperado y la cantidad de grasa removida es determinada por diferencia de peso entre la muestra cruda y la muestra extraída. Se utilizaron dedales de celulosa a peso constante (Whatman) en los cuales se colocó 1 g de muestra seca procedente de la determinación de humedad, se cubrió con algodón para evitar salpicaduras. La extracción se llevó a cabo en un equipo de extracción Soxtec HT2 (Bromma, Suecia) usando 50 mL de hexano (Baker) como sistema de extracción. El tiempo de ebullición y extracción fue de 30 y 15 min respectivamente, para finalmente enjuagar las muestras durante 15 min. Al término de ese tiempo los dedales fueron colocados dentro de un horno para evaporar el hexano a 60°C por 15 min y posteriormente en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. El contenido de lípidos se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{[B - C]}{A} \times 100$$

donde:

A: peso de la muestra (g)

B: peso inicial del dedal + muestra

C: peso final (g)

6.1.5. Análisis de pigmentos carotenoides

6.1.5.1. Determinación y cuantificación de xantofilas totales

Los pigmentos carotenoides, determinados como xantofilas totales, fueron extraídos de los ensilados siguiendo la metodología reportada por Meyers y Bligh (1981), modificada por Armenta (2002), la cual consiste en tratar 10 g de material sólido ó 10 mL de licor obtenido en el ensilado con 100 mL del sistema de extracción (éter de petróleo-acetona-agua, 15:75:10, en las condiciones descritas en el inciso 6.1.2.3). Después de la secuencia de extracción descritas en las Figuras 16 y 17, se obtuvieron dos fracciones: un residuo sólido y un licor.

Las xantofilas totales fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el método reportado por AOAC (2001) y adaptado por Armenta (2002) empleando celdas de cuarzo resistentes a los disolventes utilizados; se midió la absorbancia a $\lambda=474$ nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. El valor de la absorbancia se sustituyó en la fórmula reportada por la AOAC (2001) para xantofilas totales.

$$\text{Xantofilas totales (mg/kg)} = \frac{A \times D}{P \times 236} \times 1000$$

donde:

A: absorbancia a 474 nm

D: factor de dilución

P: peso de la muestra (g)

236: absortividad específica de la transluteína

1000: factor de conversión a mg/kg ó $\mu\text{g/g}$

La transluteína es utilizada como referencia para xantofilas totales. El factor de dilución empleado se calculó con base en las cantidades empleadas en el sistema de disolventes:

125 mL (100 mL iniciales + 25 mL de lavado)/10 g (residuo de camarón) (v/p)= 12.5

6.1.5.2. Identificación y cuantificación de astaxantina

La concentración de astaxantina presente en los licores obtenidos de los ensilados químico y bacteriano fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (Guillou, 1993; Armenta y col., 2002). El equipo HPLC empleado tuvo las siguientes características: columna de fase reversa Symmetry^{MR} (Waters) C₁₈ (150 mm largo y 3.9 mm diámetro interno), sistema

de bombeo Waters^{MR} 626, unidad de control Waters^{MR} 600S, detector de arreglo de diodos Waters^{MR} 994 y unidad de registro y control por PC Dell 486 programa Millenium^{MR}. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo/cloroformo/metanol/agua/ácido propiónico (71:22:4:2:1); el proceso se realizó bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un tiempo total de análisis de 10 minutos. La fase móvil fue filtrada previamente con una membrana Millipore 0.45 µm resistente a disolventes orgánicos, y desgasificada por inyección de nitrógeno gaseoso. Las fracciones obtenidas también fueron filtradas previamente utilizando filtros Gelman Acrodisc^{MR} de 0.45µm. Se inyectaron volúmenes de 250 µL. El intervalo de longitud de onda empleado fue de 400-500 nm. Los cromatogramas fueron obtenidos a una longitud de onda de 474 nm que es la longitud de máxima absorción para la astaxantina. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

6.1.5.3. Análisis de estándares de carotenoides

Se llevó a cabo igualmente en un equipo HPLC descrito anteriormente (inciso 6.3.2), siguiendo la metodología reportada por Armenta (2002). Los estándares analizados fueron los siguientes: capsantina, luteína, β-caroteno (Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza), astaxantina sintética (98.5%) (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, EUA) y astaceno (CaroteNature, Basilea, Suiza). Para fines comparativos, se analizó también astaxantina sintética formulada para dietas de peces y comercializada como Carophyll pink^{MR}, con 8% de astaxantina (Hoffman-LaRoche). Cada uno de los estándares fueron disueltos en acetona en concentraciones adecuadas para el análisis y filtrados previamente (filtros de 0.45 µm Gelman Acrodisc^{MR}); se analizaron usando como fase móvil acetonitrilo/cloroformo/metanol/agua/ácido propiónico (71:22:4:2:1) bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 1 mL/min, a un intervalo de longitud de onda entre 400 y 500 nm, obteniéndose los tiempos de retención.

6.1.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se comparó la secuencia de procesamiento (centrifugación-extracción y extracción-centrifugación), incluyendo los ensilados bacterianos (centrifugación-extracción y extracción-centrifugación), en un diseño en bloques divididos, donde los bloques principales fueron: ensilado químico con ácidos fórmico-acético, ensilado químico con ácidos fórmico-propiónico y ensilado bacteriano; los sub-bloques fueron la secuencia de procesamiento (centrifugación-extracción y extracción-centrifugación); las variables de respuesta fueron: contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y pigmentos (xantofilas totales), concentración de astaxantina y astaceno.

Los resultados se analizaron por análisis de varianza ($\alpha=0.01$) y comparación múltiple de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1997). El paquete estadístico utilizado fue SAS (SAS Institute, 2002). La Tabla 10 muestra el diseño experimental empleado en la Etapa I.

Tabla 10. Diseño experimental en bloques divididos (Etapa I).

Bloque principal (tipo de ensilado)	Sub-bloque (tratamiento ácido)	Sub-bloque (secuencia de procesos)
Ensilado químico	Fórmico-acético	Extracción-Centrifugación
		Centrifugación-Extracción
	Fórmico-propiónico	Extracción-Centrifugación
		Centrifugación-Extracción
Ensilado bacteriano		Extracción-Centrifugación
		Centrifugación-Extracción

6.2. Etapa II. Estudios en desechos de camarón del Pacífico (*Litopenaeus Vannamei*, camarón blanco)

Con el fin de verificar la repetitividad del proceso, se llevaron a cabo los ensilados químico y bacteriano aplicando la misma metodología de la etapa descrita en residuos de otra especie, sujetos a almacenamiento congelado.

6.2.1 Materia prima

Se utilizaron desechos de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) capturados en el litoral del Pacífico Mexicano, adquiridos a través de la empresa "Mar Lindo" de Mazatlán, Sinaloa. El producto, en presentación de marquetas congeladas de 2.5 kg, se transportó por vía aérea de Mazatlán al laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, manteniéndose siempre en congelación. Al llegar al laboratorio, los desechos se descongelaron y molieron en molino de carne Sanitary^{MR} (México D.F, México) y almacenaron en bolsas negras de plástico a -20°C hasta su uso.

6.2.2 Ensilado químico

Los desechos molidos de *L. vannamei* fueron adicionados con ácidos 4%fórmico-4%-acético (v/p desechos) debido a que esta formulación mostró mayor eficiencia en el rendimiento del pigmento. A 50 g de desechos, colocados en frascos ámbar, se adicionaron 7.4 mL de la mezcla correspondiente de ácidos, se dejó reposar durante 24 h a 4°C; antes y después del ensilado se determinó el pH. De manera similar que en la primera etapa, los ensilados obtenidos fueron sujetos a la extracción del pigmento bajo las dos secuencias de proceso ya mencionadas: extracción-centrifugación (EC) y centrifugación-extracción (CE), como se describe en el inciso 6.1.2.3. En ambos casos, se obtuvo un residuo sólido y un licor; estas fracciones se sujetaron a los análisis fisicoquímicos y de pigmentos que se describen en los incisos 6.1.4. y 6.1.5.

6.2.3. Ensilado bacteriano

A 50 g de desechos molidos colocados en frascos ámbar, se adicionó 10% de dextrosa y 5% de inóculo (*Pediococcus pentosaceus*) preparado como se indica en el inciso 6.1.3.1.; las muestras se incubaron por 48 h a 30°C según se describe en el inciso 6.1.3.2. La determinación del pH se llevó a cabo al inicio y al final de la fermentación. De la misma forma que en el ensilado químico, los ensilados obtenidos de la fermentación fueron sujetos a la extracción del pigmento por las dos secuencias ya mencionadas: extracción-centrifugación (EC) y centrifugación-extracción (CE), en ambos casos se obtuvo un residuo sólido y un licor.

6.2.4. Identificación y cuantificación de xantofilas totales y astaxantina

En los productos de ambos ensilados, químico y bacteriano, los pigmentos carotenoides fueron extraídos siguiendo la metodología reportada por Armenta (2002), empleando un sistema de disolventes (éter de petróleo-acetona-agua, 15:75:10) bajo las condiciones descritas en el inciso 6.1.2.3. De la secuencia de extracción de pigmentos (extracción-centrifugación y centrifugación-extracción), se obtuvieron dos fracciones: un residuo sólido y un licor conteniendo los carotenoides. Los pigmentos fueron cuantificados como xantofilas totales por espectrofotometría según se describe en el inciso 6.1.5.1. La concentración de astaxantina en el licor fue analizada y cuantificada por HPLC por las mismas condiciones descritas en el inciso 6.1.5.2.

6.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue similar al indicado en el inciso 6.1.6. Se comparó la secuencia de procesamiento (centrifugación-extracción y extracción-centrifugación), tanto en el ensilado químico como en el bacteriano, empleando un diseño de bloques divididos. La Tabla 11 muestra el diseño experimental empleado en esta etapa. Las variables de respuesta fueron: contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y pigmentos (xantofilas totales), concentración de astaxantina y astaceno. Los resultados se analizaron por análisis de varianza ($\alpha=0.01$) y comparación múltiple de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1997). El paquete estadístico utilizado fue SAS (SAS Institute, 2002).

Tabla 11. Diseño experimental en bloques divididos (Etapa II).

BLOQUE PRINCIPAL (tipo de ensilado y tratamiento ácido)	SUB BLOQUE (secuencia de procesos)
Ensilado químico (Fórmico-acético)	Extracción-Centrifugación
	Centrifugación-Extracción
Ensilado bacteriano	Extracción-Centrifugación
	Centrifugación-Extracción

6.3. Etapa III. Estudios de estabilidad de astaxantina en sistemas modelo y real

Con el fin de conocer el posible uso de la astaxantina obtenida en sistemas modelo, se adicionó el extracto obtenido en dos sistemas modelo, una solución de proteína y un aceite, y a una pasta cárnica simple, y se evaluó su estabilidad a través de su degradación a astaceno.

6.3.1. Obtención de los extractos

La estabilidad del pigmento fue estudiada en el licor obtenido por el proceso más eficiente, el cual fue ácidos 4%fórmico-4%acético y por la secuencia de extracción CE (Centrifugación-Extracción). Después de eliminar los solventes del licor por evaporación utilizando un rotoevaporador Büchi RE 111 (Flawil, Suiza) en baño maría a 40°C hasta alcanzar una concentración del licor aproximadamente del 31%; el sólido obtenido fue disuelto en un volumen

conocido de acetona (100 mL), obteniéndose una concentración de astaxantina de 1.7032 E-02 mg astaxantina/mL acetona. Este extracto concentrado se colocó en frascos ámbar y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.3.2. Estabilidad de astaxantina en sistemas modelo

6.3.2.1. Sistema aceite-pigmento

Una alícuota del extracto concentrado (3 mL, 1.7032 E-02 mg astaxantina/mL acetona) fue adicionada a aceite de girasol comercial (72 mL) obteniéndose una relación 4% V/V licor /aceite. La mezcla fue almacenada en cuatro frascos cerrados de vidrio incoloros transparentes y en cuatro frascos cerrados ámbar. Dos frascos translúcidos y dos frascos ámbar se abrieron cada 24 h y agitaron para incorporar aire. Otro lote de cuatro frascos ámbar e incoloros transparentes se taparon herméticamente y se conectaron al vacío para asegurar la ausencia de aire. Se incorporaron también como variables de respuesta el almacenamiento bajo lámparas fluorescentes de 750 lux o en oscuridad; y la temperatura de almacenamiento (4 y 20°C). El tiempo total de análisis fue de 5 semanas; se llevó a cabo una repetición completa del estudio

La estabilidad del pigmento en aceite de girasol fue analizada como contenido de xantofilas totales y astaxantina. Para ello, cada semana se tomaron muestras de 10 mL para determinar xantofilas totales por espectrofotometría, según se indica en el inciso 6.1.5.1. Para determinar la concentración de astaxantina, previamente se realizó la extracción del pigmento colocando 2 mL de la muestra en frascos ámbar; se agregaron 10 mL de la mezcla de extracción (éter de petróleo-acetona-agua, 15:75:10) se agitaron por 3 h a 200 rpm y se centrifugó el licor (10 min a 7000 rpm) para separar el aceite de la mezcla de disolventes; éste se guardó en frascos ámbar y se analizó por HPLC bajo las mismas condiciones ya mencionadas indicadas en el inciso 6.1.5.2.

6.3.2.2. Sistema proteína-pigmento

Se realizaron pruebas preliminares utilizando albúmina de huevo en diferentes concentraciones (1 a 5% p/v albúmina:agua) para determinar la concentración adecuada. El criterio de selección fue la solubilidad del extracto en la solución de albúmina y que la solución del pigmento en la albúmina permaneciera translúcida, concluyéndose que la concentración de albúmina más adecuada fue 1%. Se adicionó una alícuota del extracto de astaxantina (2.4 mL) con una

concentración indicada en el inciso de 6.3.2.1. a una solución de albúmina de huevo al 1% (80 mL) obteniendo una concentración de 3% v/v extracto/albúmina; se añadió Tween 80 como antiespumante. Las muestras fueron almacenadas en frascos cerrados traslúcidos y ámbar en condiciones de iluminación, presencia de aire, y temperatura como se indica en el inciso 6.3.2.1., por un tiempo total de análisis de 5 semanas; se llevó a cabo una repetición completa del estudio. De manera similar al estudio con el sistema lipídico, cada semana se tomaron muestras de 10 mL para determinar xantofilas totales por espectrofotometría. Para analizar la concentración de astaxantina, se llevó a cabo previamente la extracción del pigmento con el sistema de solventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10), como se indica en el inciso 6.3.2.1. El pigmento extraído se analizó por HPLC (inciso 6.1.5.2.).

6.3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico de los sistemas lipídico y proteico

Se empleó un modelo totalmente al azar en arreglo factorial completo ($2^3 \times 5$); los factores y niveles fueron: presencia de aire (aire-vacío); luz-oscuridad; temperatura (4 y 20°C), tiempo (0,1, 2, 3, 4, 5 semanas) (Tabla 12). Las variables de respuesta fueron el contenido de xantofilas totales y la concentración de astaxantina durante un periodo de cinco semanas. El modelo se sujetó a análisis de varianza y un análisis de comparación de medias de Duncan empleando un paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

Tabla 12. Diseño totalmente al azar en arreglo factorial completo $2^3 \times 5$ (Etapa III: sistemas proteico y lipídico).

Disponibilidad de oxígeno	Iluminación	Temperatura (°C)	Tiempo (semanas)
Aire	Luz	4	0,1,2,3,4,5
		20	0,1,2,3,4,5
	Oscuridad	4	0,1,2,3,4,5
		20	0,1,2,3,4,5
Vacío	Luz	4	0,1,2,3,4,5
		20	0,1,2,3,4,5
	Oscuridad	4	0,1,2,3,4,5
		20	0,1,2,3,4,5

6.3.3. Cinética de degradación del pigmento

Se estudió en el sistema modelo proteico solamente. Las concentraciones de astaxantina, resultado del análisis por HPLC en muestras almacenadas bajo cada tratamiento (luz-oscuridad; presencia-ausencia de aire; 4 y 20°C) fueron la base de cálculo para obtener la constante de velocidad de reacción (k), y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Los datos se ajustaron a un modelo curvilíneo, aplicando logaritmos naturales a la siguiente función exponencial (Belén-Camacho y col., 2004; Niamnuy, 2008):

$$\ln A = \ln A_0 - kt$$

donde:

A_0 – concentración inicial de astaxantina

A – concentración final de astaxantina

k – constante de velocidad de reacción

El tiempo de vida media ($t^{1/2}$) se calculó de la ecuación: $t^{1/2} = \ln 2/k$.

6.3.3.1. Análisis estadístico

Las diferencias significativas para k y $t_{1/2}$ entre tratamientos se analizaron por medio de análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan empleando un paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

6.3.4. Estabilidad de astaxantina en una pasta cárnica simple

6.3.4.1. Pasta cárnica simple

Se empleó la formulación de una pasta cárnica simple que se indica en la Tabla 13 (Hernández, 2004), eliminando los aditivos o saborizantes que pudieran interferir con los análisis de pigmentos carotenoides. Para la elaboración de esta pasta, una porción de la carne, el cloruro de sodio, el fosfato de potasio y el agua fría se molieron en una licuadora doméstica por 1 min. El resto de la carne y el Acoline se molieron por separado en licuadora; ambas mezclas se combinaron. La pasta se mantuvo menor a 10°C, por lo que la molienda se hizo por lapsos cortos de tiempo. Se consideró terminado el proceso cuando la pasta presentó un aspecto homogéneo.

Tabla 13. Formulación de pasta cárnica empleada.

Ingrediente	Cantidad (g)
carne magra de cerdo	59.0
lardo congelado	14.0
agua fría	30.0
cloruro de sodio	3.18
fosfato de potasio monobásico	0.45
Acoline (emulsificador comercial)	0.10

Se colocaron muestras de 5 g de esta pasta en frascos transparentes tapados, para formar 3 series de 5 frascos cada una. A cada una de las muestras se agregaron las concentraciones de astaxantina que se indican en la Tabla 14. Se almacenaron a 4°C por un tiempo total de estudio de 4 semanas, tomando muestras a las 0, 1, 2, 3 y 4 semanas para analizar la concentración de astaxantina. Previo al análisis se realizó la extracción del pigmento colocando la emulsión en un frasco ámbar con 50 mL de la mezcla de disolventes de extracción (éter de petróleo:acetona:agua, 15:75:10); los frascos se colocaron en una agitadora orbital a 200 rpm por 3 h, después de este tiempo, el licor obtenido se centrifugó (10 min a 7000 rpm) para separar los solventes con el pigmento. Este líquido se almacenó en frascos ámbar para analizar la concentración de astaxantina por HPLC con la metodología descrita en el inciso 6.1.5.2.

6.3.4.2. Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño totalmente al azar en arreglo factorial completo (5x5). Los factores y niveles fueron: concentración de astaxantina (5 niveles) y tiempo de almacenamiento (5 niveles) (Tabla 14). Las variables de respuesta fueron el contenido de xantofilas totales y la concentración de astaxantina. El modelo se sometió a un análisis de varianza y un análisis de comparación de medias de Duncan utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

Tabla 14. Diseño totalmente al azar en arreglo factorial completo (5x5).
(Etapa III: pasta cárnica simple).

Astaxantina añadida a 5 g de una pasta cárnica simple (mg astaxantina)	Tiempo de almacenamiento (semanas)
0.17932	0,1,2,3,4
0.34064	0,1,2,3,4
0.51096	0,1,2,3,4
0.68128	0,1,2,3,4
0.85166	0,1,2,3,4

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Etapa I. Estudios en desechos de Camarón del Golfo de México (*Litopenaeus aztecus*, camarón café)

7.1.1. Materia prima

En la Tabla 15 se muestra la composición química de los residuos de camarón. En estos resultados se observó un alto contenido de humedad (76.8%) lo cual es común en este tipo de productos. Se han reportado datos sobre el contenido de humedad en cabezas de camarón de 78 al 81% (Meyers, 1981). Asimismo, cabe destacar el alto contenido de cenizas (39.42%) como característica principal de los desechos del camarón, debido a la concentración de carbonato de calcio. De igual forma, se observó un alto contenido de proteínas (35.65%), lo que hace a estos residuos una fuente potencial para la obtención de hidrolizados proteicos.

Tabla 15. Composición proximal de los residuos camarón café (*Litopenaeus aztecus*).

Componente	Valores reportados (g/100g base seca)		Valores obtenidos (g/100g base seca)
	Residuos cangrejo	Residuos camarón	Residuos camarón
Humedad	75-81 ^b	78.00 ^d ; 79.51 ^e	76.80 ±1.25
Cenizas	35.70 ^b	32-39 ^d	39.42 ±2.57
Proteínas	17.79 ^a	41.90 ^c ; 33-40 ^d	35.65 ±3.06
Lípidos	6.70 ^b	6.80 ^f	6.10 ±0.12

* base húmeda

^a Shahidi y Synowiecki (1991) en cangrejo blanco (*Chionoecetes opilio*)

^b Meyers y Bligh (1981) en cangrejo de río (*Procambarus clarkii*)

^c Shahidi y Synowiecki (1991) en camarón (*Pandalus borealis*)

^e Guillou y col. (1995) en camarón (*Pandalus borealis*)

^f Meyers (1987)

De acuerdo con los resultados anteriores, se observó que los valores obtenidos en este trabajo coincidieron con los reportados por diversos autores (Meyers y col., 1981; Shahidi y Synowiecki, 1991; Guillou y col., 1995). Igualmente, estos datos fueron similares a los obtenidos por Hagen y col. (2008) quienes reportaron 78% de humedad, 33-40% de proteínas y 32-39% de cenizas en residuos de camarón *Pandalus borealis*. Cabe señalar que la composición de los desechos de camarón de diferentes especies pudiera presentar variaciones debido a factores tales como la especie (silvestres o cultivo), tecnología del descabezado (manual o mecánica), condiciones de alimentación, muestreo, análisis químico, etcétera.

En el presente estudio los residuos de camarón mostraron un pH alcalino (8.5), que lo hace un producto altamente perecedero y propicio para el desarrollo de microorganismos patógenos, lo cual obliga a emplear tecnologías que los conserven y estabilicen a sus componentes. En cuanto al contenido de xantofilas totales, los residuos sin tratamiento bajo el sistema de extracción descrito en el inciso 6.1.5.1, tuvieron una concentración de 26.63 µg/g, similar a la reportada por Armenta y col. (2002), de 27.26 µg/g.

7.1.2. Formulación de mezclas de ácidos orgánicos

Para determinar las condiciones del ensilado, inicialmente los residuos de camarón fueron adicionados individualmente con cada uno de los ácidos orgánicos propuestos: fórmico, acético y propiónico, en concentraciones de 1, 1.5, 2, 3, 3.5 y 4 % p/v desechos. Después de 24 horas de almacenamiento, se observó que en los ensilados donde se utilizó la máxima concentración de ácido (4% p/v residuo) el pH disminuyó de 8.5 a 5.47, 5.56 y 6.62 con ácido fórmico, acético y propiónico, respectivamente (Figura 17). Sin embargo, estos valores obtenidos no fueron aceptables ya que en el proceso de ensilado se han recomendado valores de $5 > \text{pH} > 2$ (Aranson, 1994) para que el ensilado sea eficiente como método de preservación contra microorganismos indeseables que puedan deteriorar el producto biológico.

Los ácidos orgánicos utilizados en este trabajo han sido ampliamente reportados para su uso en ensilados (Rouvinen, 2001; Winter y Feltham, 1983), debido a sus propiedades antimicrobianas y por sus valores de pKa (3.75, 4.75 y 4.86 para ácidos fórmico, acético y propiónico, respectivamente), ya que la actividad antimicrobiana se incrementa cuando el valor de pH está por debajo del pKa del ácido débil, debido a que el ácido debe encontrarse en su forma no disociada para actuar como antimicrobiano (Raa, 1982).

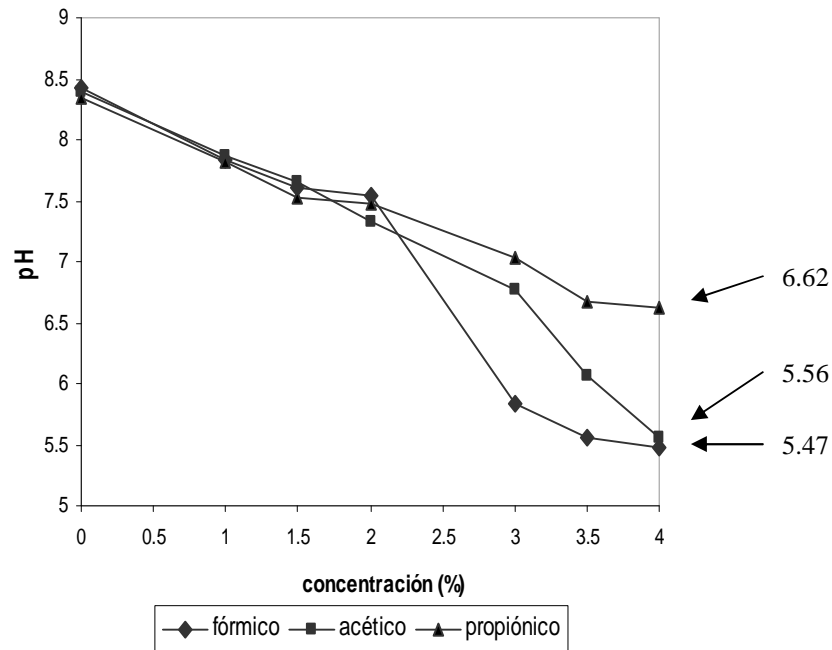


Figura 17. pH de los ensilados tratados con ácidos orgánicos a diferentes concentraciones.

Para obtener el pH óptimo del ensilado se estudiaron combinaciones entre los ácidos, con base en reportes en la literatura (Aranson, 1994), en donde se señala una mayor eficiencia en el abatimiento del pH empleando dichas combinaciones, a la vez que se disminuye el costo de la operación, si ésta se lleva a escala industrial.

Las combinaciones formuladas fueron las siguientes:

- i. Ácidos fórmico-acético: Se utilizaron concentraciones de 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 y 4.0% (p/v residuo) de ambos ácidos, obteniéndose 42 combinaciones posibles, con base en la disminución del pH del ensilado a valores inferiores a 5, solo 10 combinaciones fueron eficientes (mayormente las que contenían altas concentraciones de ácidos, 3 a 4% de fórmico y acético). Los resultados son mostrados en la Figura 18.
- ii. Combinación ácidos fórmico-propiónico: Se utilizaron concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0% (p/v residuo) de ambos ácidos, obteniéndose 20 combinaciones posibles, de éstas se seleccionaron 5 que abatían el pH a valores menores de 5. Los resultados son mostrados en la Figura 19.

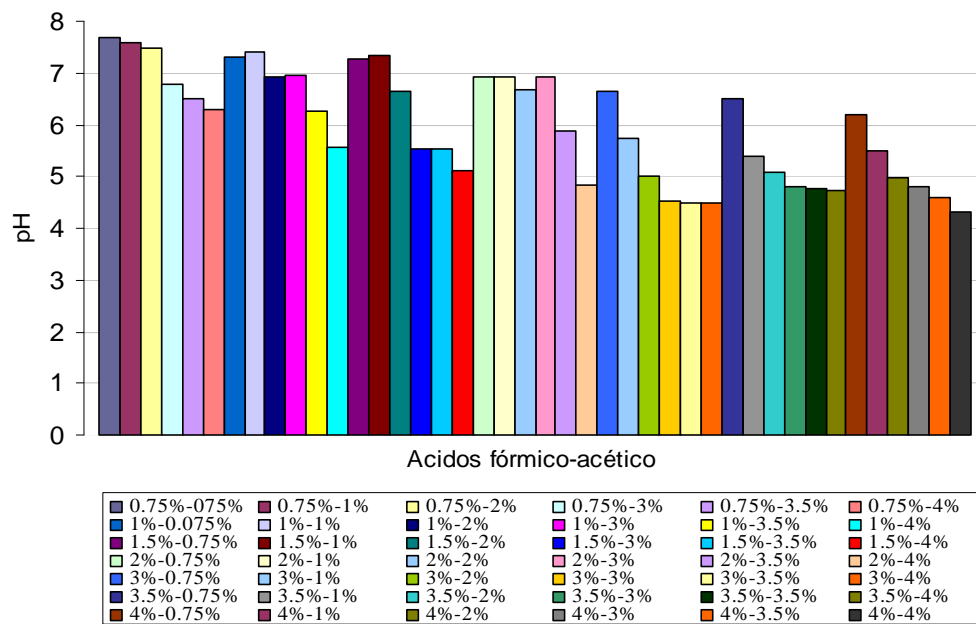


Figura 18. pH del ensilado después del tratamiento con combinaciones de ácidos. Fórmico-Acético

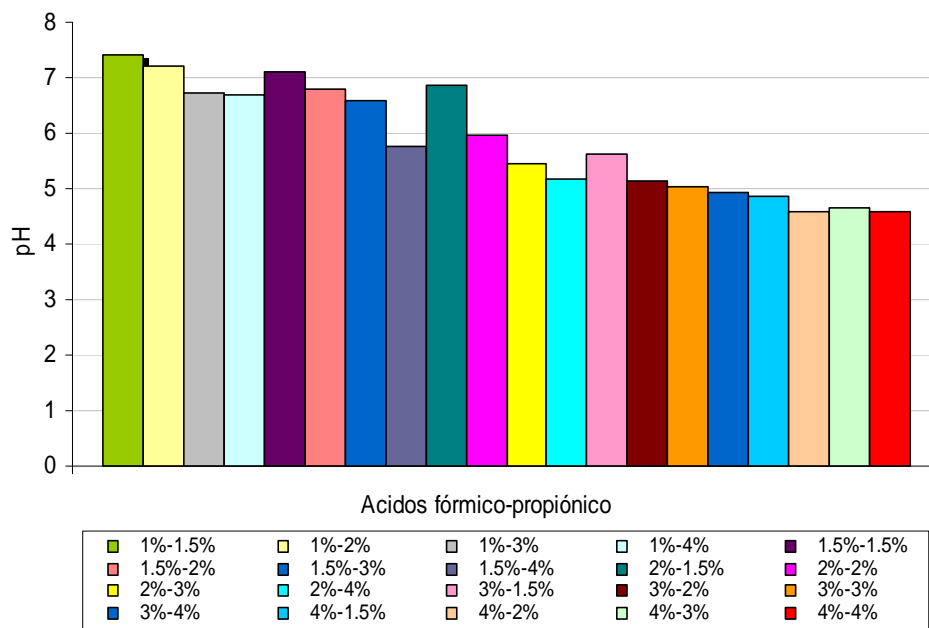


Figura 19. pH de ensilado después del tratamiento con combinaciones de ácidos. Fórmico-Propiónico

Los resultados anteriores mostraron que, del total de combinaciones propuestas con los ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico (62), solo 15 fueron eficientes para abatir el pH a valores menores de 5, y por lo tanto eran viables para emplearse en un ensilado químico. Ambas combinaciones, ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico, promovieron una disminución rápida de pH de 8.5 a 4.31 y 4.6, respectivamente, inmediata a la adición de los ácidos, siendo nivel de pH necesario para llevar a cabo un ensilado químico en forma eficiente.

De las 15 combinaciones (ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico) obtenidas como viables para ser empleadas en el ensilado, solo 8 de ellas abatieron el pH a valores entre $3 < \text{pH} < 4.5$. Este intervalo, de acuerdo con Aranson (1994) es necesario en un ensilado químico debido a que sirve como método de preservación contra microorganismos que causan deterioro del material biológico. Para poder determinar las condiciones óptimas del ensilado químico, estas 8 combinaciones seleccionadas fueron evaluadas bajo dos variables: el pH final obtenido después del ensilado, y el posible efecto causado en el contenido de xantofilas totales. Por ello, las combinaciones de ácidos seleccionadas fueron adicionadas en los residuos de camarón y almacenadas bajo las condiciones descritas en el inciso 6.1.2.2. Se tomaron muestras de los ensilados a las 0, 18, 24 y 48 h, midiendo el pH de acuerdo con el inciso 6.1.4.1, y se extrajeron y analizaron las xantofilas totales, siguiendo las metodologías reportadas en los incisos 6.1.2.3 y 6.1.5.1. Los resultados obtenidos por las 8 combinaciones de ácidos indicaron que la disminución de pH fue de forma rápida al momento de la adición de éstos; sin embargo, el pH se mantuvo constante durante 48 h de almacenamiento. Las combinaciones 4% fórmico-4% acético y 4% fórmico-4% propiónico abatieron el pH a valores inferiores a 4.5. Se observó que los ensilados almacenados durante 48 h cambiaron de un estado semisólido a semilíquido, con un olor agradable a ácido, y a simple vista no mostraron signos de contaminación bacteriana. Con relación al contenido de xantofilas totales, se observó una disminución gradual de éstas al inicio del proceso de ensilado, esta degradación fue menos acentuada posteriormente. En los residuos tratados con 3% fórmico-3% acético y 2% fórmico-4% propiónico, el contenido de xantofilas totales se mantuvo constante. Esta pérdida de xantofilas al inicio, aparentemente debido a la adición de ácidos, también pudiera deberse a factores ambientales, como la presencia de oxígeno y la incidencia de luz durante el almacenamiento en los frascos, ocasionando reacciones de oxidación y/o isomerización de las xantofilas. La combinación 3% fórmico-4% acético fue la que tuvo mayor efecto significativo en la degradación de xantofilas, mientras que las combinaciones 3% fórmico-3% acético (con 25.413 μg de xantofilas/g residuo) y 2% fórmico-4% propiónico (25.392 μg xantofilas/g residuo) fueron las que

ocasionaron menor degradación, sin diferencias significativas entre ellas. Los resultados son mostrados en la Figura 20, A y B.

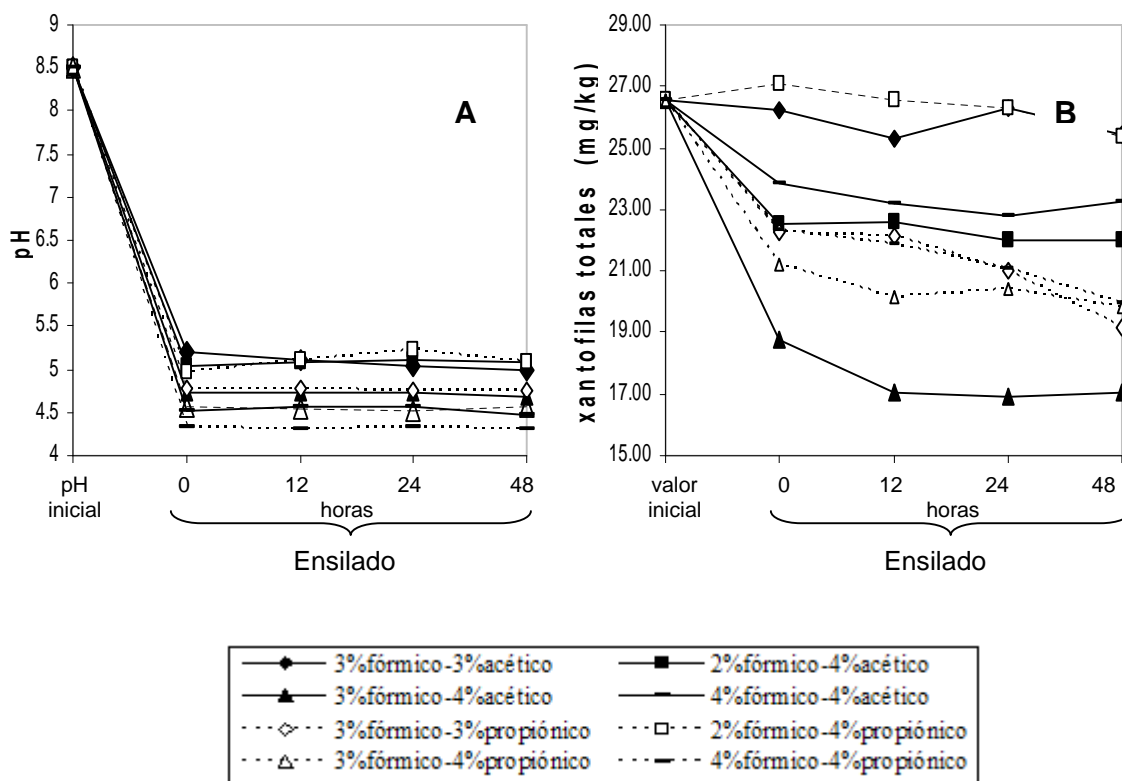


Figura 20. Valores de pH y contenido de xantofilas totales en ensilados químicos con diferentes combinaciones de ácidos orgánicos.

Las combinaciones más eficientes para disminuir el pH en el ensilado químico fueron:

- I. 4% ácido fórmico-4 % ácido acético (FA)
 pH final del ensilado: 4.5
 concentración de xantofilas totales: 23.263 mg/kg residuo
- II. 4% ácido fórmico-4% ácido propiónico (FP),
 pH final del ensilado: 4.3
 concentración de xantofilas totales: 19.947 mg /kg residuo

Estos ácidos orgánicos, fórmico, acético y propiónico, han sido reportados ampliamente como conservadores en la industria alimentaria, particularmente para la prevención y control del crecimiento bacteriano (Badui, 2006). Su mecanismo de acción se basa en la reducción del pH del sistema; en condiciones de bajo pH el ácido débil se encuentra en la forma no disociada, pudiendo permear al interior de la célula a través de la membrana (Wilson y col., 2000). Una vez dentro de la célula, donde el pH es cercano a la neutralidad, el ácido se disociará y protones y

aniones quedan atrapados en el interior de la célula; al acumularse el anión, el pH interno disminuye. Ambos factores, disminución neta de pH y acumulación del anión, contribuyen al efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos (Raa, 1982). El 50% del ácido propiónico está en su forma disociada a $\text{pH} < 4.86$ (pKa 4.86); mientras que el 50% del ácido fórmico está disociado a $\text{pH} < 3.75$ (pKa 3.75); en el caso de ácido acético esta situación ocurre a $\text{pH} < 4.75$ (pKa 4.75). Por tanto, el ensilado con ácido propiónico puede llevarse a cabo a mayor pH (Raa, 1982). Aranson (1994) indica que un ensilado químico debe de tener un pH entre 2 y 4.5, intervalo en el que se ubicaron los valores de pH obtenidos en este estudio.

7.1.3. Ensilado químico de los residuos de camarón (*L. aztecus*)

7.1.3.1. Condiciones óptimas del ensilado químico

Se procedió a estudiar el ensilado químico de los residuos de camarón empleando las dos combinaciones de ácidos: 4% fórmico-4% acético (FA) y 4% fórmico-4% propiónico (FP), seleccionadas anteriormente. Después de 24 h de ensilado ácido de los residuos llevado a cabo como se indica en el inciso 6.1.2.2., se observó la disminución de pH de 8.5 a 4.28 y 4.40 para FA y FP (valores medios), respectivamente (Figura 21).

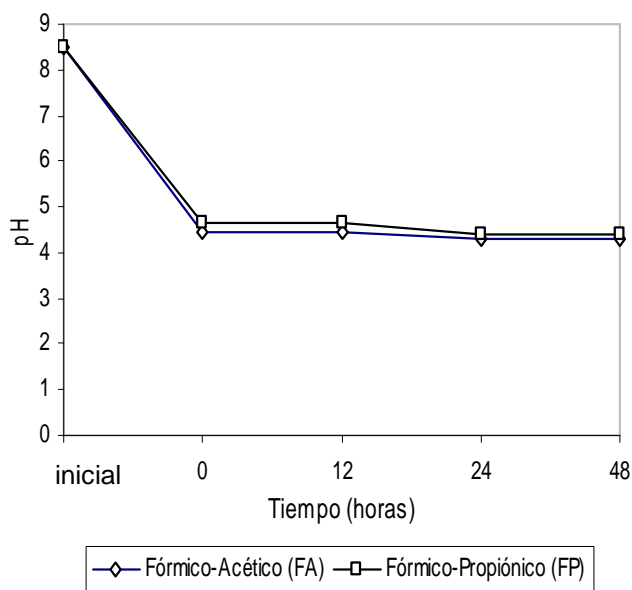


Figura 21. Disminución del pH en residuos de camarón en ensilado químico.

Se observó que el ensilado químico promovió una rápida reducción de pH, alcanzando valores constantes en 48 h. Tanto en los ensilados tratados con FA como con FP el producto presentó una consistencia semilíquida y con agradable olor acidificado, y a simple vista no se observaron indicios de contaminación bacteriana.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Torrissen y col. (1981) quienes obtuvieron pH de 4 adicionando 4.8% de una mezcla de ácido sulfúrico (50%) y ácido propiónico (1.2%) a desechos de *Pandalus borealis*. Asimismo, Sachindra y col., (2007) realizaron el ensilado de desechos de *Penaeus indicus* usando ácido propiónico (15 %) y obtuvieron pH 4.5, el cual se mantuvo constante por varias semanas de almacenamiento. Asimismo, se ha reportado que la astaxantina presenta mayor estabilidad en ensilados ácidos de residuos de camarón a pH 4, mejorando la extracción del pigmento, pero sin que haya degradación excesiva de compuestos, como las proteínas, que pueden dar sabores desagradables (Torrissen y col., 1981).

7.1.3.2. Efecto de la secuencia de extracción del pigmento en los parámetros fisicoquímicos

La Tabla 16 reporta los resultados de los análisis químicos realizados en los residuos frescos, residuos ensilados y en las fracciones obtenidas (residuo sólido y licor, ésta última conteniendo los pigmentos carotenoides). Estos datos indicaron los cambios en la composición química de los desechos de camarón en cada etapa durante el proceso de ensilado y extracción del pigmento. Se desarrollaron en forma paralela dos procesos secuenciados de acuerdo al orden de extracción del pigmento [Extracción-Centrifugación (EC) y Centrifugación-Extracción (CE)] y se analizó el efecto de esta secuencia en los parámetros fisicoquímicos de los residuos y en el rendimiento del pigmento.

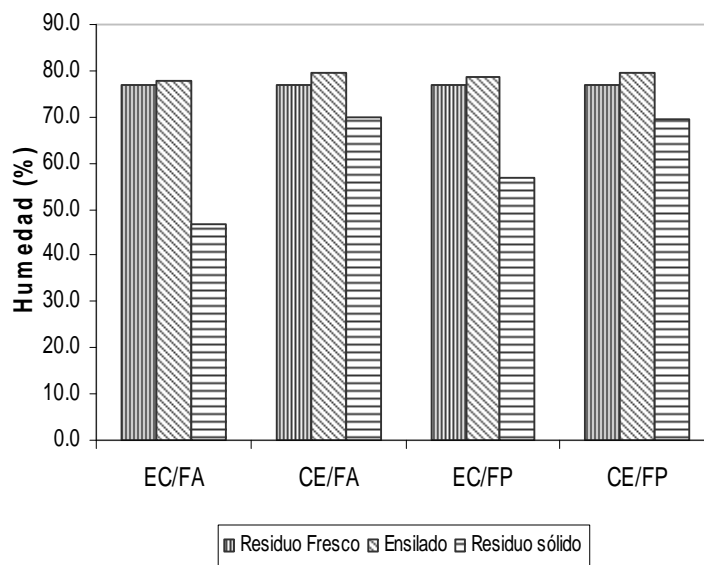
Tabla 16. Composición de los ensilados químicos y sus fracciones.

Secuencia	Combinación de ácidos	Fracción	Análisis fisicoquímicos			
			Humedad *	Cenizas (g/100g base seca)	Proteínas	Lípidos
Extracción-Centrifugación	Fórmico-Acético	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
		residuo ensilado	77.96	37.23	35.57	1.70
		licor	na	na	6.11	1.60
		residuo sólido	46.80	30.07	29.46	0.10
Centrifugación-Extracción	Fórmico	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
		residuo ensilado	79.60	34.39	34.14	4.92
		licor	na	na	6.56	3.55
		residuo sólido	69.90	25.03	27.58	1.37
Extracción-Centrifugación	Fórmico-Propiónico	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
		residuo ensilado	78.79	34.42	35.06	2.10
		licor	na	na	5.00	1.50
		residuo sólido	56.97	34.28	30.07	0.60
Centrifugación-Extracción	Fórmico	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
		residuo ensilado	79.40	33.66	34.05	3.62
		licor	na	na	6.20	1.78
		residuo sólido	69.66	27.12	27.85	1.84

*% base húmeda
na= no analizado

Humedad

La Figura 22 muestra el contenido de humedad en los ensilados; éste fue mayor en 2.53 % (EC) y 3.6% (CE) para FA y 1.23 (EC) y 3.3% (CE) para FP con respecto a los residuos frescos. Este aumento pudo ser debido a la adición de los ácidos durante el ensilado, y a la liberación de agua durante la hidrólisis de las proteínas, produciendo un cambio en la consistencia de los residuos de camarón pasado de un estado semisólido a semilíquido. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los ensilados, con valores medios de humedad de 77.9% (EC) y 79.6% (CE) para FA y 78.7 (EC) y 79.4% (CE) para FP. Los resultados concuerdan a los reportados por Meyers y Bligh (1981) quienes indican 81% de humedad en residuos de camarón ensilados, aunque estos valores pueden variar de acuerdo a la especie estudiada. En los anexos 1 y 2 se indica el análisis de varianza y la comparación múltiple de medias.



EC/FA: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Acético; EC/FP: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Propiónico; CE/FA: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Acético; CE/FP: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Propiónico

Figura 22. Contenido de humedad en los ensilados y sus fracciones.

El contenido de humedad en los residuos sólidos del proceso CE en ambas formulaciones de ácidos fue mayor que en los residuos sólidos del proceso EC, encontrándose diferencias significativas entre ambos procesos de extracción ($P < 0.001$). En el proceso de extracción EC el residuo sólido mostró una disminución en el contenido de humedad de 40% y 28.4% en formulaciones FA y FP respectivamente, con respecto al ensilado, encontrando diferencias significativas entre ambas formulaciones ($P < 0.001$) y del 39% (FA) y 25.8% (FP) con respecto a la materia prima. Después de la extracción, el ensilado FA obtuvo 79% de licor y 11% de residuo sólido, y en el ensilado FP fue de 77% de licor y 5% de residuo sólido. En la fracción del licor se solubilizaron los pigmentos carotenoides, mostrando un color anaranjado intenso.

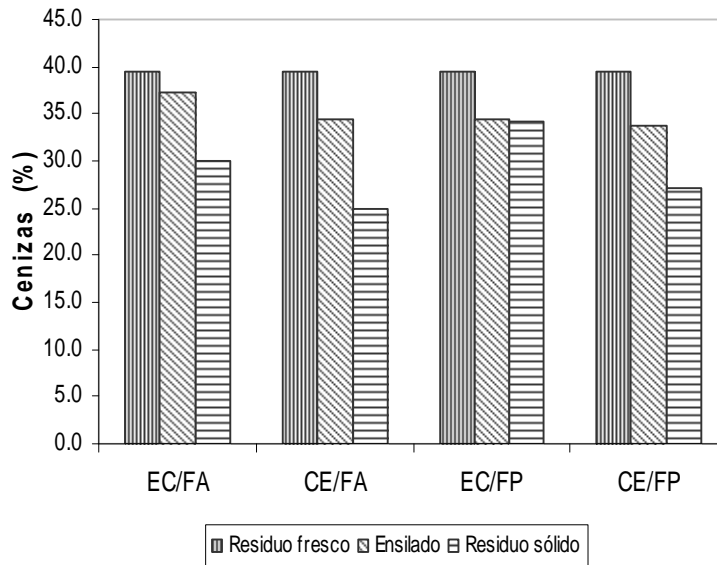
En el proceso CE, puesto que fue la primera etapa del proceso previo a la extracción, se observó que el contenido de humedad en el residuo sólido obtenido disminuyó en menor proporción con respecto al ensilado (12% en ambos FA y FP con respecto al residuo ensilado), no mostrando diferencia significativa ($P > 0.01$) entre ambas formulaciones. Después de la centrifugación se encontró que en FA se obtuvo 47% de residuo sólido y 52% de licor (peso húmedo); mientras que en FP fue 50% de residuo sólido y 48% de licor (peso húmedo).

Los resultados mostraron que en esta secuencia de extracción (CE), los componentes del ensilado después del centrifugado fueron recuperados en dos fracciones (residuo sólido y licor),

en proporciones muy similares debido a la consistencia semilíquida del ensilado, posteriormente se realizó la extracción del pigmento en cada una de las fracciones obtenidas, recuperando los pigmentos carotenoides en la fracción del licor.

Cenizas

Las cenizas en los crustáceos están, en gran parte, constituidas por fosfatos y carbonatos de calcio y otros minerales en menor proporción (Akpan, 1997). Estos compuestos constituyen uno de los principales componentes del exoesqueleto del camarón en concentraciones entre 15-35% (Lee y Peniston, 1982), aunque otros autores han reportado valores más altos, de 30-60% (Shirai y col., 1996). Olivera y col. (2007) reportaron que el cefalotórax de camarón contenía alta concentración de calcio (449 mg/100g) y fósforo (44 mg/100g), lo cual hace difícil incorporar los residuos directamente en dietas peletizadas de salmónidos; sin embargo, una alternativa para solubilizar a las cenizas en crustáceos es el ensilado. La Figura 23 muestra que el contenido de cenizas en los ensilados disminuyó en 5.5% (EC) y 12.7% (CE) en el ensilado FA y 12.6% (EC) y 14.6% (CE) en FP respectivamente, con respecto a los residuos frescos; estos resultados fueron satisfactorios puesto que uno de los objetivos del proceso de ensilado en desechos de crustáceos es disminuir el contenido de cenizas. Esta reducción en el contenido de cenizas es importante especialmente en las formulaciones de las dietas para salmónidos, en las cuales los niveles excesivos de carbonatos son nocivos (Olivera y col., 2007), por lo que es necesario disminuir, o en lo posible eliminar estos minerales. Esta disminución pudo ser debida a la disolución parcial de las sales de calcio (desmineralización) debida a la acción de los ácidos, durante el ensilado a pH entre 4-5. Esta fracción una vez soluble es recuperada en la fracción del residuo sólido. Se observó diferencia significativa entre los ensilados y los residuos frescos ($P < 0.001$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre las formulaciones de ácidos.



EC/FA: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Acético; EC/FP: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Propiónico
 CE/FA: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Acético; CE/FP: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Propiónico

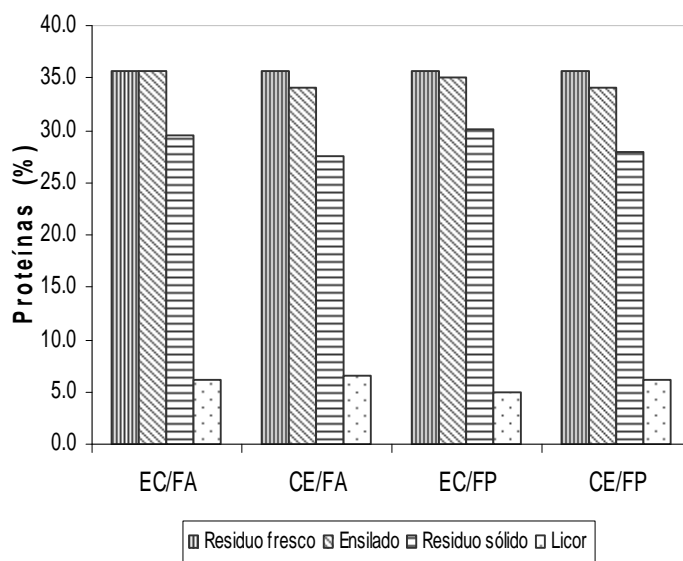
Figura 23. Contenido de cenizas en los ensilados químicos y sus fracciones.

Se observó que el contenido de cenizas en los residuos sólidos del proceso EC fue mayor que en los residuos sólidos del proceso CE cuando se aplicaron ambas formulaciones de ácidos. En el proceso EC se observó que en el residuo sólido se concentró gran parte del material sólido, reduciéndose 23.7% para fórmico-acético (FA) y 13.0% para fórmico propiónico (FP); mientras que en el proceso CE fue de 36.5% para FA y 31.2% para FP, con respecto a la materia prima., es decir, la cantidad de sólidos remanente en el licor dependió de la secuencia de procesos. Los resultados mostraron diferencia significativa ($P < 0.001$) entre ambas secuencias, EC y CE; sin embargo no la hubo en cuanto a las formulaciones de los ácidos empleados (fórmico-acético y fórmico-propiónico) en cada uno de los procesos ($P > 0.01$). En la Tabla 16 referida anteriormente se muestra la concentración de cenizas en los ensilados y sus fracciones.

Proteínas

Los residuos de camarón son una excelente materia prima para la preparación de alimentos proteicos para animales, ya que uno de los principales componentes del exoesqueleto de crustáceos son las proteínas (15-40%), además de la quitina (14-30%), variando las proporciones de estos compuestos con la especie y la alimentación (Shirai y col., 1996). A partir de los residuos de crustáceos pueden ser obtenidos hidrolizados proteicos con un buen balance en la composición de aminoácidos esenciales (principalmente ácidos aspártico y

glutámico) y un perfil de aminoácidos similar a la materia prima original (Shahidi y Synowiecki, 1991). Las proteínas presentes en el exoesqueleto se encuentran formando complejos con el pigmento (carotenoproteína). Durante el ensilado, las proteínas son hidrolizadas dando como resultado una liberación parcial del pigmento, con incremento en la concentración de astaxantina y mejora en la digestibilidad de la misma, al emplearse como dieta de peces (Torrissen y col., 1981). En la Figura 24 se muestra la concentración de proteína de los ensilados químicos y sus fracciones.



EC/FA: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Acético; EC/FP: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Propiónico; CE/FA: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Acético; CE/FP: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Propiónico

Figura 24. Concentración de proteína de los ensilados químicos y sus fracciones.

Al concluirse el tiempo de ensilado se observó una disminución, con respecto al residuo fresco, en el contenido de proteínas en los tratamientos con FA y FP de 2.2% y 3.07%. No hubo diferencias significativas en el contenido de proteínas entre las secuencias de proceso ($P > 0.01$), ni entre las formulaciones ($P > 0.01$).

Durante el ensilado ocurren cambios importantes en las proteínas dependiendo del tiempo de almacenamiento y temperatura del proceso. Se ha reportado que sufren una hidrólisis parcial produciendo péptidos de bajo y alto peso molecular y aminoácidos libres que permanecen solubles y estables. La hidrólisis es realizada por enzimas digestivas propias del material, y la actividad proteolítica es acelerada por la reducción del pH (Zdzislaw y col. 1994). Se ha reportado también que uno de los indicadores físicos del nivel de proteólisis es la cantidad de

líquido exudado del producto, obteniéndose una consistencia semilíquida. Este exudado fue evidente durante el ensilado químico, cambiando el ensilado de un material semi-sólido al principio a uno semilíquido al final del ensilado, debido a la hidrólisis parcial de las proteínas. Éstas, al ser hidrolizadas, pudieran liberar moléculas de agua ligada a los tejidos, siendo un proceso enzimático e independiente a la acción de los ácidos (Bello, 1994). Sin embargo, la acción enzimática es acelerada por las condiciones del medio causadas por la disminución del pH, siendo procesos complementarios. Algunos trabajos sobre ensilado químico de pescado (Toledo y Llanes, 2007) han reportado que la mayor actividad proteolítica se lleva a cabo durante los primeros cuatro días de ensilado, ocurriendo relativamente pocos cambios después de ese tiempo.

Gildberg y Raa (1977) reportaron que en ensilados de pescado almacenados por 220 días, menos del 8% del nitrógeno de los aminoácidos fue liberado como amonio. Sin embargo a temperaturas mayores a 30°C, el triptofano, la metionina y la histidina se descomponen con más rapidez (Machin, 1990). Por lo tanto, debido a que en el presente trabajo el ensilado se llevó a cabo a baja temperatura (4°C) y durante poco tiempo, no se considera que hubo degradación de aminoácidos. La naturaleza e intensidad del tratamiento aplicado determina las modificaciones que se producen en las propiedades funcionales (Torrissen y col., 1981). En general, los tratamientos moderados, sean de naturaleza física o química, originan modificaciones solamente en la conformación de las proteínas, mientras que los tratamientos térmicos intensos o el empleo de compuestos químicos agresivos (por ejemplo, HCl 6M) inciden también sobre la estructura primaria de las proteínas.

Se observó que el contenido de proteínas en los residuos sólidos del proceso EC fue más alta (29.4 g/100g para FA y 30.07g/100g para FP) que en los residuos sólidos obtenidos en el proceso CE (27.6 g/100g para FA y 27.8g/100g para FP), sin encontrar diferencias significativas entre las secuencias de extracción ($P>0.01$). En el proceso EC el contenido de proteínas totales se concentró en el residuo sólido disminuyendo 17.4% en el ensilado FA y 15.6% en FP con respecto a la materia prima, aunque sin diferencias significativas en ambas formulaciones ($P>0.01$). En la primera etapa del proceso CE, previa a la extracción, se observó que las proteínas se concentraron en el residuo sólido, sin diferencias significativas entre las formulaciones ($P>0.01$), con una disminución de proteína total de 22.6% y 21.8% para ensilados FA y FP con relación a la materia prima. Sin embargo, durante la etapa posterior a la extracción, las proteínas pudieron haber sido hidrolizadas produciéndose disminución de la concentración de éstas. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre las formulaciones FA y FP en este proceso ($P>0.01$).

El contenido de proteínas en el licor del proceso CE fue 6.56 g/100g (FA) y 6.20 g/100g (FP) siendo mayor que en el licor del proceso EC con 6.11 g /100g (FA) y 5 g/100g (FP), obteniéndose las menores concentraciones en ambos procesos debido a que la mayoría de las proteínas se concentraron en el residuo sólido y solo una pequeña fracción estuvo presente en el licor; posiblemente algunos aminoácidos o péptidos solubles producto de la hidrólisis de las proteínas se solubilizaron en los disolventes de extracción utilizados. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre las secuencias de extracción ($P>0.01$), ni entre las formulaciones de ácidos ($P>0.01$). En la Tabla 16 referida anteriormente se muestra la concentración de proteínas en los ensilados y sus fracciones.

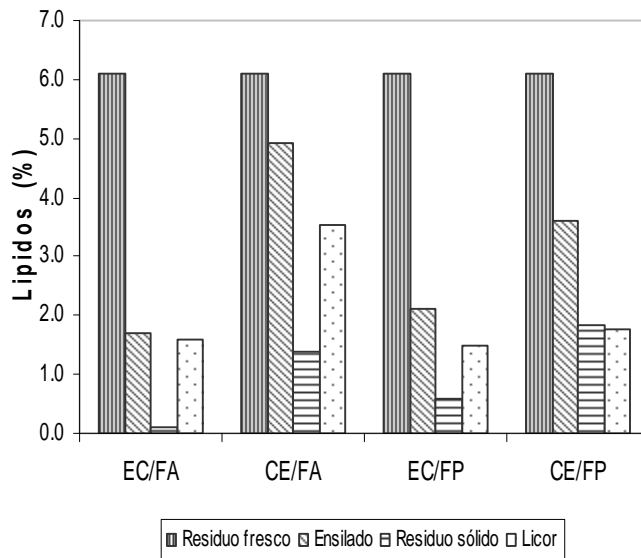
Lípidos

Se observó una notable pérdida en el contenido de lípidos en los ensilados obtenidos con valores de 72% (EC) y 19% (CE) para FA, y 65.5% (EC) y 40.6% (CE) para FP con respecto al residuo fresco, debido principalmente a reacciones de oxidación durante el ensilado. Cabe señalar que durante el proceso de ensilado se añadió antioxidante sintético (BHA/BHT) con el fin de evitar la oxidación de los pigmentos; estos antioxidantes también protegieron, en parte, a los lípidos de la oxidación. Se ha reportado que es recomendable un bajo contenido de lípidos (3-4%) en los residuos empleados para alimentación animal para evitar rancidez que se pudieran presentar durante el ensilado y almacenamiento. La Figura 25 muestra la concentración de lípidos en los ensilados y sus fracciones.

En el proceso EC el contenido de lípidos en el licor disminuyó 73.8% y 75.4 para FA y FP respectivamente, con respecto a la materia prima; mientras que en CE esta pérdida fue de 70.8% y 41.8% para FA y FP, respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre las secuencias de extracción ($P<0.001$). Se observaron diferencias significativas entre las formulaciones en el proceso CE ($P<0.001$), pero no entre las formulaciones en EC ($P>0.01$).

En el residuo sólido se observó una menor concentración de lípidos en el proceso EC (0.10 g/100g para FA y 0.60 g/100g para FP, respectivamente) que en el residuo sólido obtenido en el proceso CE (1.37 g/100g para FA y 1.84 g/100g para FP, respectivamente). Los lípidos se concentraron en la fracción del licor debido a su naturaleza lipofílica, mientras que el contenido proteico y productos de la hidrólisis proteica se concentraron en el residuo sólido. Esto indicó que durante el proceso de ensilado y posterior centrifugación los componentes se distribuyeron de acuerdo a su naturaleza química. Se concluyó que una pequeña fracción de lípidos presente

en el licor licor pudiera estar asociada con los pigmentos carotenoides y formando parte de una lipoproteína (Muriana y col., 1993). Hall y De Silva (1994) observaron una capa lipóide en la superficie del licor, una vez concluido el ensilado de los residuos de camarón, y cantidades pequeñas de lípidos en el residuo sólido. En el presente trabajo también se observó esta capa de material graso. Los ácidos débiles en su forma no disociada, adicionados a los residuos, pudieran también estar distribuidos en esta fase lipídica, reduciendo la concentración de la fase acuosa, hecho ya reportado por Wilson y col. (2000). Guillou y col. (1995) reportaron que esta fracción lipídica pudiera estar formada por ácidos grasos de cadena larga como palmítico, linoleico y linolénico, lo que hace que esta fracción sea de importancia en el valor agregado de los residuos de camarón. En la Tabla 16 referida anteriormente se muestra la concentración de lípidos en los ensilados y sus fracciones.



EC/FA: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Acético; EC/FP: Extracción-Centrifugación/Fórmico-Propiónico
 CE/FA: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Acético; CE/FP: Centrifugación-Extracción/Fórmico-Propiónico

Figura 25. Concentración de lípidos en los ensilados químicos y sus fracciones.

Xantofilas totales

La cuantificación de xantofilas totales representa una estimación de la totalidad de carotenoides oxigenados que pudieran encontrarse en los residuos de camarón. Cabe destacar que, además de astaxantina, pueden ser encontrados otros carotenoides como luteína, cantaxantina, etcétera.

Después de la extracción del pigmento se obtuvieron dos fracciones: el residuo sólido y el licor. En la fracción del licor se encontró el mayor contenido de pigmentos determinados como xantofilas totales, en comparación con el residuo sólido; este licor presentó el color naranja intenso característico.

Se ha observado que el color del cuerpo de cada especie varía de acuerdo al contenido de xantofilas totales. En este caso, el camarón de la especie *L. aztecus* presentar un color café-amarillento. Sin embargo, existen poco estudios relacionados al contenido de carotenoides en crustáceos de aguas tropicales. El contenido de xantofilas totales en residuos frescos de *L. aztecus* fue 26.63 µg/g residuo; esta cifra es similar a la concentración reportada por Torrissen y col. (1989) para varios residuos de crustáceos, la cual oscila entre 0-200 mg/kg. El contenido de xantofilas pudo haber sido afectado por la degradación de carotenoides durante el manejo previo al almacenamiento. El contenido de carotenoides o xantofilas totales en crustáceos se ha encontrado que varía dependiendo de la especie (Lambertsen y Braekkan, 1971). Los resultados del presente estudio indicaron que este contenido de xantofilas totales en *L. aztecus* es bajo (26.63 µg/g residuo) en comparación con otras especies como *L. indicus* y *L. monodon*, según lo reportado por Sachindra y col. (2005b), quienes encontraron que en estas dos especies, así como en *M. dobsonni* el contenido de carotenoides es más alto en el caparazón que en la cabeza, con valores de 86.6, 59.8 y 83.3 µg/g respectivamente. La cabeza de *L. stylifera* tiene una concentración aún mayor de carotenoides, de 153.1 µg/g. Cabe señalar que estas especies de camarón son nativas de la India, y por lo tanto, la ecología en la que se encuentran difiere a la de los mares mexicanos. Algunos estudios han reportado que el contenido de carotenoides totales en camarón gigante (*L. monodon*) de aguas de la región del Indo-Pacífico varía dentro de un amplio intervalo, de 23 a 331µg/g en el exoesqueleto (Okada y col., 1994).

En relación a la secuencia de extracción, el contenido promedio de xantofilas totales en el proceso de extracción EC, no mostró diferencias significativas en ambas formulaciones de ensilados con valores de 29.45 µg astaxantina/g residuo para FA y 28.68 µg/g residuo para FP, observándose en la extracción del pigmento un incremento en el rendimiento de xantofilas totales de aproximadamente 10.58% para FA y 7.69% para FP respectivamente, con respecto al residuo fresco.

Para calcular el contenido de xantofilas totales se utilizó la formula mencionada en la metodología y reportada en el AOAC (2001). Para las mezclas de solventes el factor de dilución fue el siguiente:

125 mL solvente de extracción (100 mL iniciales+25 mL de lavado)/10 g de residuo de camarón (v/p)= 12.5, por lo tanto, la relación disolvente/residuo fue: 125 mL/10 g = 12.5 mL/g. El contenido de xantofilas totales fue expresado como mg astaxantina/kg residuo o $\mu\text{g/g}$. Sin embargo, después de la extracción en la secuencia CE se encontraron los siguientes valores medios de xantofilas totales: 34.79 $\mu\text{g/g}$ para FA y 32.94 $\mu\text{g/g}$ para FP, sin observarse diferencias significativas entre ambas formulaciones ($P>0.01$). La Figura 26 muestra la concentración de xantofilas totales en los ensilados y sus fracciones. En el proceso CE se obtuvo el mayor rendimiento del pigmento (34.79 $\mu\text{g/g}$ para FA y 32.94 $\mu\text{g/g}$ para FP), incrementándose el contenido de xantofilas totales en 30.64% para FA y 23.69% para FP, con relación al residuo fresco. Estos resultados se explican por hecho de que durante el proceso de ensilado y extracción se llevó a cabo el rompimiento de enlaces covalentes de la astaxantina en el complejo caroteno-proteína por la hidrólisis parcial (enzimas digestivas) promovida por las condiciones ácidas del medio, resultando en un incremento del pigmento.

El contenido de xantofilas totales cuantificado después de la extracción es una estimación, pudiendo ser mayor debido a que una pequeña parte del pigmento todavía se encuentra unida a proteínas, las cuales provocan interferencia en el análisis espectrofotométrico. En el Anexo 6 se muestran los contenidos de xantofilas totales en los ensilados químicos y sus fracciones.

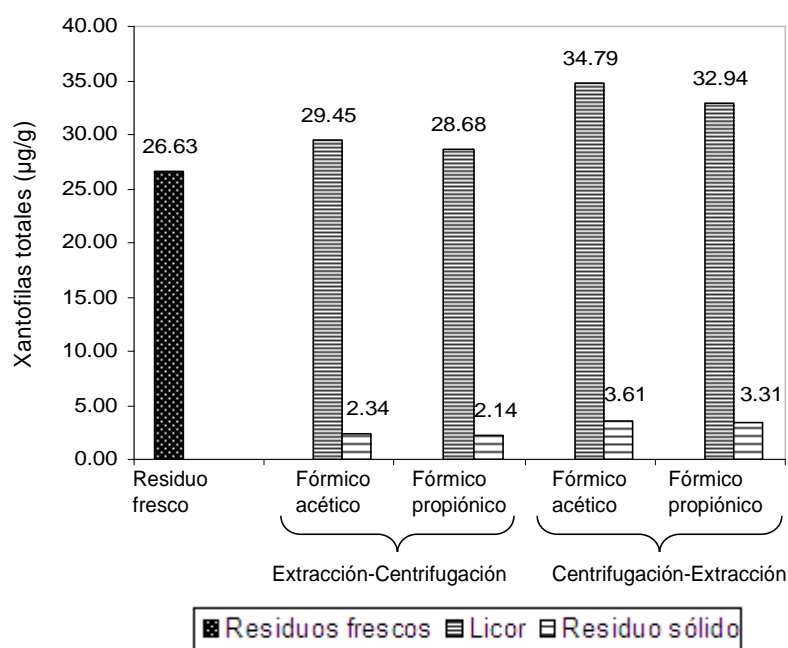


Figura 26. Contenido de xantofilas totales en ensilado químico de *L. aztecus*.

La mezcla de disolventes éter de petróleo:acetona:agua logró la mayor extracción de pigmentos debido a que este sistema tiene una naturaleza no polar, lo que influye directamente en la eficiencia de extracción de astaxantina ya que este pigmento es no polar debido a la larga cadena de unidades isoprenoides, aunque también posee en su estructura dos grupos hidroxilo y dos grupos carbonilo en los anillos de β -ionona. Según Torrissen y col. (1989) la astaxantina se encuentra monoesterificada con algún ácido graso, lo cual indica que solo tiene disponible un grupo hidroxilo libre, además que los grupos carbonilo pueden ser sitios de unión con proteínas o con quitina, por medio de enlaces imino. Lo anterior indica que la poca polaridad que pudiera tener la astaxantina se reduce aún más por su unión con otras biomoléculas.

En comparación con otras especies estudiadas, la cantidad de xantofilas totales obtenidas fueron menores a las cantidades reportadas por Sachindra y col. (2007) quienes encontraron concentraciones de 43.09 $\mu\text{g/g}$ en residuos ensilados de *L. indicus* usando 15% de ácido propiónico para promover un ambiente reductor del medio, y como solvente de extracción una mezcla de hexano:isopropanol (60:40 v/v). Sin embargo, Torrissen y col. (1981) reportaron que en el ensilado de residuos de *P. borealis* utilizando una mezcla de 4.8% de ácido sulfúrico al 50% y 1.2% de ácido propiónico, se obtiene un incremento significativo en la concentración de astaxantina de 49.7 a 73.5 mg/kg después de 2 días de ensilado, permaneciendo constante esta cantidad después de 21 días de almacenamiento. Estos autores atribuyeron este incremento a que durante el ensilado ocurre la solubilización de las estructuras vesiculares formadas por calcio en el caparazón del crustáceo, las cuales contienen cantidades importantes de astaxantina que son liberadas durante la solubilización y que se hace disponible para su extracción (Torrissen y col., 1981).

Sin embargo, es difícil establecer una comparación en el rendimiento en la extracción de los pigmentos de otros trabajos, ya que las condiciones de esos estudios fueron diferentes y se emplearon distintos tipos de residuos y especies, además de aplicar otros sistemas de solventes de extracción. Asimismo, la captura de camarón es estacional y los residuos producidos son altamente perecederos, por consiguiente en la temporada de mayores capturas la producción de estos residuos es también alta, por lo tanto es necesario preservarlos para la recuperación de compuestos de alto valor comercial. Sin embargo durante el ensilado químico, con el sistema de solventes empleado en este trabajo y con el proceso CE, se lograron rendimientos para xantofilas totales de 34.79 $\mu\text{g/g}$ residuo para FA y 32.94 $\mu\text{g/g}$ residuo para FP, estabilizando el pigmento e incrementando la liberación de astaxantina. En el Anexo 6 se muestran los contenidos de xantofilas totales en los ensilados químicos y sus fracciones.

7.1.4. Ensilado bacteriano de los residuos de camarón (*L. aztecus*)

7.1.4.1. Características del cultivo iniciador

Las principales características de las bacterias lácticas son la tolerancia al pH ácido ($\text{pH} \leq 5$) (Cabeza-Herrera, 2006), la ausencia de formación de esporas, y la utilización de carbohidratos de forma fermentativa. Se subdividen en homofermentativas o heterofermentativas, dependiendo de la ruta metabólica de utilización de los azúcares y de sus productos finales. Las cepas lácticas heterofermentativas degradan hexosas produciendo 50% de ácido láctico, además de CO_2 y una mezcla de productos finales que incluyen ácido acético, acetaldehído y etanol. Las homofermentativas producen casi totalmente ácido láctico a partir de hexosas (Guerrero y col., 2006).

La fermentación láctica se lleva a cabo en anaerobiosis o en condiciones microaerofilas, y se manifiesta en la transformación de los azúcares, presentes en el material o adicionados, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Muchos carbohidratos o derivados son sustratos fermentables; la lista incluye polisacáridos como el almidón, celulosa, quitina; disacáridos como lactosa, sacarosa y malta; hexosas como glucosa, fructosa y galactosa; pentosas como arabinosas y xilosa, etcétera. Sin embargo, la capacidad amortiguadora y el contenido de carbohidratos fermentables del sustrato son factores que determinan la magnitud de la fermentación de las bacterias lácticas.

El inóculo láctico utilizado en esta tesis fue *Pediococcus pentosaceus*. Es una cepa aislada de residuos de camarón tropical por la Dra. Zainoha Zakaria, de la Universidad de Malasia. La cepa liofilizada se reactivó en caldo MRS e identificó por tinción de Gram. En observación al microscopio se apreciaron las siguientes características:

- forma de cocos (tetradas)
- coloración violeta (Gram+)
- no se observó la presencia de otros microorganismos, por lo que se concluyó que se trataba de un cultivo puro, libre de microorganismos contaminantes.
- se ha reportado a *P. pentosaceus* como una cepa homofermentativa (Frazier, 1993; Cabeza-Herrera, 2006).

Una vez reactivada, y observándose un crecimiento abundante en caldo MRS, la cepa se inoculó en caldo MRS e incubó a 30°C durante 24 horas, se midió periódicamente la absorbancia del medio a 535 nm hasta obtener un valor $\text{DO} = 2$.

El número de células viables en este inóculo fue de 1×10^9 UFC/mL, según se obtuvo del cálculo realizado por el método de dilución y conteo en placa (Pérez y Aquiahuatl, 2004).

La cepa fue altamente acidificante, según se observó de pruebas preliminares de fermentación de residuos de camarón, siguiendo el método desarrollado por Armenta (2002). Se observó que el pH del ensilado inoculado con esta cepa disminuyó de 8.32 a 4.84 en 48 h, continuando en forma gradual durante 5 días de almacenamiento hasta alcanzar pH 4, manteniéndose estable posteriormente. Se recomienda que el ensilado alcance y mantenga aproximadamente pH 4.0, ya que bajo estas condiciones se disminuye el crecimiento y actividad de microorganismos patógenos y de descomposición. En la Figura 27 se muestra el pH obtenido de 0 a 4 días (promedio de cinco fermentaciones). Es importante que la cantidad de azúcares metabolizables sea la suficiente para producir suficiente ácido láctico y reducir el pH a valores cercanos de 4-4.5 (Llanes-Iglesias, 2007).

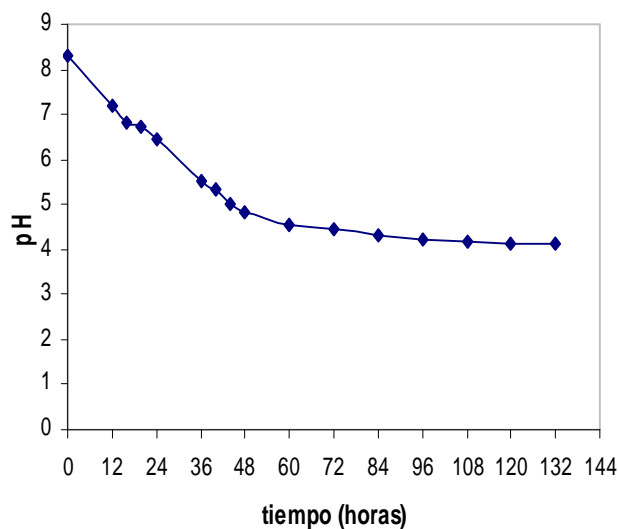


Figura 27. pH en residuos de camarón inoculados con por *P. pentosaceus*.

7.1.4.2. Fermentación

El fundamento de la conservación de residuos de camarón por medio de un ensilado bacteriano es similar al del ensilado químico, se basa en el aumento de acidez debido a la producción de ácido láctico por el metabolismo de las bacterias lácticas. En esta tesis se adicionó como fuente de azúcar la dextrosa anhidra (10%). Las bacterias lácticas, al producir ácido láctico, crean un ambiente favorable a la actividad enzimática.

El efecto inhibitorio del ácido láctico sobre los microorganismos patógenos y de descomposición se ha atribuido a la formación de ácidos orgánicos no disociados producidos por la fermentación (Sorella y Speck, 1970). La temperatura óptima para la fermentación láctica oscila entre 35-40°C, siendo la temperatura normal en lugares donde generalmente se encuentran las plantas procesadoras de camarón y, por ende, la producción de residuos.

El ensilado inoculado con *Pediococcus pentosaceus*, al mismo tiempo que disminuyó el pH hasta 4.84 en 48 h, modificó su consistencia a semilíquida y con agradable olor suave a ácido, si bien otros autores (Bhaskar y col., 2007) reportaron pH=4.3 como pH final en *Penaeus monodon* utilizando un inóculo de *Pediococcus acidolactici* CFR2182. La diferencia en el pH final pudo ser debido a que el pH inicial de la materia prima utilizada en esta tesis (*L. aztecus*) era elevado (pH 8.6) en comparación con el de los residuos empleados por Armenta (2002) quien utilizó residuos de *Litopenaeus* sp con pH inicial 7.7, obteniendo una reducción a pH 4.15. Sachindra y col (2007) reportaron la fermentación en residuos de *Penaeus indicus*, obteniendo reducción de pH de 7.95 a 4.77 en tres días y permaneciendo constante en este valor durante 75 días. Cabe señalar que, dependiendo de las condiciones iniciales del ensilado en cuanto a la calidad de los residuos, ausencia de signos de descomposición y manejo sanitario, es la actividad acidificante de las bacterias lácticas y, por tanto, la reducción del pH. Por ello, es de suma importancia que los residuos tengan las mejores condiciones de higiene durante su obtención y manipulación. De igual forma, debe de ser considerado el efecto amortiguador que pudieran ocasionar la presencia de algunos aminoácidos libres producidos durante la hidrólisis de las proteínas, y la solubilización de carbonatos de calcio durante el ensilado, reacciones que causan un efecto amortiguador sobre el pH (Sachindra y col., 2007).

La fermentación que se llevó a cabo durante el ensilado bacteriano se dividió en dos fases complementarias: una hidrólisis promovida por las enzimas proteolíticas presentes en los residuos de camarón y reportadas por otros autores (Armenta, 2002; Bhaskar y col., 2007), y una acidificación y reducción del pH dada por la acción de las bacterias lácticas (Bello, 1994). El pH es el resultado la actividad de los microorganismos acidolácticos, y por tanto la estabilidad y la calidad del ensilado; a la vez, la hidrólisis, que promueve en gran medida la licuefacción del sustrato, puede medirse a través del nitrógeno no proteico presente, del líquido producido, o de la consistencia. Estas determinaciones muestran un aumento de la hidrólisis proteica progresiva y rápida al inicio del proceso del ensilado, que posteriormente se hace más lenta. Como consecuencia, se promueven condiciones reductoras y suficientemente ácidas que evitan el desarrollo de microorganismos de descomposición y degradación de los pigmentos, produciéndose la hidrólisis parcial de las proteínas.

La composición aproximada del ensilado bacteriano se muestra en la Tabla 17, ésta difiere de la del ensilado químico, debido a la adición de glucosa.

Tabla 17. Composición de los ensilados bacterianos y sus fracciones.

Secuencia	Fracción	Análisis fisicoquímicos			
		Humedad*	Cenizas	Proteínas (g/100g base seca)	Lípidos
Extracción- Centrifugación	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
	residuo ensilado	73.50	27.25	33.17	1.88
	licor	na	na	7.38	1.20
	residuo sólido	69.70	26.52	25.79	0.68
Centrifugación- Extracción	residuo fresco	76.83	39.42	35.65	6.10
	residuo ensilado	72.70	27.63	33.61	6.03
	licor	na	na	6.24	3.68
	residuo sólido	67.30	26.83	27.37	2.35

* % base húmeda

na= no analizado

7.1.4.3. Efecto de la secuencia de procesos en la extracción de pigmentos

De manera similar que en ensilado químico, los análisis químicos que se describen a continuación fueron realizados en los residuos frescos, residuos ensilados, así como en las fracciones obtenidas: residuo sólido y licor (conteniendo los pigmentos carotenoides). De igual forma se ensayaron las dos secuencias de extracción del pigmento: Centrifugación-extracción (CE) y Extracción-Centrifugación (EC).

Humedad

Después de 48 h de fermentación el contenido de humedad disminuyó en ambos ensilados con respecto al residuo fresco, presentando valores promedio para EC y CE de 73.5 y 72.7%, respectivamente (Figura 28). Aunque la humedad en los ensilados disminuyó en solo 4.3 y 5.3% en relación al residuo fresco, se encontraron diferencias significativas entre estas fracciones ($P < 0.001$). Esta disminución pudo ser debido a que durante el ensilado bacteriano se adicionaron carbohidratos (dextrosa), los cuales pueden ligar algunas moléculas de agua, disminuyendo el contenido de agua en los residuos.

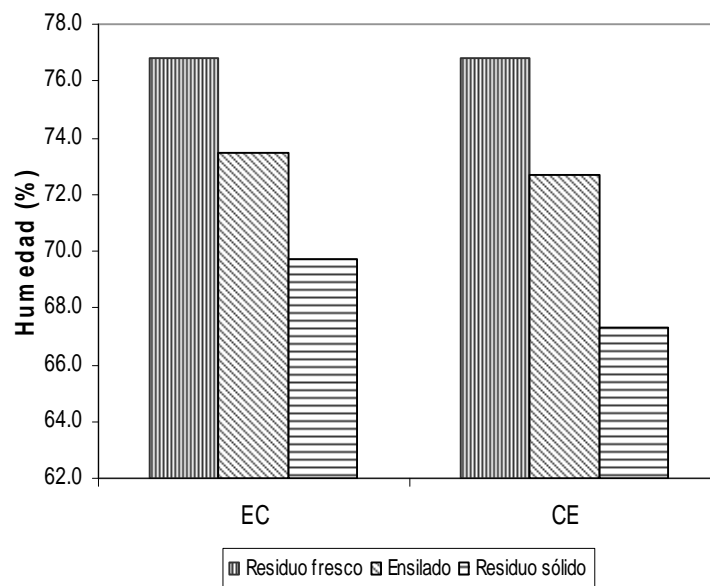


Figura 28. Contenido de humedad en las fracciones del ensilado bacteriano.

Sin embargo, a pesar de que el contenido de humedad disminuyó, posteriormente se observó que el residuo sólido tuvo un mayor contenido de humedad en el proceso EC (69.7%), mientras que en CE fue menor (67.3%), aunque sin presentar diferencias significativas entre estos valores ($P > 0.01$). Este comportamiento fue contrario al observado en el ensilado químico, por lo que es posible concluir que ambos tipos de ensilados proporcionan características diferentes a los materiales ensilados y sus fracciones, en cuanto al contenido de humedad.

Cenizas

Los residuos ensilados mostraron una disminución del 30% en el contenido de cenizas, en relación al residuo fresco, resultando una diferencia significativa (Figura 29). Sin embargo, se observó que el contenido de cenizas en ambos ensilados (EC y CE) fue de valores cercanos, 27.25% y 27.63%, respectivamente. Cabe señalar que esta disminución de cenizas en los ensilados bacterianos fue mayor que en los ensilados químicos, debido posiblemente al efecto de los diferentes ácidos aplicados. La disminución en cenizas pudo ser debida a que, durante el ensilado bacteriano las sales de calcio presentes en los residuos de camarón fueron parcialmente solubilizadas debido a la acción del ácido láctico y pH bajo (4.5), el cual se mantiene durante el ensilado. Esta solubilización de cenizas durante el ensilado es recomendable ya que de esta manera se puede aumentar la digestibilidad de los ensilados, si éstos son destinados a dietas de peces. El contenido de cenizas en el residuo sólido en ambas

secuencias de proceso mostró una disminución de 32% con respecto a la materia prima, encontrando diferencia significativa solo en el proceso CE ($P < 0.001$) pero no en EC ($P > 0.01$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la secuencia de extracción. Las cenizas se concentraron principalmente en el residuo sólido en ambos procesos. Este comportamiento fue similar al observado en el ensilado químico, aunque en el bacteriano se observó mayor solubilización de cenizas y concentración en el residuo sólido. En la Tabla 17 referida anteriormente se muestra el contenido de cenizas en los ensilados bacterianos y sus fracciones.

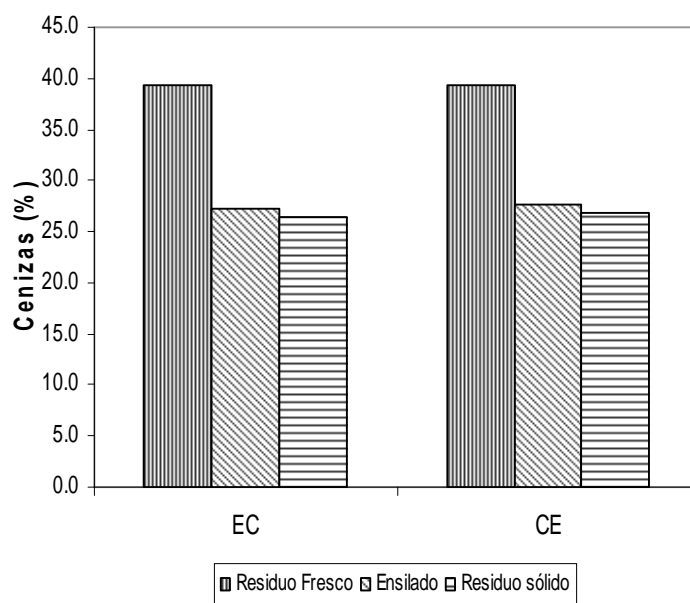


Figura 29. Contenido de cenizas en las fracciones del ensilado bacteriano.

Proteínas

El contenido de proteínas en los ensilados disminuyó en 7% con respecto al residuo fresco, sin diferencias significativas entre estas fracciones (Figura 30). En cuanto a la secuencia de extracción, se observó que el contenido de proteínas en el residuo sólido disminuyó en ambos procesos, 27.6 y 23.2% en EC y CE, respectivamente, con respecto a la materia prima, encontrando diferencia significativa entre ambos procesos ($P < 0.001$). Las proteínas se concentraron principalmente en el residuo sólido en ambos procesos, una pequeña parte de los compuestos nitrogenados se solubilizó en el licor. Cabe señalar que este comportamiento fue semejante al observado en el ensilado químico. El contenido de proteínas fue menor en el licor del proceso CE con valores promedio de 6.24 g/100 g, mientras que en EC fue mayor con valores promedio de 7.38 g/100 g, encontrando diferencias significativas entre ambos.

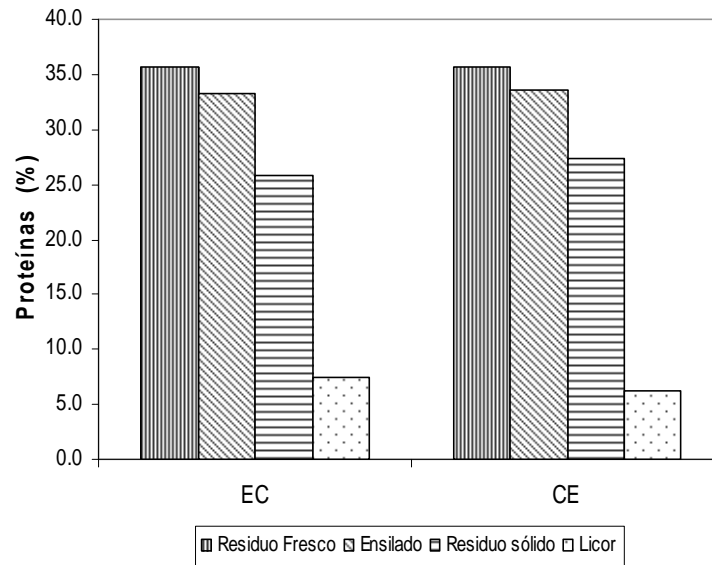


Figura 30. Contenido de proteínas en las fracciones del ensilado bacteriano.

Los residuos de camarón tienen un alto contenido de proteína de buen valor y calidad nutricional. La fermentación láctica de residuos de camarón permite la predigestión y separación de proteínas y quitina para la obtención de hidrolizados que puedan sustituir a las harinas de pescado (Placencia-Jatomea y col., 2002). Durante el proceso de fermentación ocurren simultáneamente dos procesos complementarios: desmineralización debido a la producción de ácido láctico por las bacterias lácticas y desproteínización o hidrólisis de proteínas por parte de enzimas endógenas de los residuos, produciendo una alta concentración de péptidos y aminoácidos solubles (Fagbenro, 1997). Aunque ambos fenómenos parecieran estar separados o ser independientes, presentan una relación estrecha. A medida que la hidrólisis proteica progresa, se producen compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminos, amonio y otros compuestos de bajo peso molecular, los cuales alteran la capacidad amortiguadora del producto, incrementándose los valores de pH, lo cual conduce a que las bacterias ácido-lácticas comiencen a producir ácido y reducir nuevamente el pH (Lindgren y Pleaje, 1983). Es importante considerar otro aspecto, que es posible la recuperación de algunos componentes de alto valor agregado en los crustáceos, como las enzimas. El camarón es una buena fuente de quitinasas, fosfatasa alcalina y hialuronidasa (Olsen y col., 1990). En la Tabla 17 referida anteriormente se muestra el contenido de proteínas en los ensilados bacterianos y sus fracciones.

Lípidos

Después de la fermentación se observó una reducción en el contenido de lípidos en los ensilados, sin embargo el ensilado EC presentó una disminución significativa de 69.1% ($P < 0.001$) con 1.88 g/100g valor promedio, mientras que el ensilado CE presentó una disminución menor del 1.15% con 6.03 g/100g valor promedio con respecto al residuo fresco (Figura 31). Esto pudo ser debido a reacciones de oxidación en uno de los ensilados, aunque no se dilucidó el mecanismo. Los altos niveles de lípidos insaturados en los ensilados los hacen susceptibles a oxidación y consecuentemente la formación de productos tóxicos, lo cual puede reducir su uso potencial en procesos de alimentación animal. Sin embargo, la oxidación puede ser controlada por la adición de agentes antioxidantes como el etoxiquin, butil-hidroxitolueno (BHT) y butil-hidroxianisol (BHA).

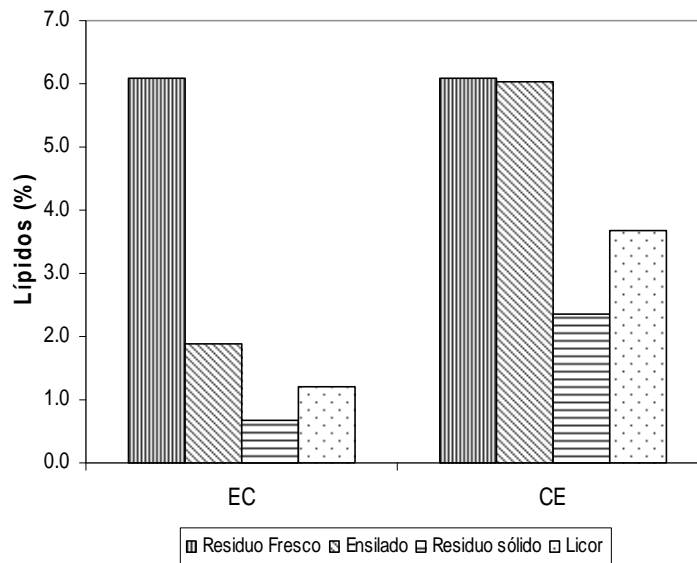


Figura 31. Contenido de lípidos en las fracciones del ensilado bacteriano.

En el residuo sólido se observó menor concentración de lípidos en comparación con el licor, obteniendo mayor concentración en el proceso CE (2.35 g/100 g) en comparación con el proceso EC (0.68 g/100 g). En el proceso de EC se observó una pérdida significativa de lípidos del 88.8% ($P < 0.001$) en comparación con el proceso de CE con pérdida significativa del 61.5%; esto se debió a que se eliminaron componentes como sales minerales, aminoácidos, quitina, entre otros, con la centrifugación que llevó a cabo antes de la extracción. Estos componentes dificultan la extracción de la fracción lipídica. Es por esto que posiblemente en el proceso CE se obtuvo una cantidad mayor de lípidos. Por otro lado, se observó que después de la extracción el

mayor contenido de lípidos se encontró en la fracción del licor, debido a su alta afinidad con los disolventes utilizados. La mayor concentración de lípidos se encontró en el proceso CE (3.68 g/100 g) en comparación con el proceso EC (1.20 g/100 g). Algunos ácidos grasos que se localizaron en el residuo sólido pudieran estar esterificados con algún residuo de proteína o a la quitina, por lo que éstos no fueron arrastrados durante la extracción.

Los lípidos marinos son obtenidos principalmente a partir del hígado de peces, o como subproductos en la elaboración de harinas. Estos lípidos generalmente contienen una gran proporción de ácidos grasos de cadena larga, entre otros los omega-3. Tradicionalmente, los lípidos de productos marinos han sido empleados en las preparaciones de aceites para uso industrial o farmacéutico, algunos son usados como componentes de bajo costo en la producción de margarinas. El uso de lípidos marinos como componentes en las dietas para la acuicultura también se ha contemplado industrialmente (Mateos y col., 1996). En el caso del camarón, una parte de los ácidos grasos presentes están unidos a la red de quitina (qutinolipoproteínas), aunque la mayoría de estos ácidos grasos están formando parte del sistema muscular (Guillow, 1995); es por esto que la concentración de lípidos es baja en los residuos de camarón. En la Tabla 17 referida anteriormente se muestra el contenido de lípidos en los ensilados bacterianos y sus fracciones.

Xantofilas totales

En el licor se encontró el mayor contenido de pigmentos determinados como xantofilas totales, en comparación con el residuo sólido, presentando un color naranja intenso característico. Al igual que en el ensilado químico, el contenido promedio de xantofilas totales en residuos frescos de *L. aztecus*, utilizando el sistema de disolventes éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) fue de 26.63 µg astaxantina/g residuo. En la Figura 32, los resultados mostraron que en la secuencia de extracción, el contenido promedio de xantofilas totales fue menor en el proceso EC, con valores de 27.98 µg astaxantina/g residuo, mientras que en el proceso CE fue 31.82 µg astaxantina/g residuo, encontrando diferencias significativas entre las secuencias de proceso ($P < 0.001$); siendo estos valores menores a los obtenidos en el ensilado químico en el proceso de extracción CE: 34.79 µg/g para FA y 32.94 µg/g para FP.

En el ensilado bacteriano se encontró un incremento en el rendimiento de xantofilas totales de 5.06% en proceso EC y 19.48% en proceso CE, con respecto al residuo fresco, durante 48 h de fermentación, observándose que hubo una menor eficiencia en la extracción del pigmento en comparación al ensilado químico (proceso EC: incremento de xantofilas totales del 10.58% para

FA y 7.69% para FP; proceso CE: incremento del 30.64% para FA y 23.69% para FP, con relación al residuo fresco). Sin embargo, cabe señalar que de manera similar al ensilado químico, el mayor contenido de xantofilas totales fue obtenido por el proceso CE.

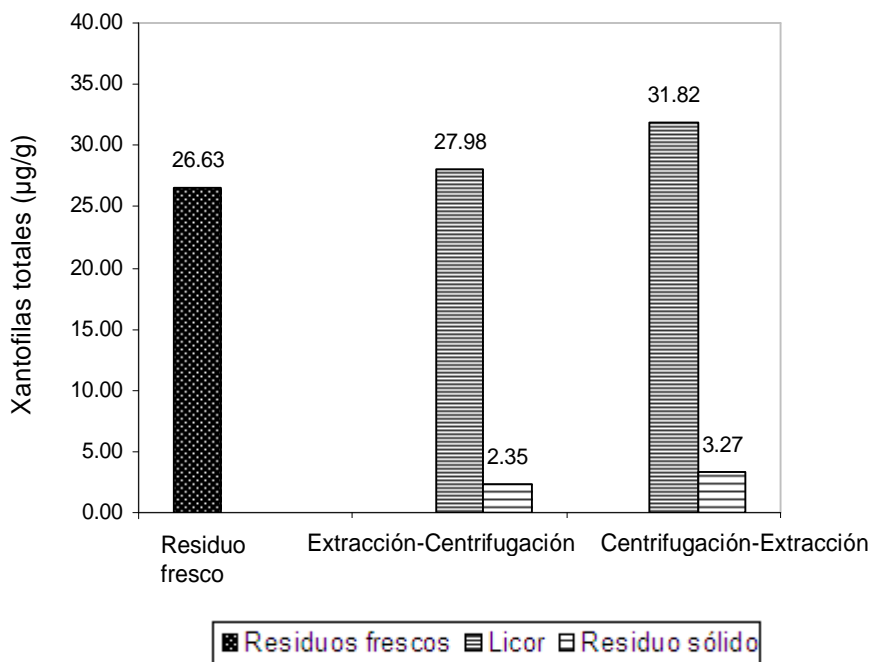


Figura 32. Contenido de xantofilas totales en ensilado bacteriano.

El incremento en el rendimiento en el ensilado bacteriano pudiera ser atribuido a dos posibles causas: durante el proceso de ensilado se lleva a cabo una hidrólisis de las proteínas unidas a la astaxantina (complejo caroteno-proteína) lo cual aumenta la liberación del pigmento. Por otra parte, se ha reportado que la astaxantina presenta mayor estabilidad en ensilados ácidos de residuos de camarón provenientes de fermentación, debido a las condiciones reductoras obtenidas por la acidificación del medio, promoviendo el corrimiento de electrones a las dobles ligaduras conjugadas (Guerrero y col., 1996; Chen y Meyers, 1983). La desproteinización de los residuos se lleva a cabo de manera simultánea a la estabilización del pigmento, mejorando la extracción del mismo (Guillou y col, 1995). En el Anexo 6 se muestran los contenidos de xantofilas totales en los ensilados bacterianos y sus fracciones.

7.1.5. Identificación y cuantificación de astaxantina y astaceno

Durante el proceso de ensilado químico o bacteriano, los pigmentos presentes pueden sufrir cambios, principalmente oxidación. Por ello, se realizó un análisis comparativo de los pigmentos

de interés en esta tesis, astaxantina y su derivado oxidado (astaceno) obtenidos de ambos ensilados, y fueron analizados por HPLC para la identificación y cuantificación de astaxantina y sus ésteres y verificar el grado de oxidación de los mismos.

7.1.5.1. Análisis de estándares de carotenoides

La Tabla 18 muestra los tiempos de retención y la longitud de onda de máxima absorbancia de los estándares de carotenoides estudiados. Los tiempos de retención obtenidos fueron semejantes a los reportados por Armenta (2002). Los tiempos de retención del estándar de astaxantina (anexo 5) y astaceno fueron de 1.801 y 2.382 min, respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los estándares de carotenoides estudiados presentaron tiempos de retención muy parecidos entre sí, en un intervalo entre 1.801 y 2.242. Esto fue debido principalmente a que presentan una estructura química similar, con excepción del β -caroteno.

Tabla 18. Tiempos de retención de estándares de carotenoides (Hoffman LaRoche^{MR}).

Estándar	Tiempo de retención (min)		λ máxima absorción (nm)
	Reportado*	Obtenido**	
Astaceno	2.230	2.382	494
Astaxantina	1.850	1.801	474
Carophyll pink	2.068	1.801	474
β -caroteno	s/ref	8.927	454
Cantaxantina	2.945	s/ref	472
Capsantina	2.037	2.042	470
Luteína	2.385	2.242	454

* Armenta (2002)

**Estándares disueltos en acetona

7.1.5.2. Astaxantina en el ensilado químico

En el ensilado químico, el cromatograma de astaxantina obtenido en los ensilados tratados con las formulaciones de ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico en el proceso EC presentaron tiempos de retención muy semejantes, 1.805 y 1.807 min, respectivamente, para las mezclas de ácidos, que están cercanos al tiempo de retención del estándar de astaxantina (1.801 min),

según se reporta en el inciso 7.1.5.1 de esta tesis. En el ensilado fórmico-acético también se observó un pequeño pico en 2.487 minutos que correspondió al estándar de astaceno, mientras que en el ensilado fórmico-propiónico este pico no estuvo presente, por lo que estos resultados mostraron que el tratamiento con la mezcla de ácidos fórmico-propiónico promueven menor oxidación del pigmento.

En los cromatogramas del licor obtenido en ensilados tratados con ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico en el proceso CE se observó un pico con tiempos de retención semejantes, de 1.841 y 1.850 min respectivamente a las mezclas de ácidos, y correspondientes a astaxantina, pero no se observó en ningún caso algún pico correspondiente a astaceno; por consiguiente, el proceso CE no produce oxidación de astaxantina en ninguna de las dos mezclas de ácidos.

En los cromatogramas de los ensilados tratados con mezclas de ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico, en las dos secuencias de proceso (CE y EC) no se observaron picos al tiempo de retención correspondientes a β -caroteno (8.927 min) o luteína (2.242 min), estos carotenoides no se han encontrado en cantidades considerables en residuos de camarón (Nizu y col., 2005). Sin embargo, en los cromatogramas del ensilado químico del proceso EC se observaron dos picos a 3.242 y 5.682 min, mientras que en el proceso CE fueron detectados a 3.330 y 6.101 min (Figura 33). De acuerdo con lo reportado por algunos autores estos picos pudieran corresponder a cantaxantina y 3-hidroxi-4-oxo- β -caroteno, respectivamente, en los dos procesos (Armenta, 2002).

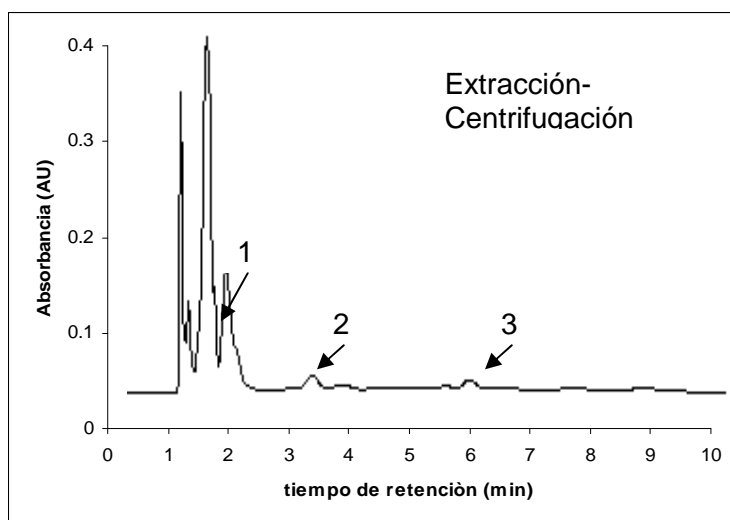
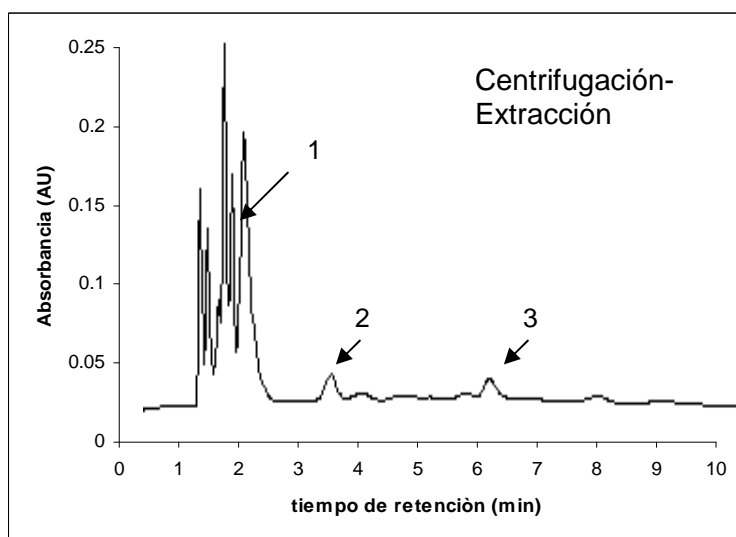


Figura 33. Cromatogramas del ensilado químico obtenido por los procesos de extracción-centrifugación y centrifugación-extracción: astaxantina (1), cantaxantina (2), 3-hidroxi-4-oxo- β -caroteno (3).

7.1.5.3. Astaxantina en el ensilado bacteriano

En el ensilado bacteriano, los cromatogramas obtenidos en el proceso EC presentaron un pico con tiempo de retención a 1.838 min, correspondiente a astaxantina (Figura 34); mientras que en el proceso CE el cromatograma mostró el pico de la astaxantina a 1.895 min (Figura 35). No se observó ninguna señal correspondiente al astaceno, por lo que estos resultados mostraron que no hubo degradación del pigmento en ninguno de las dos secuencias de procesos.

De igual forma, no se observó ninguna señal correspondiente al β -caroteno. Sin embargo, en el proceso EC del ensilado bacteriano se detectaron dos picos a 3.397 y 6.238 min, mientras que en el proceso CE fueron observados picos a 3.472 y 6.338 min; de acuerdo a Armenta (2002) corresponderían a cantaxantina y 3-hidroxi-4-oxo- β -caroteno, respectivamente.

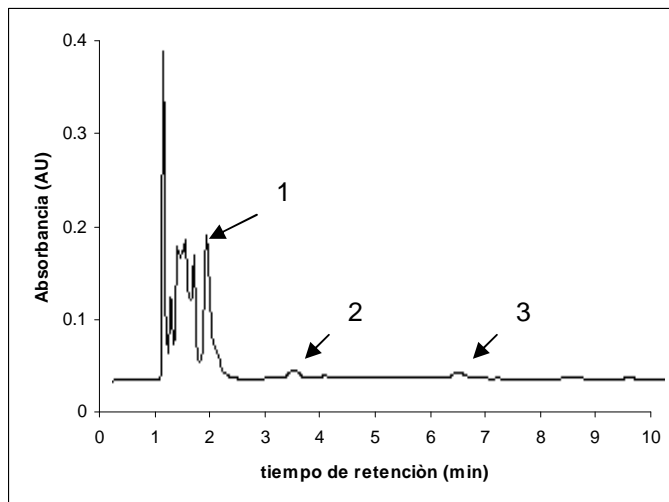


Figura 34. Cromatograma del ensilado bacteriano producido por el proceso de extracción-centrifugación: astaxantina (1), cantaxantina (2), 3-hidroxi-4-oxo- β -caroteno (3).

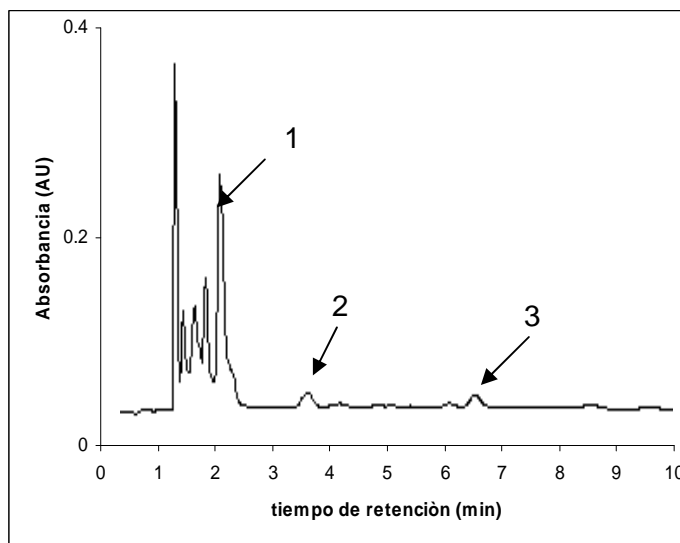


Figura 35. Cromatograma del esilado bacteriano bajo el proceso de centrifugación-extracción: astaxantina (1), cantaxantina (2), 3-hidroxi-4-oxo- β -caroteno (3).

7.1.5.4. Distribución de astaxantina y astaceno en las fracciones de los ensilados

La astaxantina y sus ésteres ha sido identificada como el carotenoide mayoritario en el exoesqueleto de crustáceos (Meyers y Bligh, 1981). En los residuos de crustáceos, la astaxantina se puede encontrar libre o esterificada con ácidos grasos formando mono y diésteres. Cuando reacciona el radical hidroxilo del anillo terminal de la molécula de astaxantina con un ácido graso forma un éster lo cual hace que este extremo de la molécula sea más hidrofóbico, esto favorece que la astaxantina esterificada se solubilice en la fracción del licor.

En la cuantificación de astaxantina por HPLC, el proceso EC mostró menores valores (20%) con una concentración de 2.193×10^{-2} y 1.989×10^{-2} mg/mL licor en los ensilados tratados con mezclas de ácido fórmico-acético y fórmico propiónico, respectivamente, con relación al proceso CE (4.010×10^{-2} y 3.563×10^{-2} mg/mL licor, respectivamente). Los resultados son mostrados en la Figura 36. La concentración de astaceno mostró diferencias en cuanto al orden de procesamiento; solamente se observó la presencia de astaceno en el proceso EC con ácidos fórmico-acético (3.734×10^{-5} mg/ mL licor) mientras que en CE solo se detectó astaceno con ácidos fórmico-propiónico (2.833×10^{-5} mg/mL licor). Estos valores indicaron que hubo menor oxidación del pigmento en el proceso CE.

En el ensilado bacteriano se observó una mayor concentración de astaxantina en el proceso de CE (2.735×10^{-2} mg/mL licor) en comparación con EC (1.699×10^{-2} mg/mL licor) (Figura 37). No se observó astaceno en el proceso CE, mientras que en el de EC la concentración de este derivado oxidado de la astaxantina fue 4.05×10^{-5} mg astaceno/mL licor). Estos resultados indicaron que hubo degradación del pigmento bajo el proceso EC.

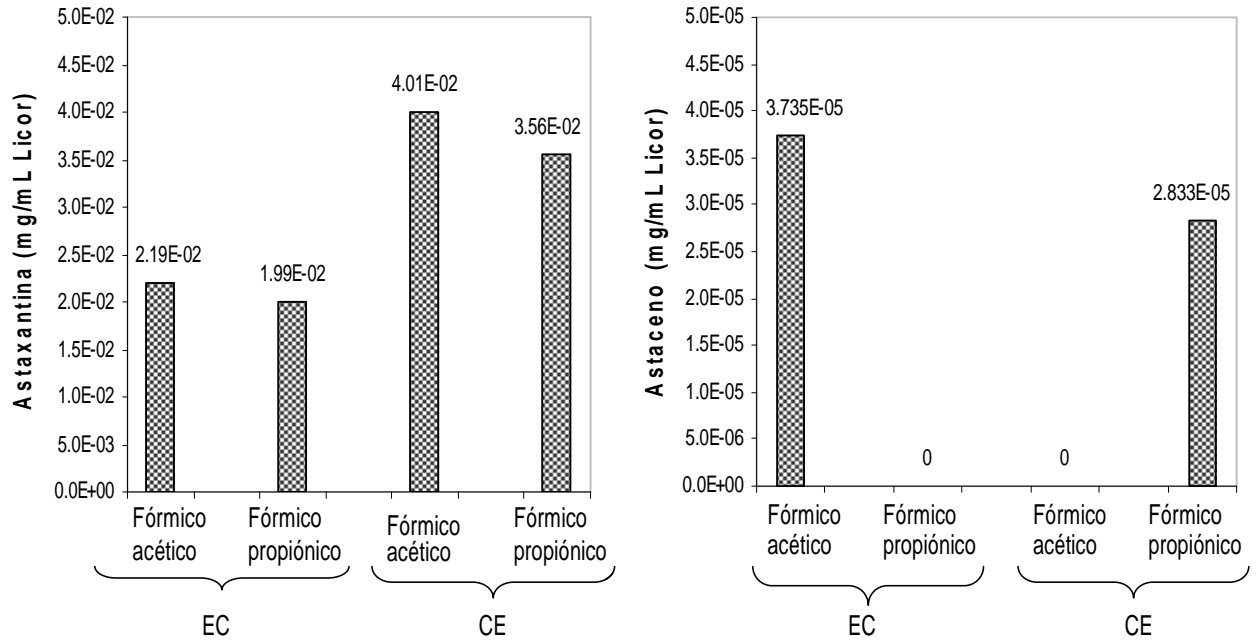


Figura 36. Concentración de astaxantina y astaceno en licores obtenidos del ensilado químico.

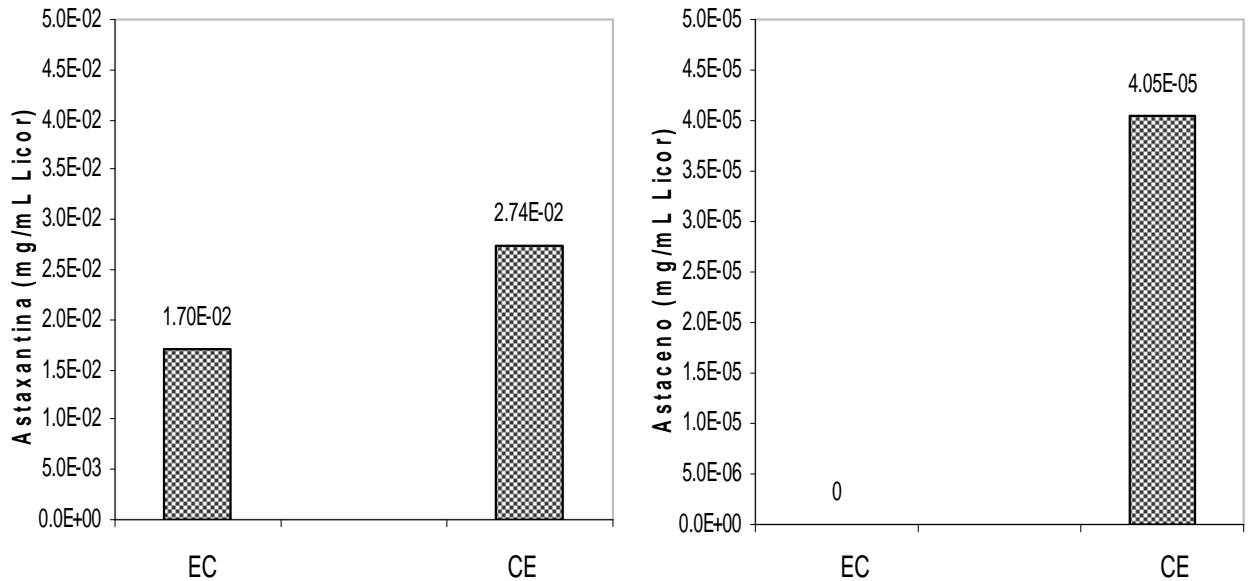


Figura 37. Concentración de astaxantina y astaceno en licores obtenidos del ensilado bacteriano

7.2. Etapa II. Estudios en desechos de camarón del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, camarón blanco)

7.2.1. Materia prima

Con el propósito de comprobar la eficiencia del proceso de ensilado estudiado anteriormente (químico y bacteriano), se aplicó este proceso en residuos de camarón procedentes de otra especie (*Litopenaeus vannamei*) siguiendo la misma metodología utilizada en la etapa descrita en el inciso 7.1.

Los análisis químicos de los residuos de camarón frescos utilizados en esta etapa se reportan en la Tabla 19. Los valores obtenidos fueron menores a los reportados por Babu y col. (2008); sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente la composición de los residuos de camarón puede presentar variaciones debido a diversos factores tales como la especie y tecnología del procesado, entre otros.

Tabla 19. Composición proximal obtenida en los residuos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Componente	Datos reportados*		Datos obtenidos	
	<i>L. monodon</i> silvestre	<i>L. indicus</i>	<i>L. vannamei</i>	
	% base húmeda	% base húmeda	% base húmeda	% base seca
Humedad	67.4 ±4.6	73.6 ±1.0	78.6 ± 0.67	--
Cenizas	9.1 ±0.8	7.1± 0.3	4.1 ± 0.11	19.15 ± 0.56
Proteína	11.3 ±1.1	12.3 ±1.0	9.62 ± 0.82	44.95 ± 0.75
Lípidos	1.2 ±0.1	1.5 ±0.3	2.12 ±0.45	9.96 ± 1.16
Carotenoides (µg/g)	50.2 ±8.5	37.3 ±7.5	36.17 ±2.61	---

*Babu y col. (2008)

7.2.2. Ensilado químico de los residuos de camarón (*L. vannamei*)

7.2.2.1. Contenido de humedad, proteína, ceniza y lípidos del ensilado químico.

De acuerdo con los resultados de la Etapa I, las dos formulaciones de ácidos no mostraron diferencias significativas entre ellas ($P>0.01$) con respecto a la composición química de los ensilados, por consiguiente, se seleccionó solo una de ellas. De manera similar que los ensilados en los residuos de *L. aztecus*, cuyos resultados se reportan en el inciso 7.1.3., los residuos de *L. vannamei* fueron tratados con la mezcla de ácidos 4% ácido fórmico-4% acético (FA), seleccionada anteriormente en el inciso 7.1.2., debido principalmente al costo de los ácidos y, por tanto, la posibilidad de implementar una tecnología viable para la utilización de los residuos de camarón y obtención de astaxantina en las zonas de producción de camarón. Los resultados de humedad, cenizas, proteína y lípidos en la materia prima y ensilados se presentan en la Figura 38.

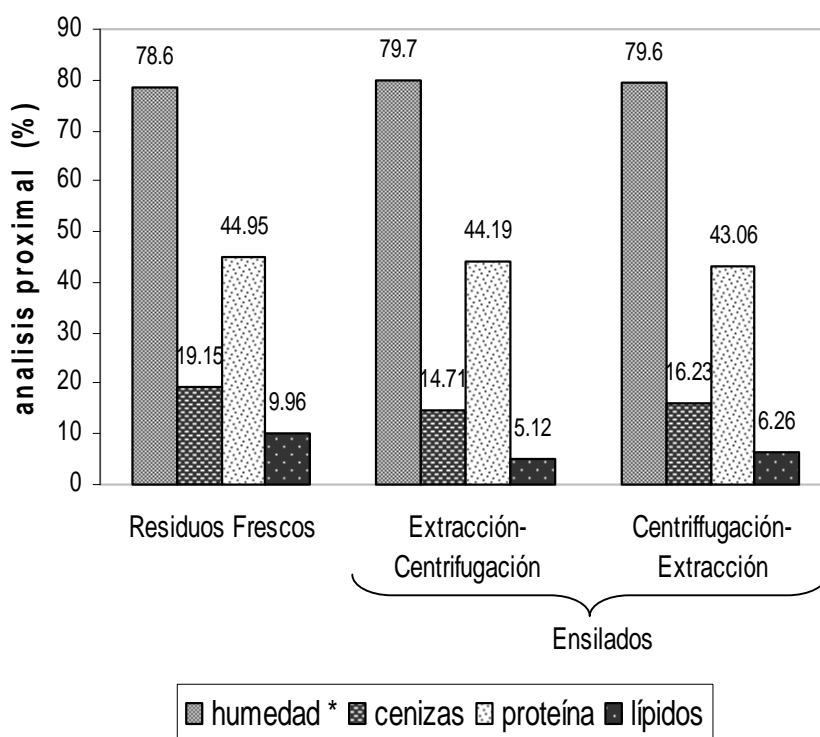


Figura 38. Contenido de humedad, cenizas, proteína y lípidos en la materia prima y en los ensilados.

Se observó que el contenido de humedad aumentó en 1.3% en los ensilados, debido a la adición de los ácidos en solución acuosa. Las cenizas disminuyeron en 23.1 y 15.3% en los ensilados EC y CE respectivamente, con respecto a los residuos frescos. Los ensilados mostraron diferencia significativa con respecto a la materia prima ($P < 0.001$), pero no diferencias significativas entre sí ($P > 0.01$). Esto se debió a que la quitina y el carbonato de calcio que forman parte de la estructura del exoesqueleto del camarón fueron disueltos durante el proceso de ensilado, según lo sugiere (Torrissen y col., 1981). Los ensilados no mostraron diferencias significativas en el contenido medio de cenizas ($P > 0.01$) (14.71 y 16.23 g/100g, en los ensilados EC y CE respectivamente).

Se observó la disminución en el contenido de proteínas de 1.6 y 4.2% en los ensilados EC Y CE, respectivamente, con respecto al residuo fresco, no mostrando diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los valores medios (44.19 y 43.06 g/100 g, en ensilados EC y CE respectivamente). Con la adición de ácidos orgánicos y consiguiente disminución del pH, se favoreció la actividad proteolítica de ciertas enzimas propias del material (pepsina, tripsina), las cuales actúan sobre las proteínas del tejido muscular del material produciendo la hidrólisis, y liberándose aminas, péptidos de alto y bajo peso molecular y aminoácidos solubles (Zdzislaw y col., 1994), los cuales se cuantifican como nitrógeno no proteico. Estos compuestos a su vez, no son más que sustancias solubles que afectan la capacidad amortiguadora del material y que pudieran incrementar el pH. Raa y Gildberg (1982) citados por Bello y col (1994) explican que la velocidad de autólisis está determinada por la actividad digestiva de la materia prima (desechos de camarón), y que la misma se hace más lenta a medida que los sitios favorables de unión sobre el sustrato han sido agotados. Esta variable junto a la actividad autolítica, están estrechamente relacionadas con los procesos proteolíticos o el grado de licuefacción del ensilado. A medida que transcurre el tiempo (días), el ensilado se va tornando “más líquido”, lo que está estrechamente relacionado con el proceso de solubilización de las proteínas y el proceso de licuefacción, consecuentemente a la par del mismo, el nitrógeno comienza a ser soluble (Bello, 1994).

El contenido de lípidos disminuyó en 48.5 y 31% en ensilados EC y CE, respectivamente, con respecto a los residuos frescos. Se observó diferencia significativa entre ambos ensilados ($P < 0.001$), con valores medios de 5.12 y 6.26 g/100g respectivamente, posiblemente debido a reacciones de oxidación y pese al uso de antioxidantes (Guillou y col., 1995). Se pudo observar mayor contenido de lípidos en *L. vannamei* (9.96 g/100 g) en comparación a *L. aztecus* (6.10 g/100 g).

7.2.2.2. Disminución de pH en el ensilado fórmico-acético

Al tratarse los residuos de camarón con la mezcla de ácidos fórmico-acético, se observó una disminución inmediata de pH al momento de adicionar la mezcla de ácidos, de 7.98 a 3.5, y aún cuando este valor fue menor al esperado, se consideró como aceptable. Al respecto, Aranson (1994) y otros autores (Raa y Gildberg, 1982; Vidoiti y col. 2002) destacan que para obtener un ensilado estable es necesario que se alcance un pH menor o igual a 4.0, porque en este medio ácido se inhibe el crecimiento y actividad de ciertos microorganismos que pueden dar origen a la descomposición del ensilado, y además se facilita una adecuada conservación del ensilado. A su vez, Bello (1994) señala que el pH es uno de los índices de mayor importancia y debe ser controlado durante todo el periodo de almacenamiento, pues refleja el desarrollo del proceso y calidad, además de manifestar cualquier cambio que pudiera afectar al ensilado. Gildberg y Raa (1982) refieren que el pH es el indicador primario de un proceso de descomposición, y que cuando existe contaminación por microorganismos tiende a aumentar, sin embargo, un ligero aumento en el pH no necesariamente indica un deterioro por microorganismos, puesto que existen procesos químicos de desaminación que producen liberación de amonio y por ende, pudiera afectar el pH.

Después de 48 h de ensilado, se observó que el producto obtenido presentó una consistencia semilíquida, al igual que en el ensilado de *L. aztecus*. Esta reducción a pH menor al observado para *L. aztecus*, pudo deberse a las condiciones iniciales que presentaron los residuos de esta especie; en este caso, al ser obtenidos de una empresa camaronera que aplica técnicas de higiene adecuadas para la conservación de los productos ya que las cabezas de camarón son destinadas a exportación. Por esto, los residuos utilizados presentaron un pH inicial menor (7.6) en comparación con el residuo utilizado en los estudios previos, el cual tuvo un pH inicial de 8.5. Cabe señalar que si las condiciones iniciales del residuo no son adecuadas, mayor concentración de ácidos tiene que ser utilizada. Asimismo, esto pudiera ser determinado por el análisis fisicoquímicos previo del residuo a utilizar (pH, proteínas, cenizas, etcétera).

7.2.2.3. Efecto de la secuencia de extracción del pigmento en los parámetros fisicoquímicos

La Tabla 20 muestra la composición de los residuos de camarón *L. vannamei* sujetos a las dos secuencias de extracción, acidificados con la mezcla de ácidos fórmico-acético.

En ambas secuencias de proceso se observó que las cenizas y proteínas se concentraron en el residuo sólido, mientras que los lípidos se encontraron principalmente en el licor. El contenido

medio de cenizas en el residuo sólido disminuyó al final de proceso con respecto al inicio del mismo en ambos procesos (EC y CE), siendo mayor la pérdida en el proceso EC (6.45 g/100 g residuos), mientras que en el proceso CE fue de 11.40 g/100 g residuos (Tabla 20); se encontró una diferencia significativa entre los procesos ($P < 0.001$). Igualmente disminuyó el contenido de proteínas, pero sin mostrar diferencia significativa entre los procesos ($P > 0.01$). El valor medio de la concentración de proteína en el residuo sólido para ensilado CE fue 40.79 g/100g desechos, y de 32.69 g/100g en EC (Tabla 20). Esta diferencia pudo ser debida a que durante el proceso CE la centrifugación previa separó a los diversos componentes presentes en el ensilado en la misma proporción debido a la consistencia semilíquida del ensilado; en cambio, en el proceso EC al realizarse previamente la extracción de los carotenoides con los solventes ya mencionados en la sección 6.1.5.1 en los ensilados y la posterior centrifugación, los componentes del mismo después del centrifugado fueron recuperados en diferentes proporciones.

Tabla 20. Composición de los ensilados químicos y sus fracciones.

Secuencia de extracción	Fracción	Análisis fisicoquímicos			
		Humedad*	Cenizas	Proteínas (g/100g base seca)	Lípidos
Extracción- Centrifugación	residuo fresco	78.60	19.15	44.95	9.96
	residuo ensilado	79.70	14.71	44.19	5.12
	licor	na	na	11.54	3.74
	residuo sólido	53.03	6.45	32.69	1.38
Centrifugación- Extracción	residuo fresco	78.60	19.15	44.95	9.96
	residuo ensilado	79.60	16.23	43.06	6.26
	licor	na	na	2.27	3.55
	residuo sólido	73.70	11.40	40.79	1.71

* % base húmeda
na= no analizado

Después del ensilado la mayor concentración de lípidos se concentró en el licor, con relación al residuo sólido, debido a su afinidad con los solventes utilizados en la extracción, y que la astaxantina presente en la fracción del licor se encuentra esterificada con ácidos grasos, disminuyendo el contenido de estos en su forma libre. Se observó la pérdida de lípidos al final de ambos procesos (26 y 43% en EC y CE, respectivamente) con respecto al inicio de los mismos, presentando diferencias significativas en ambos casos ($P < 0.001$). Los análisis

proximales del residuo sólido y el licor obtenidos en ambos procesos se presentan en la Figura 39.

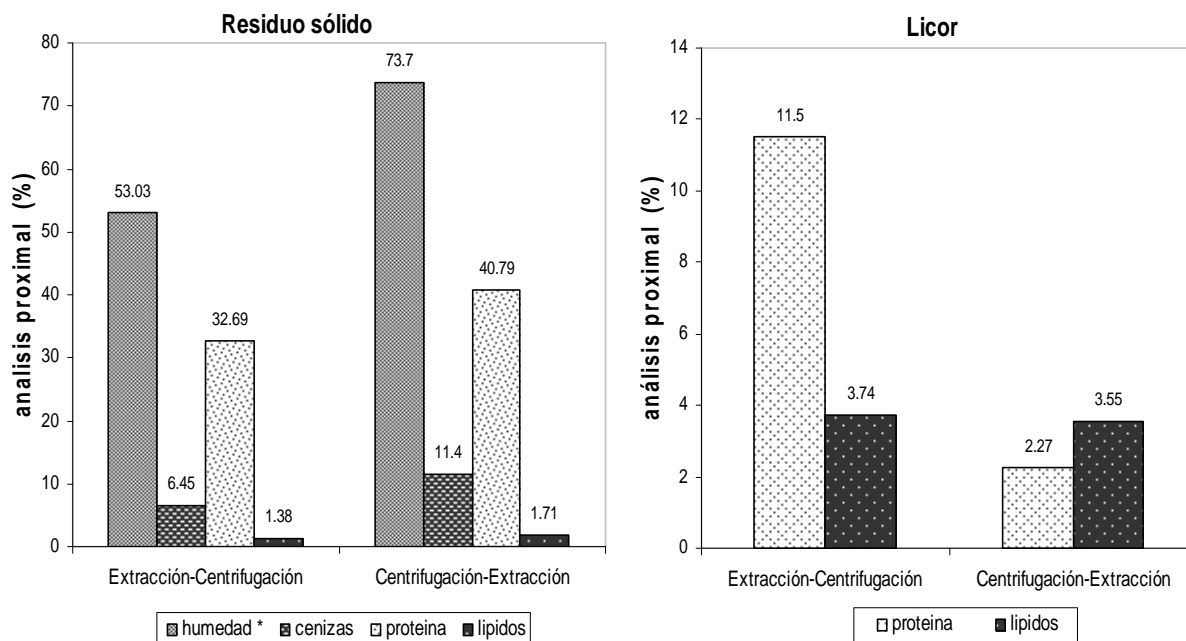


Figura 39. Análisis proximal del residuo sólido y el licor obtenidos en los procesos de extracción- centrifugación (EC) y centrifugación-extracción (EC) en residuos de *L. vannamei*.

7.2.3. Ensilado bacteriano en residuos de camarón de *L. vannamei*

7.2.3.1. Fermentación

Se utilizó la cepa de *Pediococcus pentosaceus* descrita en el inciso 6.1.3.1.; se reactivó y preparó el inóculo como se indica en el inciso 6.1.3.2. Los residuos de camarón *L. vannamei* mostraron una disminución gradual de pH de 7.98 a 4.17 durante 48 h de fermentación (Figura 40). Al igual que con los residuos de *L. aztecus*, el producto obtenido presentó una consistencia semilíquida. Este pH fue menor a lo esperado, de igual manera que el obtenido en el ensilado químico de *L. vannamei* (pH 3.5), debido al pH inicial de la materia prima, como ya se discutió anteriormente. Sin embargo, estos resultados coincidieron con los reportados por Fagbenro (1997) quien encontró un pH final de 4.2 en una fermentación de 7 días de cabezas de *Macrobrachium vollehovenni*, empleando como inóculo *Lactobacillus plantarum* y melazas como fuente de carbono.

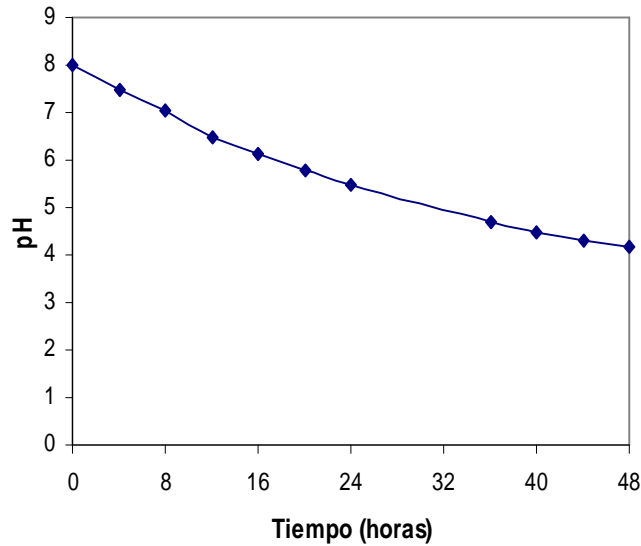


Figura 40. Disminución del pH en residuos de camarón *L. vannamei* en ensilado biológico.

Durante las primeras 24 h del ensilado se observó que éste presentaba un color rosado, posteriormente, posteriormente el material se oscureció (parduzco) y adquirió un olor acidificado agradable. Estas características se desarrollaron de acuerdo a la producción de ácido láctico, aumento de la acidez y la hidrólisis de las proteínas, a la vez que se inhibe el crecimiento de bacterias causantes de la descomposición. Como resultado, se estabiliza el residuo evitándose el deterioro y proporcionando una adecuada conservación del ensilado (Aranson 1994; Vidoiti y col. 2002).

En la Figura 41 los resultados mostraron que hubo una disminución en el contenido de humedad del 6.5 y 4.20% al final de los procesos EC y CE con respecto a la materia prima, sin diferencias significativas entre ellos ($P > 0.01$). De igual forma, disminuyó el contenido de cenizas con respecto a los desechos frescos, en 27.7 y 19.5% para los procesos EC y CE, respectivamente, debido a que las sales de calcio se disuelven a pH bajo. Asimismo, las proteínas disminuyeron en ambos procesos en porcentajes de 6.3 y 3.3% respectivamente para EC y CE, sin diferencias significativas ($P > 0.01$), con valores medios de 42.12 g/100 g y 43.45 g/100 g al final de los respectivos ensilados. El contenido de lípidos disminuyó en 32 y 29%, respectivamente para EC y CE, sin diferencia significativa ($P > 0.01$). Cabe mencionar que esta disminución fue menor que en el ensilado químico. En la Tabla 20 referida anteriormente se muestran los valores medios de las variables analizadas.

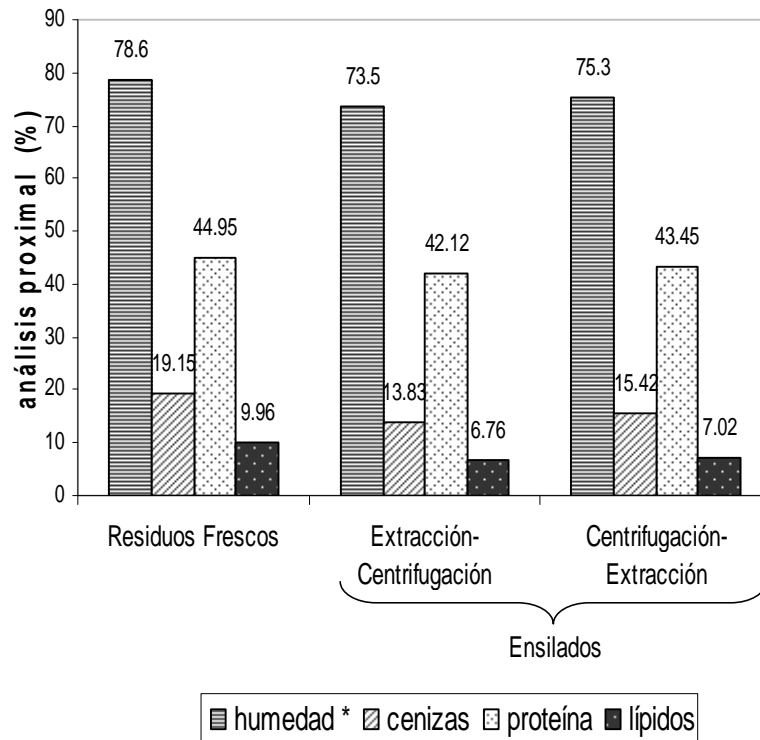


Figura 41. Análisis fisicoquímicos de los residuos frescos y ensilado bacteriano.

Se observó que durante la fermentación, las proteínas se concentraron en el residuo sólido y los lípidos en el licor; atribuido al hecho de que durante la fermentación las lipoproteínas fueron hidrolizadas, liberándose la fracción lipídica, lo que dio como resultado el incremento en el contenido de pigmentos carotenoides en el licor.

7.2.3.2. Efecto de la secuencia de procesos en la extracción de pigmentos

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos de los ensilados y sus fracciones, sujetos a las secuencias de proceso EC y CE, de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 6.1.3.3. se presentan en la Tabla 21.

En el residuo sólido, el contenido de cenizas disminuyó en 38.7 y 43.9%, mientras que las proteínas en 30.7 y 21.2% para los procesos EC y CE, respectivamente, con relación al residuo fresco, mostrando diferencias significativas entre ambas secuencias de extracción ($P < 0.001$). Esta reducción de cenizas y proteínas fue mayor que en el ensilado químico debido a que durante la fermentación pueden ocurrir simultáneamente los procesos de hidrólisis, promovida por las enzimas proteolíticas en la materia prima, y la acidificación dada por la producción de

ácido láctico (Cremades y col. 2001; Han-Ching y col., 1992; Torrissen y col., 1981; Guerrero y col., 1996). En la Tabla 21 se muestran los valores medios de las variables analizadas.

Tabla 21. Composición del ensilado bacteriano y sus fracciones.

Secuencia	Fracción	Análisis fisicoquímicos			
		Humedad*	Cenizas	Proteínas (g/100g base seca)	Lípidos
Extracción- Centrifugación	residuo fresco	78.60	19.15	44.95	9.96
	residuo ensilado	73.50	13.83	42.12	6.76
	licor	na	na	10.97	4.66
	residuo sólido	54.55	11.74	31.15	2.10
Centrifugación- Extracción	residuo fresco	78.60	19.15	44.95	9.96
	residuo ensilado	75.30	15.42	43.45	7.02
	licor	na	na	8.05	5.07
	residuo sólido	67.50	10.75	35.40	2.95

*% base húmeda

na= no analizado

Gibson y Barker (1979), encontraron que las enzimas digestivas del camarón se localizan en el cefalotórax (Gibson y Barker, 1979); sin embargo Rivas y col. (2001) también reportaron actividad del tipo tripsina y quimotripsina en el músculo del camarón azul (*Litopenaeus stilyrostris*).

En la fracción del licor, los lípidos registraron menor pérdida durante el ensilado, disminuyendo en 53.2% en el proceso EC y 49% en CE con respecto a los residuos frescos, sin encontrar diferencias significativas entre ambas secuencias de proceso ($P > 0.01$). La composición proximal del ensilado bacteriano y sus fracciones se muestran en la Figura 42.

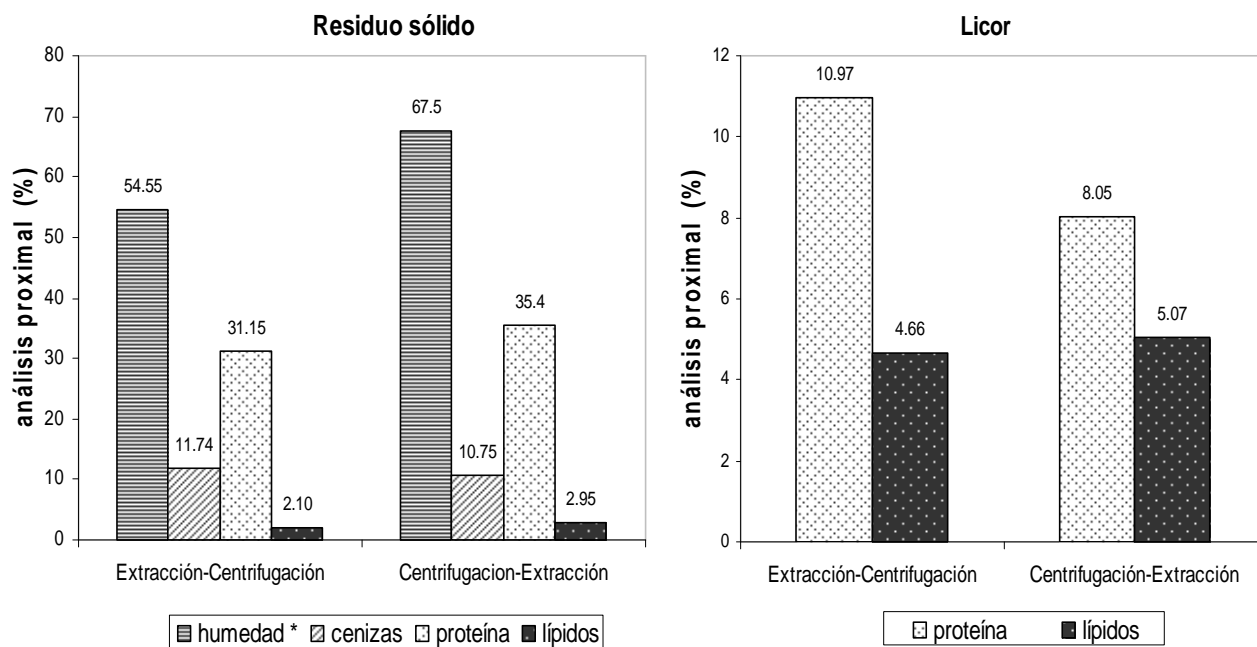


Figura 42. Análisis proximal del residuo sólido y el licor obtenidos en los procesos de extracción-centrifugación (EC) y centrifugación-extracción (EC) en residuos de *L. vannamei*.

7.2.3.3. Identificación y cuantificación de xantofilas totales y astaxantina

Xantofilas totales

La cuantificación de xantofilas totales es una valoración de la totalidad de carotenoides oxigenados que pudieran encontrarse en los residuos de camarón. En los productos de ambos ensilados, químico y bacteriano, los pigmentos carotenoides fueron extraídos siguiendo la metodología reportada por Armenta (2002), empleando el sistema de disolventes ya mencionado y bajo las condiciones descritas en el inciso 6.1.2.3.

Después de la extracción del pigmento bajo la secuencia de extracción de pigmentos (extracción-centrifugación y centrifugación-extracción), se obtuvieron dos fracciones: el residuo sólido y el licor. En la fracción del licor se encontró el mayor contenido de pigmentos determinados como xantofilas totales, en comparación con el residuo sólido; y el licor recuperado presentó un color naranja intenso, debido principalmente a la presencia de la astaxantina.

Los pigmentos fueron cuantificados como xantofilas totales por espectrofotometría según se describe en el inciso 6.1.5.1.

El contenido de xantofilas totales fue calculado utilizando la fórmula mencionada en la metodología y reportada en el AOAC (2001). Para las mezclas de solventes el factor de dilución fue el siguiente:

$$\frac{125 \text{ mL solvente de extracción (100 mL iniciales+25 mL de lavado)}}{10 \text{ g de residuo de camarón (v/p)}} = 12.5$$

por lo tanto, la relación disolvente/residuo fue: 125 mL/10 g = 12.5 mL/g. El contenido de xantofilas totales fue expresado como mg astaxantina/kg residuo o µg/g.

Después de la extracción, el contenido medio de xantofilas totales en los residuos frescos de *L. vannamei* fue de 36.17 µg/g residuo, este valor fue mayor al encontrado en *L. aztecus* (26.63 µg/g residuo) estudiado en la Parte I descrita anteriormente; sin embargo, estos valores coinciden con los datos reportados por Babu y col. (2008) para varios residuos de crustáceos de *P. indicus* (37.263 µg/g residuo) y *P. monodon* (24.363 µg/g residuo), las cuales son especies nativas de la India.

En el ensilado químico (Figura 43 A) se pudo observar que de acuerdo a la secuencia de extracción del pigmento, en el proceso CE se obtuvo el mayor contenido de xantofilas totales con valores medios de 54.2 µg/g residuo, y observando un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 49.8% con respecto a los residuos frescos; mientras que en el proceso EC el contenido de xantofilas totales fue menor con valores medios de 45.09 µg/g residuo, y con un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 24.6% con respecto al residuo fresco, encontrando diferencias significativas entre ambas secuencias de extracción (P<0.001).

De igual manera, en el ensilado bacteriano (fermentación) se encontraron diferencias significativas entre ambas secuencias de extracción (P<0.001) obteniendo mayor rendimiento de xantofilas totales en el proceso CE con valores medios de 46.56 µg/g residuo y observando un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 28.7%, con respecto al residuo fresco; mientras que en el proceso EC fue de 40.88 µg/g residuo y un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 13.02% con respecto al residuo fresco (Figura 43 B). Cabe destacar que estos valores fueron menores a los obtenidos en el ensilado químico.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de xantofilas totales indicaron que bajo el proceso Centrifugación-Extracción (CE) se obtuvieron mayores rendimientos en la recuperación de xantofilas totales tanto para el ensilado químico (54.2 $\mu\text{g/g}$ residuo), como en el bacteriano (46.56 $\mu\text{g/g}$ residuo) con relación al residuo fresco.

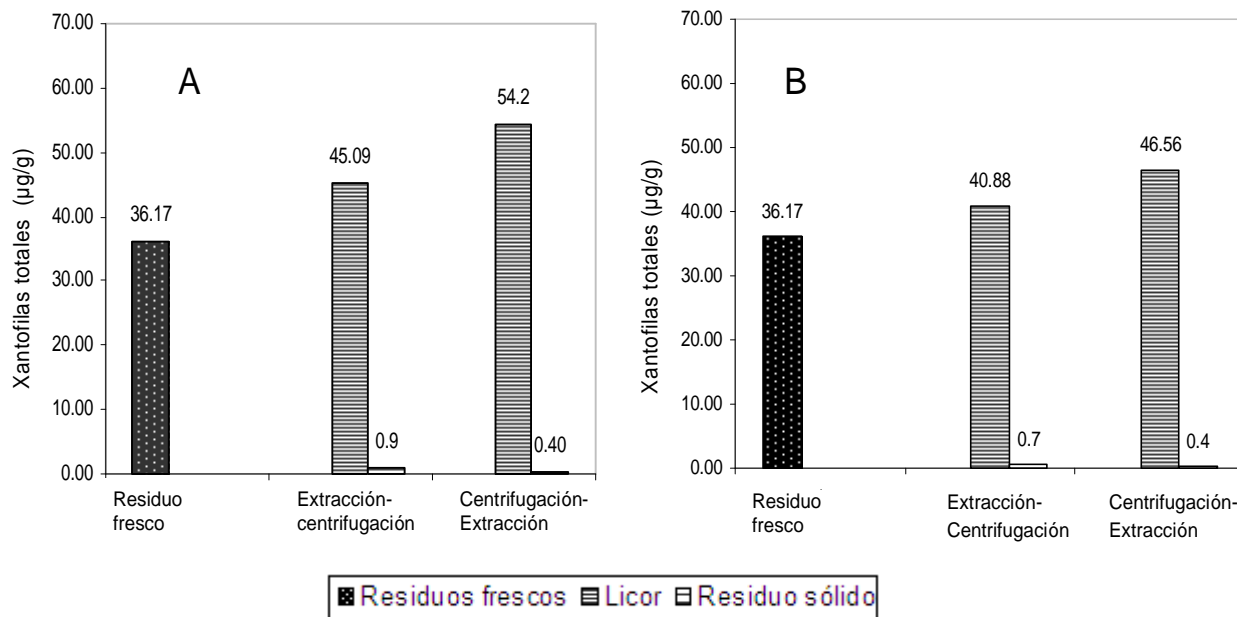


Figura 43 .Contenido de xantofilas totales en ensilado químico (A) y bacteriano (B) en residuos de *L. vannamei*.

Este aumento en el rendimiento de xantofilas después del ensilado pudiera ser explicado por el hecho que durante el proceso de ensilado se lleva a cabo una prehidrólisis de la carotenoproteína, y el rendimiento de extracción del pigmento aumenta al liberarse la astaxantina de la fracción proteica, a la vez que se estabiliza la estructura por la generación de un ambiente reductor (Torrissen y col., 1981). Al mismo tiempo, con la mezcla de disolventes utilizados (éter de petróleo:acetona:agua) se logró la mayor extracción de pigmentos debido a que este sistema tiene una naturaleza no polar, lo que influye directamente en la eficiencia de extracción de astaxantina ya que este pigmento es no polar debido a la larga cadena de unidades isoprenoides, aunque también posee en su estructura dos grupos hidroxilo y dos grupos carbonilo en los anillos de β -ionona. En el anexo 13 se muestra el contenido de xantofilas totales en ensilados quimico y bacteriano.

Astaxantina

La concentración de astaxantina en el licor fue analizada y cuantificada por HPLC bajo las mismas condiciones descritas en el inciso 6.1.5.2. La astaxantina y sus ésteres ha sido

identificada como el carotenoide mayoritario en el exoesqueleto de crustáceos (Meyers y Bligh, 1981). En cada uno de los ensilados se obtuvieron los cromatogramas correspondientes y los resultados mostraron la presencia de un pico en ambos ensilados con tiempos de retención semejantes, para ensilado químico $T_r=1.852\text{min}$ y ensilado bacteriano 1.815 min , y de acuerdo a los estándares analizados estos picos correspondieron al estándar de astaxantina ($T_r=1.801\text{ min}$). Además, en el licor del ensilado químico se observó un pico en 2.31 min correspondiente al astaceno ($6.085\text{E-}06\text{ mg/mL licor}$) bajo el proceso de extracción; mientras que en el bacteriano no se detectó la presencia de astaceno. De igual forma, la concentración de astaxantina en los ensilados químico y bacteriano mostraron valores semejantes ($3.24\text{ E-}03$ y $3.23\text{ E-}03\text{ mg/mL}$ de licor, respectivamente) en el proceso de EC, encontrando una pérdida de astaxantina de 16.2% en ambos casos, respecto a la concentración inicial de astaxantina en los residuos frescos ($3.87\text{ E-}03\text{ mg/mL}$ de licor). Sin embargo, en el proceso CE la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el ensilado químico ($7.72\text{ E-}03\text{ mg astaxantina/mL licor}$) en comparación al bacteriano ($5.38\text{ E-}03\text{ mg astaxantina/mL licor}$), observándose que la concentración de astaxantina se incrementó en 99% (ensilado químico) y 40% (ensilado bacteriano) con respecto al contenido inicial del pigmento en los residuos frescos. Estos resultados coinciden con el incremento mencionado anteriormente en las xantofilas totales obtenidas en el proceso de extracción CE. Este incremento pudo ser debido a la hidrólisis del complejo caroteno-proteína que aumenta el rendimiento y estabilizando la estructura química de la astaxantina. La Figura 44 y el anexo 13 muestran comparativamente los contenidos de astaxantina en los ensilados químico y bacteriano, respectivamente.

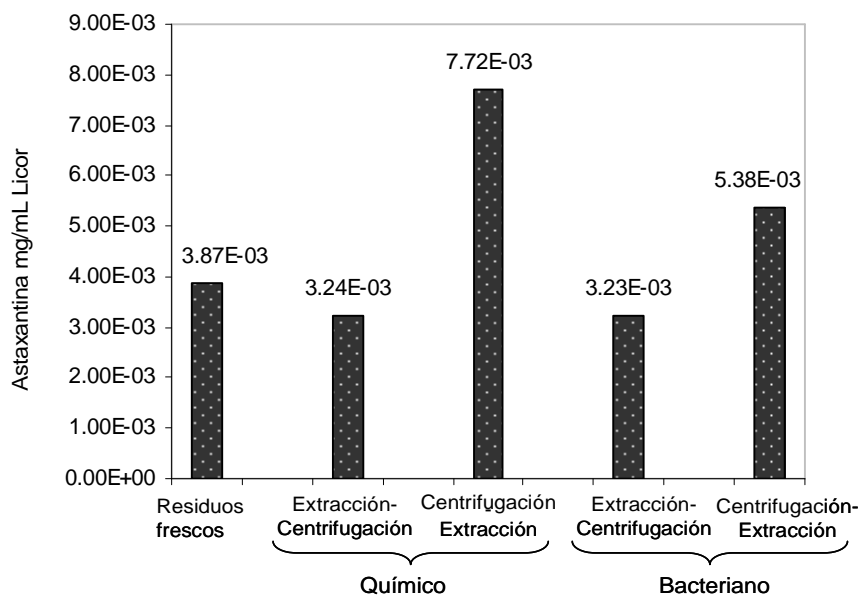


Figura 44. Concentración de astaxantina en los licores obtenidos en el ensilado químico y bacteriano (mg/mL de licor) en residuos de *L. vannamei*.

7.2.4. Comparación de los ensilados

A través del desarrollo de esta tesis se observó que el proceso del ensilado es relativamente simple de aplicar, y ya sea químico o bacteriano cada uno de ellos tiene sus ventajas pero también sus limitaciones. Este proceso de ensilado inicialmente fue aplicado de manera artesanal en desechos de la industria pesquera y ha tenido gran desarrollo en algunos países escandinavos donde actualmente es realizado de forma industrial, principalmente en Noruega (Llanes-Iglesias y col., 2007).

Es difícil establecer comparaciones entre los ensilados estudiados, sin embargo en relación a la composición química de los ensilados y sus fracciones, los resultados indicaron que en ambos ensilados (químico y bacteriano) hubo una disminución en el contenido de cenizas y proteínas debido a que las sales de calcio son disueltas en pH bajo, y al mismo tiempo las proteínas fueron hidrolizadas por enzimas propias del material. Los lípidos y la astaxantina estuvieron presentes en la fracción del licor debido a su naturaleza liposoluble. Sin embargo, los resultados obtenidos en ambos ensilados respecto a la cuantificación de xantofilas totales y contenido de astaxantina mostraron diferencias significativas en la secuencia de extracción del pigmento. Debido a ello, se establecieron las razones para poder seleccionar el ensilado más eficiente, y fueron las siguientes:

- Utilizando el sistema de disolventes de extracción ya mencionado en el inciso 6.1.2.3, el mayor rendimiento en la extracción del pigmento en desechos de camarón de *L. vannamei* se consiguió en el ensilado químico, bajo la secuencia de Centrifugación-Extracción (CE) obteniendo un rendimiento de xantofilas totales de 54.2 µg/g residuo, y un incremento del 49.8% con respecto a los residuos frescos (36.17 µg/g residuo). En el bacteriano, el rendimiento de xantofilas fue de 46.56 µg/g residuo y observando un incremento en el rendimiento solo del 28.7%, con respecto al residuo fresco.
- En la secuencia Extracción-Centrifugación, en el ensilado químico los rendimientos de xantofilas totales fueron menores con valores de 45.09 µg/g residuo, y con un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 24.6% con respecto al residuo fresco. En el ensilado bacteriano, el rendimiento de xantofilas fue de 40.88 µg/g residuo y un incremento en el rendimiento de xantofilas totales del 13.02% con respecto al residuo fresco. Cabe señalar que estos valores obtenidos bajo esta secuencia de extracción fueron menores a los reportados anteriormente por el proceso CE.

- Haciendo un análisis y comparación respecto al contenido de astaxantina, se observó que bajo la secuencia de extracción EC ambos ensilados químico y bacteriano mostraron valores semejantes (3.24 E-03 y 3.23 E-03 mg/mL de licor, respectivamente), encontrando disminución en la concentración del pigmento durante el proceso de ensilado del 16.2% en ambos casos, respecto a la concentración inicial de astaxantina en los residuos frescos (3.87 E-03 mg/mL de licor). Haciendo una comparación con la secuencia CE se observó que bajo este proceso, la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el ensilado químico (7.72 E-03 mg astaxantina/mL licor) en comparación al bacteriano (5.38 E-03 mg astaxantina/mL licor), incluso observándose que la concentración de astaxantina se incrementó en un 99% (ensilado químico) y 40% (ensilado bacteriano) con respecto al contenido inicial del pigmento en los residuos frescos. Por consiguiente, bajo esta secuencia se obtuvieron mejores resultados en la extracción del pigmento.

Por lo anterior, se considera que el ensilado más eficiente fue el ensilado químico, con el sistema de solventes empleado en este trabajo y bajo la secuencia de centrifugación y posterior extracción (CE) se lograron óptimos rendimientos estabilizando el pigmento y la liberación de astaxantina incrementando este rendimiento. Estos resultados pueden ser observados de manera gráfica en la Figura 44. En el anexo 13 se muestra el contenido de xantofilas totales y astaxantina en ensilados químico y bacteriano.

7.3. Etapa III. Estudio de la Estabilidad de Astaxantina

7.3.1. Estabilidad de xantofilas totales

Para realizar los estudios de estabilidad de los pigmentos, se utilizó el licor obtenido en el ensilado químico (4% ácido fórmico-4% ácido acético) con la secuencia de proceso CE (centrifugación-extracción), en virtud de que éste mostró mayor rendimiento en la obtención de astaxantina. El licor obtenido fue concentrado al vacío, obteniéndose un extracto de consistencia aceitosa y con un color rojo-naranja intenso. El sólido obtenido fue disuelto en un volumen conocido de acetona, obteniéndose una concentración final de $1.7032 \text{ E-02 mg astaxantina/mL acetona}$. A cada uno de los dos sistemas modelo (lipídico y proteico) se añadieron alícuotas del extracto, según se describe en el inciso 6.3.2. y se almacenaron por cinco semanas. De igual forma, alícuotas del extracto en diferentes concentraciones fueron incorporados en una pasta cárnica, de acuerdo al inciso 6.3.4.

Los carotenoides son extremadamente reactivos y, en consecuencia, muy inestables debido a su cadena de dobles enlaces conjugados, por lo que se deben tomar precauciones durante su extracción, análisis y almacenamiento, siendo necesario protegerlas de agentes ambientales, principalmente el oxígeno, la temperatura y la luz. Por ello, en este estudio se realizaron estudios sobre la estabilidad del pigmento incorporando el pigmento en aceite de girasol comestible (4% residuo/aceite) y en una solución de proteína (albúmina 1%). Estas concentraciones fueron previamente determinadas como la concentración máxima donde el extracto de astaxantina en acetona se disolvió completamente. El efecto de los factores ambientales sobre la estabilidad de astaxantina fue estudiado a través del diseño experimental indicado en el inciso 6.3.2.3.

7.3.1.1. Sistema proteína-pigmento

Xantofilas totales

La concentración de xantofilas totales disminuyeron notablemente en el sistema proteico, considerando todos los factores estudiados, con pérdidas de 65 hasta 90% durante las 5 semanas de estudio, observándose que las muestras almacenadas en aire/obscuridad/20°C presentaron la mayor degradación (pérdidas hasta del 90.5%), mientras que las muestras almacenadas sin-aire/luz/4°C y aire/ luz/4°C presentaron menor pérdida de xantofilas, con

pérdidas del 65.2 y 67%, respectivamente, con respecto al valor inicial. Los resultados son mostrados en la Tabla 22.

Tabla 22. Efecto de factores ambientales en la concentración de xantofilas totales en el sistema modelo proteico.

Disponibilidad de aire	Iluminación	Temperatura de Almacenamiento (°C)	Tiempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
sin aire	SI	4	8.438*	6.594	6.273	5.780	4.767	2.938
		20	8.438	3.707	3.285	2.627	2.115	1.751
aire		4	8.438	4.463	4.694	4.260	3.290	2.782
		20	8.438	3.535	3.554	2.325	2.118	1.546
sin aire	NO	4	8.438	6.090	5.646	3.296	2.210	1.127
		20	8.438	4.279	3.878	2.209	1.981	1.658
aire		4	8.438	4.031	3.542	2.665	2.018	1.793
		20	8.438	3.209	2.786	2.082	1.384	0.799

* $\times 10^{-04}$ mg/mL

Las muestras almacenadas bajo condiciones sin-aire/luz/4°C y aire/luz/4°C presentaron menor degradación de xantofilas totales (degradación del 65 y 67% respectivamente), comparadas con las muestras almacenadas sin-aire/luz/20°C y aire/luz/20°C (degradación del 81.6 y 79%, respectivamente). Mientras que las muestras sin-aire/obscuridad/20°C y aire/obscuridad/4°C presentaron menor degradación de xantofilas (degradación del 80.3 y 78.7%, respectivamente). Se pudo observar una tendencia de degradación de xantofilas totales, tanto en las muestras almacenadas en presencia como en ausencia de aire.

El contenido de xantofilas totales fue significativamente afectado en el sistema proteico por la iluminación ($P < 0.001$), la temperatura ($P < 0.001$), la disponibilidad de aire ($P < 0.001$) y el tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$). Se observó que el contenido de xantofilas en el sistema proteico mostró un marcado y rápido descenso durante la primera semana de almacenamiento, siguiendo una menor reducción en las semanas siguientes. La misma tendencia fue observada bajo condiciones de luz y obscuridad, así como con y sin aire (Figura 45). Esto podría explicarse por la presencia de otros carotenoides, además de la astaxantina, los cuales pudieran ser susceptibles a los factores estudiados aumentando los niveles de oxidación. Aunque se ha

reportado que la astaxantina es el pigmento mayoritario en los residuos de camarón y representa entre 90 y 95%, también pueden encontrarse otros carotenoides como son alfa y beta-caroteno y luteína (Lotocka y Styczynska-Jurewicz, 2001).

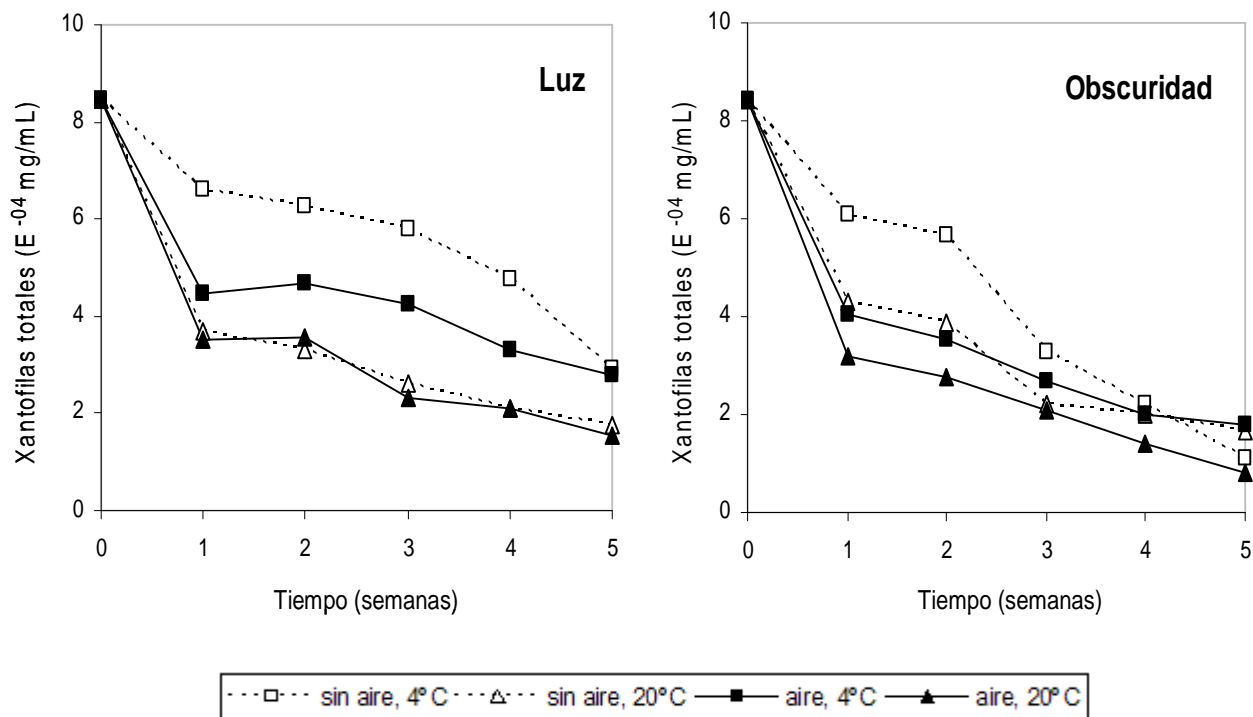


Figura 45. Concentración de xantofilas totales en el sistema proteína-pigmento.

Astaxantina

Se observó que bajo todos los factores estudiados hubo una oxidación considerable de astaxantina del 85 al 89%. Las muestras almacenadas bajo aire/obscuridad/20°C mostraron altos niveles de oxidación (degradación del 88.95%); sin embargo, en las muestras almacenadas sin-aire/luz/4°C los niveles de oxidación fueron menores (degradación del 85.14%). Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Efecto de factores ambientales en la concentración de astaxantina en el sistema modelo proteico.

Disponibilidad de aire	Iluminación	Temperatura de Almacenamiento (°C)	Tiempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
sin aire	SI	4	4.980*	1.175	1.040	0.820	0.755	0.740
		20	4.980	0.975	0.950	0.720	0.650	0.705
		4	4.980	1.055	0.855	0.800	0.775	0.740
		20	4.980	1.080	0.930	0.890	0.810	0.620
aire	NO	4	4.980	2.590	0.940	0.815	0.765	0.730
		20	4.980	0.995	0.925	0.775	0.685	0.660
		4	4.980	1.070	0.910	0.740	0.655	0.560
		20	4.980	0.940	0.770	0.740	0.580	0.550

* x 10⁻⁰⁴ mg/mL

La concentración de astaxantina en el sistema proteico mostró un rápida caída durante la primera semana de almacenamiento y de forma gradual durante la segunda semana, con diferencias significativas entre la semana 0, 1 y 2 ($P < 0.001$), sin embargo en las siguientes semanas (3, 4 y 5) la degradación fue menor, sin diferencias significativas entre ellas ($P > 0.01$). Estos resultados son mostrados en la Figura 46.

Esto pudiera ser explicado por el hecho de que la astaxantina es susceptible a reacciones, no solo de oxidación dando la formación de astaceno, sino también de isomerización de *trans*-isómeros a la configuración *cis*-astaxantina, principalmente 9-*cis* y 13-*cis*-astaxantina (Yuan y Chen, 1999). Asimismo, se ha reportado que la combinación de factores tales como la luz, oxígeno y alta temperatura ($< 45^{\circ}\text{C}$) promueven la rápida oxidación de astaxantina (Armenta y Guerrero, 2009). Puede suponerse que la astaxantina sufrió reacciones de oxidación e isomerización en la primera semana de almacenamiento; sin embargo, a pesar que durante las siguientes semanas la degradación fue menor, la mayoría de la astaxantina originalmente presente en las muestras se había oxidado.

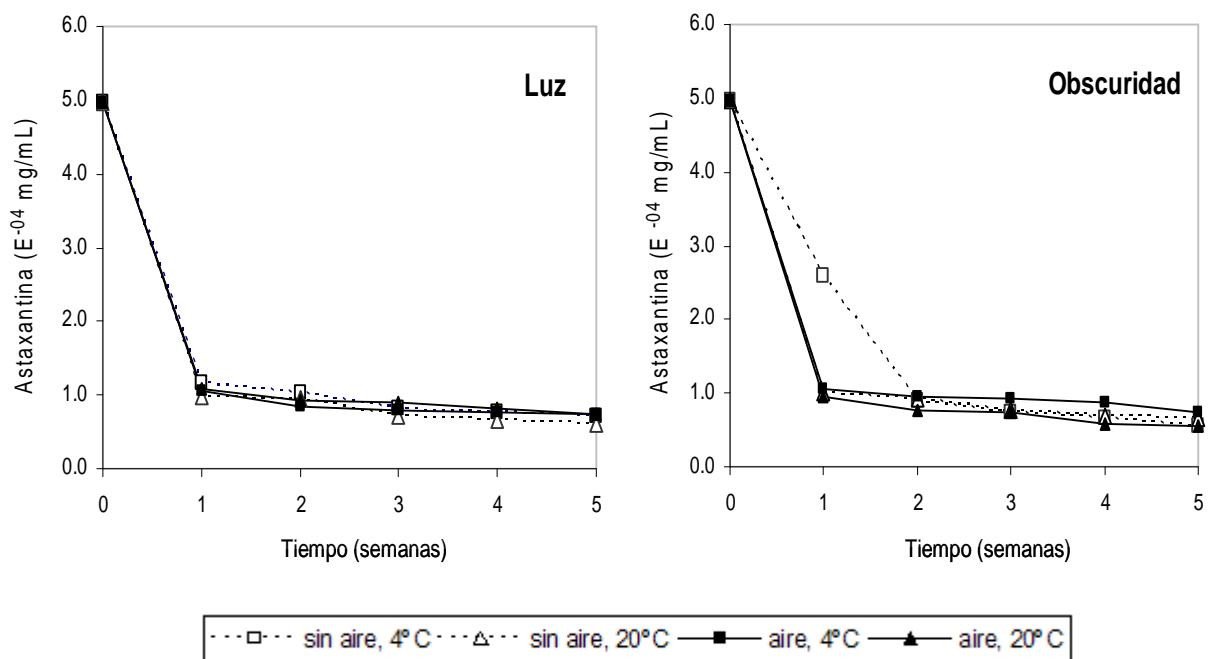


Figura 46. Concentración de astaxantina en el sistema proteína-pigmento.

Cabe considerar algunas de las características químicas del sistema proteico; como otras proteínas de la clara de huevo (ovoalbúmina, conalbúmina, ovomucoide, etc.), la albúmina posee una baja hidrofobicidad superficial (60 valor relativo, si se compara con la *k*-caseína con 1,300 valor relativo) (Cheftel, 1989). La insuficiente protección aportada por la albúmina a la astaxantina en este sistema pudo ser debido a la orientación de los grupos hidrofílicos de la molécula. En la mayoría de las proteínas globulares y solubles en agua, los aminoácidos hidrófobos tienden a colocarse hacia el interior de la molécula, mientras que los aminoácidos polares (hidrofílicos) se reparten principalmente en la superficie de la proteína de una manera bastante uniforme (Shahidi y Brown, 1998). Puesto que los carotenoides poseen una naturaleza no polar, no hay suficiente interacción con residuos cargados en la superficie de la proteína (albúmina) y, por consiguiente, la estabilidad de la astaxantina disminuyó rápidamente durante el tiempo de estudio (Cheftel, 1989).

La concentración de astaxantina no fue afectada por los factores estudiados de iluminación ($P=0.1080$), temperatura ($P=0.3990$), y disponibilidad de aire ($P=0.5864$). Sin embargo, el tiempo de almacenamiento sí afectó significativamente la concentración del pigmento ($P<0.001$). Los resultados del análisis estadístico son mostrados en los anexos 14 y 15 y la comparación múltiple de medias (anexo 16).

7.3.1.2. Sistema aceite-pigmento

Xantofilas totales

Sachindra y Mahendrakar (2005) realizaron un estudio reportando una optimización en el rendimiento de extracción de astaxantina al utilizar aceite de girasol comercial, en comparación con otros aceites vegetales. Por ello, en este estudio se decidió incluir este aceite en un sistema modelo para realizar las pruebas de estabilidad del pigmento. La Tabla 24 muestra las concentraciones de xantofilas totales (mg/mL) en el sistema modelo lipídico, durante el tiempo de estudio.

Tabla 24. Efecto de factores ambientales en la concentración de xantofilas en el sistema modelo lipídico.

Disponibilidad de aire	Iluminación	Temperatura de Almacenamiento (°C)	Tiempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
sin aire	SI	4	8.253*	7.992	7.964	7.903	7.876	7.849
		20	8.253	7.971	7.921	7.886	7.863	7.813
		4	8.253	7.986	7.934	7.880	7.854	7.786
		20	8.253	7.977	7.912	7.843	7.675	7.646
aire	NO	4	8.253	8.110	8.013	7.993	7.931	7.913
		20	8.253	7.981	7.938	7.876	7.803	7.781
		4	8.253	7.943	7.927	7.843	7.749	7.598
		20	8.253	7.938	7.849	7.745	7.662	7.646

*x 10⁻⁰⁴ mg/mL

Se observó que el contenido de xantofilas totales disminuyó en menor proporción que la concentración de xantofilas totales observada en el sistema proteico, con pérdidas de 4.1 hasta 7.9%. Los resultados mostraron que las muestras almacenadas bajo condiciones que incluían la presencia de aire: aire/luz/20°C, aire/oscuridad/4°C y aire/oscuridad/20°C, presentaron los más altos niveles de degradación (7.4, 7.9 y 7.4%, respectivamente), con relación al contenido inicial; sin embargo, las muestras almacenadas en ausencia de aire: sin-aire/luz/4°C y sin-aire/oscuridad/4°C presentaron la menor degradación (4.8 y 4.1%, respectivamente).

Las muestras almacenadas bajo iluminación siguieron un comportamiento similar de degradación entre ellas, mientras que las muestras almacenadas en obscuridad presentaron mayor variabilidad durante el tiempo.

La concentración de xantofilas totales fue significativamente afectado por los factores de disponibilidad de aire ($P < 0.001$) y temperatura ($P < 0.001$). La iluminación afectó en el sistema proteico ($P < 0.001$), pero no en el sistema lipídico ($P = 0.1384$), mientras que la disponibilidad de aire incrementó la degradación de xantofilas en el sistema lipídico ($P < 0.001$), y en mayor grado en el sistema proteico ($P < 0.001$). La temperatura afectó la concentración de xantofilas en ambos sistemas, proteico y aceite ($P < 0.001$). El tiempo de almacenamiento fue el factor que mayor efecto ejerció en la concentración de xantofilas totales, disminuyendo significativamente durante el almacenamiento ($P < 0.001$) (Figura 47).

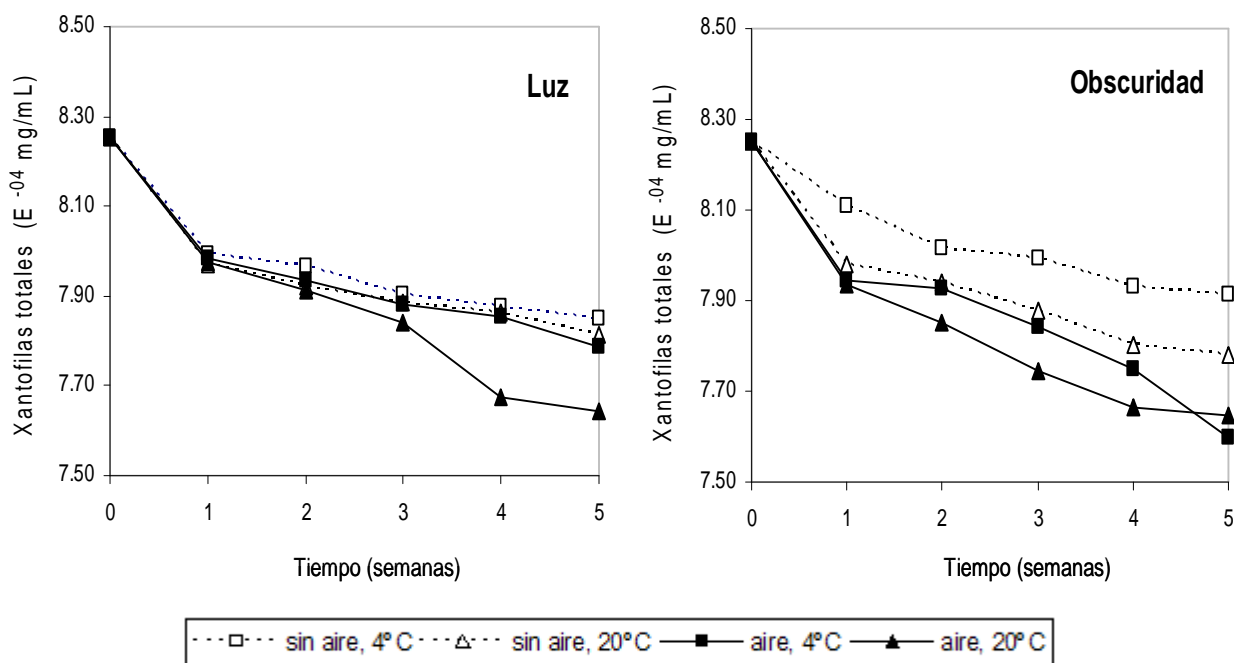


Figura 47. Concentración de xantofilas totales en el sistema aceite-pigmento.

Astaxantina

La astaxantina libre, después de la disociación del complejo caroteno-proteína, asociado a la vez con lípidos, es menos estable a la oxidación. Sin embargo, se observó que la concentración de astaxantina en el sistema lipídico disminuyó en forma menos severa que en el sistema proteico, con disminución en el intervalo de 29.6 a 48.4%. Las muestras almacenadas bajo condiciones de aire y mayor temperatura: aire/luz/20°C y aire/obscuridad/20°C, presentaron

mayor degradación (39.8 y 48.4%, respectivamente), con respecto al valor inicial. Mientras que las muestras almacenadas sin-aire/luz/ 4°C y sin-aire/obscuridad/4°C presentaron menor degradación de astaxantina (29.6 y 33.3%, respectivamente), con relación al valor inicial. Los resultados son mostrados en la Tabla 25.

Tabla 25. Efecto de factores ambientales en la concentración de astaxantina en sistema modelo lipídico.

Disponibilidad de aire	Iluminación	Temperatura de Almacenamiento (°C)	Tiempo (semanas)					
			0	1	2	3	4	5
sin aire	SI	4	5.196*	4.773	4.670	4.383	3.756	3.654
		20	5.196	4.183	3.982	3.895	3.516	3.441
aire		4	5.196	4.359	3.951	3.669	3.574	3.369
		20	5.196	3.694	3.609	3.497	3.243	3.124
sin aire	NO	4	5.196	4.804	4.336	3.921	3.720	3.463
		20	5.196	4.316	3.539	3.473	3.456	3.379
aire		4	5.196	3.929	3.740	3.477	3.403	3.234
		20	5.196	3.902	3.808	2.913	2.741	2.683

* x 10⁻⁰⁴ mg/mL

Con base en los resultados, la astaxantina mostró tener mayor estabilidad en el sistema lipídico que en el proteico. En el sistema lipídico, la disponibilidad de aire, la luz y la temperatura no tuvieron efecto significativo sobre la oxidación del pigmento (P>0.01), mientras que la concentración de astaxantina solo fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento (P<0.001). El análisis estadístico es mostrado en los anexo 17 y 18.

Tanto en condiciones de luz como de obscuridad se observó una degradación marcada en la concentración de astaxantina durante la primera semana de estudio. En el sistema lipídico, la concentración de astaxantina siguió una tendencia similar en almacenamiento en ambas condiciones de iluminación (Figura 48).

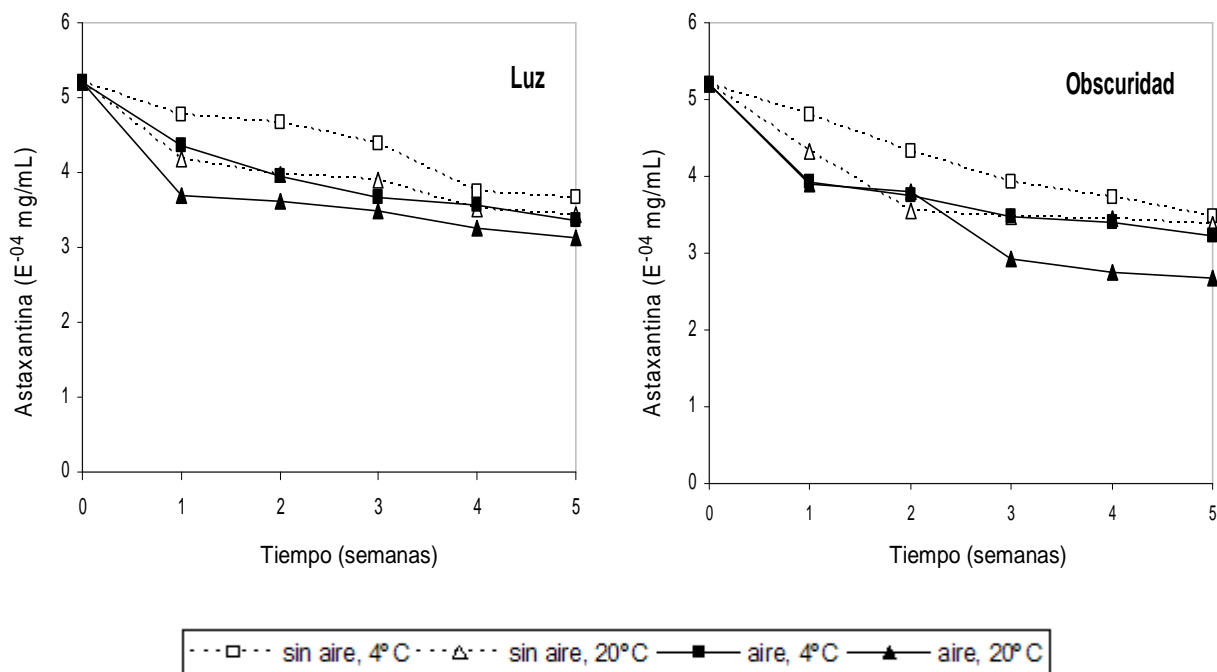


Figura 48. Concentración de astaxantina en sistema aceite-pigmento.

De acuerdo con Rodríguez-Amaya (1999) la degradación de carotenoides es principalmente debida a reacciones iniciadas por el oxígeno en las cadenas insaturadas, resultando en oxidación e isomerización. La temperatura, la luz y los ácidos pueden también promover reacciones de isomerización de configuración *trans*-astaxantina a *cis*-astaxantina. Sin embargo estas reacciones dependen de la disponibilidad de oxígeno, y de la temperatura ya que éstas se inician a $<40^{\circ}\text{C}$ con la formación de epóxidos y apocarotenoides, con la subsiguiente fragmentación produciendo compuestos de bajo peso molecular, similar a los generados durante la oxidación de ácidos grasos.

La mayor estabilidad de las xantofilas y la astaxantina en el sistema lipídico podría ser explicada por el hecho de que el aceite actúo como una buena barrera al oxígeno, dando protección al pigmento. Asimismo, el contacto entre las moléculas de astaxantina, los antioxidantes naturales tales como la vitamina E (tocoferoles), y antioxidantes sintéticos añadidos al aceite durante su procesamiento podrían tener un papel importante en retardar la degradación de astaxantina (Chen y Meyers, 1982b).

Asimismo, los acilgliceridos del aceite de girasol pudieran ejercer funciones antioxidantes previniendo el ataque a la cadena isoprenoide. Esta es la razón por la cual la extracción de

astaxantina de residuos de crustáceos utilizando aceites ha sido exitosa (Sachindra y col., 2005).

Los acilglicéridos actúan también como protectores con la oxidación iniciada por los radicales libres; sin embargo este efecto solo ocurrió durante la fase inicial, ya que más tarde los mismos componentes del aceite fueron susceptibles a oxidación teniendo un efecto prooxidante sobre la astaxantina (Meléndez-Martínez y col., 2004).

Los resultados obtenidos indicaron que en ausencia de aire, tanto las xantofilas como la astaxantina sufrieron menor oxidación, aunque también se vieron afectadas, en menor grado, por la temperatura y la luz. Sin embargo, los componentes del sistema lipídico no fueron suficientes para dar protección a los pigmentos contra los factores ambientales, principalmente el tiempo de almacenamiento. En el sistema lipídico la degradación fue menor en comparación con el proteico, en donde la pérdida de pigmento fue severa durante el tiempo de almacenamiento.

7.3.1.3. Pasta cárnica

Xantofilas totales

La Tabla 26 muestra la concentración de xantofilas totales en la pasta cárnica modelo a diferentes concentraciones iniciales de xantofilas totales. Se observó que la concentración de xantofilas totales fue disminuyendo durante el tiempo de almacenamiento con una degradación importante después de la segunda semana de almacenamiento en todas las concentraciones. Sin embargo, en la concentración inicial de 0.861 mg/mL la degradación de xantofilas fue menor al final del tratamiento. Las muestras con una concentración inicial de 0.1722 y 344 mg astaxantina mostraron mayor degradación de xantofilas, observando una disminución marcada después de la segunda semana de almacenamiento.

En la Figura 49 se puede observar que el contenido de xantofilas totales presentó mayor degradación después de la semana 2 en todas las concentraciones. Las muestras con una concentración inicial de 0.688 y 0.861 mg de astaxantina fueron las que presentaron menor degradación de xantofilas totales.

Tabla 26. Concentración de xantofilas totales con respecto a la cantidad de astaxantina añadida en la pasta cárnica durante el tiempo de almacenamiento.

mg astaxantina adicionada en la pasta	Tiempo (semanas)				
	0	1	2	3	4
0.172	6.915*	6.300	5.559	2.712	2.508
0.344	12.000	11.200	10.135	7.966	2.610
0.516	12.474	11.900	11.322	8.271	4.712
0.688	15.186	15.080	14.881	10.711	8.067
0.861	16.271	15.600	15.084	9.142	8.547

* x 10⁻⁰³ mg astaxantina/mL

Se observó diferencia significativa entre las concentraciones de xantofilas totales al final del tratamiento ($P < 0.001$), tanto con respecto a la concentración inicial de astaxantina añadida en la pasta cárnica, como con respecto al tiempo de almacenamiento (Anexo 20).

La escasa estabilidad de las xantofilas totales en la pasta cárnica pudiera deberse a que éste es un sistema complejo formado por diversos componentes, los cuales no le proporcionaron suficiente protección al pigmento, e incluso algunos de estos componentes pudieron ejercer un efecto prooxidante, afectando la estructura y consecuentemente la estabilidad del pigmento.

Entre estos prooxidantes potenciales están los productos de degradación de grasas, que pudieran provocar rancidez oxidativa. Además, la presencia del oxígeno acelera estos procesos de degradación afectando significativamente la estabilidad del pigmento en el sistema cárnico modelo.

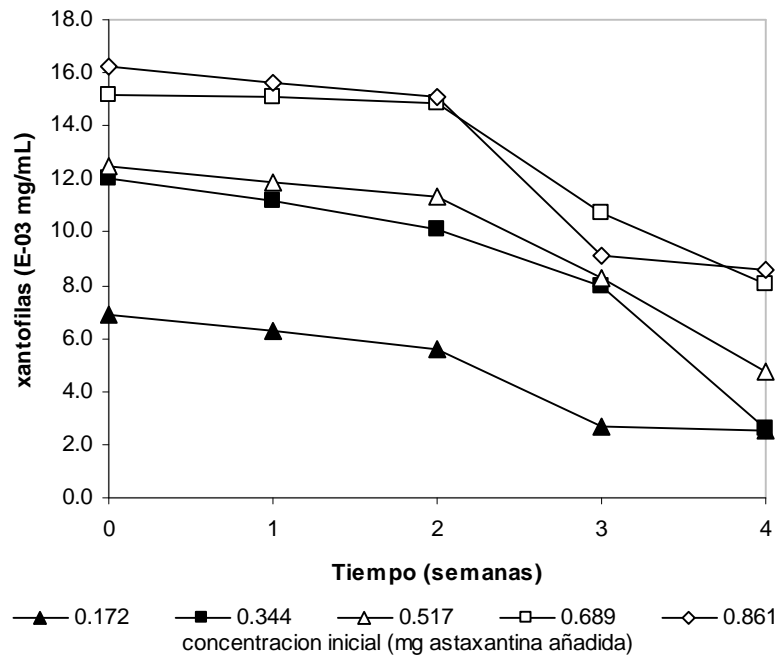


Figura 49. Concentración de xantofilas totales en la pasta cárnica.

Astaxantina

La Tabla 27 muestra la concentración de astaxantina residual en la pasta cárnica modelo con respecto al tiempo de almacenamiento. La degradación de este pigmento fue similar al comportamiento de degradación de las xantofilas totales, las muestras tuvieron menor degradación hasta la semana 2, aumentando posteriormente con pérdidas entre 50 y 75% del pigmento con respecto al contenido inicial.

Las muestras con una concentración inicial de 0.681 y 0.851 mg astaxantina/mL acetona fueron las que mostraron menor pérdida del pigmento obteniendo mayor concentración de astaxantina residual al final del tratamiento, sin embargo durante el tiempo del estudio sufrieron pérdidas del 52 y 48% respectivamente. Mientras que cuando se añadió una concentración de 0.170 mg astaxantina/mL acetona se observó una menor concentración de astaxantina residual con gran pérdida del pigmento aproximadamente del 75.4%, con respecto a la concentración inicial. Como era de esperarse, a medida que aumentaba la concentración de astaxantina añadida a la pasta, también aumentaba la concentración de astaxantina residual.

Tabla 27. Concentración de astaxantina residual con respecto a la cantidad de astaxantina añadida durante el tiempo de almacenamiento de pasta cárnica.

mg astaxantina/mL acetona adicionada en la pasta	Tiempo (semanas)				
	0	1	2	3	4
0.170	16.063*	15.200	14.133	11.404	3.929
0.340	19.019	18.300	17.090	7.090	5.128
0.510	19.917	19.200	17.987	16.127	6.299
0.681	18.199	17.500	16.269	12.375	8.468
0.851	21.198	20.100	19.268	17.817	10.885

*x 10⁻⁰⁵ mg astaxantina/mL

Al igual que en la concentración de xantofilas totales, la concentración de astaxantina presentó diferencias significativas con respecto a la concentración inicial añadida ($P < 0.001$), así como con respecto al tiempo ($P < 0.001$), sin embargo, la concentración inicial tuvo menor efecto en la concentración de astaxantina que en la de xantofilas totales. Estos resultados se exponen de manera gráfica en la Figura 50. De los resultados anteriores podemos observar que a medida que se aumenta la concentración inicial de astaxantina añadida en la pasta cárnica aumentaba su concentración final residual después de un periodo de almacenamiento por cinco semanas.

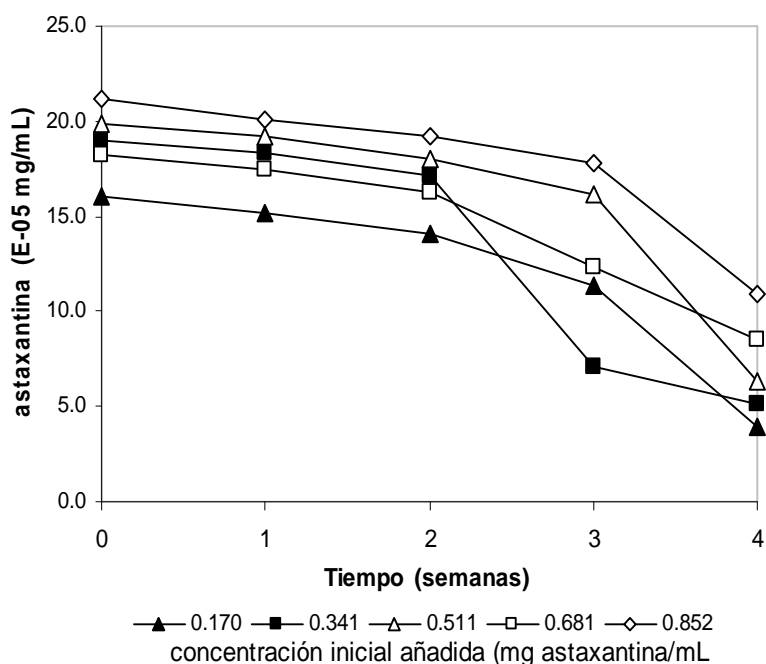


Figura 50. Concentración de astaxantina en la pasta cárnica.

En este sistema cárnico, los componentes del sistema no proporcionaron suficiente protección al pigmento frente a condiciones ambientales (luz, oxígeno), debido principalmente a la naturaleza compleja del sistema. Sin embargo, los resultados indicaron que el tiempo de almacenamiento fue la variable que principalmente afectó la estabilidad del pigmento.

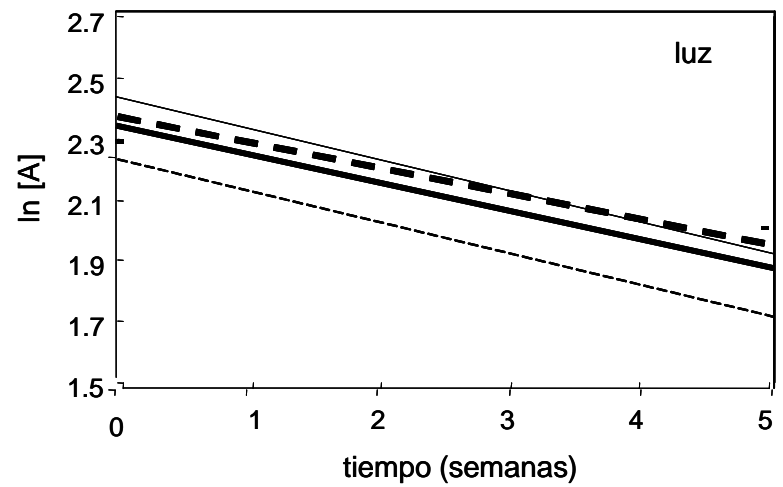
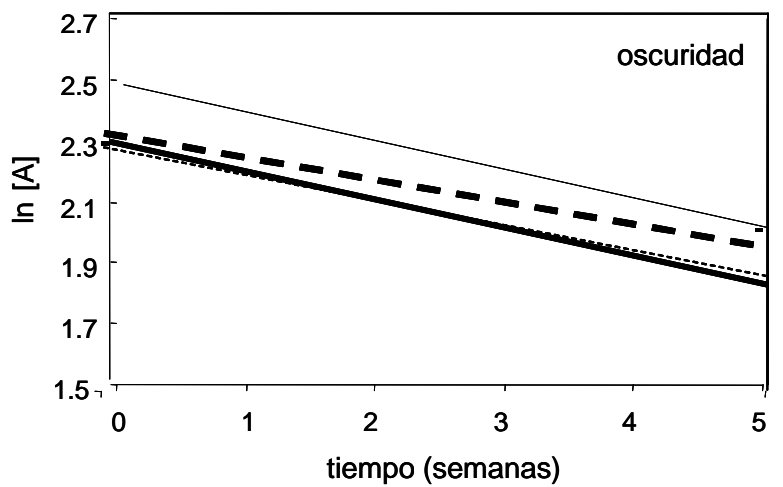
7.3.2. Cinética de degradación del pigmento y sus parámetros

En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron referencias relacionadas con estudios sobre la degradación de astaxantina en desechos de camarón ensilados, sin embargo, en otros carotenoides estudiados se ha reportado que éstos pueden seguir un modelo de primer orden. Galicia y col (2008) reportaron estudios de estabilidad del licopeno en tomate Saladette sujeto a escaldado (tratamiento térmico), extracción del carotenoide y evaluaron la estabilidad del pigmento en soluciones adicionadas con y sin antioxidantes en condiciones de obscuridad a 4, 20 y 60° y bajo luz fluorescente a 20°C durante 30 días. Los resultados indicaron que la degradación del licopeno en solución durante su almacenamiento en obscuridad, en luz fluorescente a diferentes temperaturas siguió una reacción de primer orden. La degradación de astaxantina a través del tiempo siguió un modelo exponencial ajustado por una regresión lineal simple aplicando un logaritmo natural a la función exponencial, según se describe en el inciso 6.3.4. En nuestro estudio, las muestras almacenadas sin-aire/luz/20°C, aire/luz/20°C presentaron los valores más altos para la constante de degradación k (5.51×10^{-02} y 4.76×10^{-02} , días⁻¹ respectivamente). Por consiguiente, estas mismas muestras mostraron los menores valores de vida media ($t^{1/2}$) correspondientes a 12.6 y 14.6 días, respectivamente. En nuestro estudio, k y $t^{1/2}$ fueron significativamente diferentes entre los tratamientos ($P < 0.001$). Asimismo, menores valores de $t^{1/2}$ también fueron observados para muestras almacenadas bajo las siguientes condiciones: aire/obscuridad/4°C y aire/luz/4°C (14.7 y 15.3 días, respectivamente); estos resultados mostraron que el pigmento sufrió degradación en un 50% en las dos primeras semanas de almacenamiento. Los valores de la constante de degradación de astaxantina (k) y $t^{1/2}$ son mostrados en la Tabla 28.

Tabla 28. Cinética de degradación de astaxantina: k, t^{1/2} y R²

Disponibilidad de aire	Iluminación	Temperatura de almacenamiento (°C)	k (días ⁻¹) (x10 ⁻⁰²)	R ²	t ^{1/2}
aire	luz	4	4.54	0.7755	15.3
		20	4.76	0.9136	14.6
	obscuridad	4	4.70	0.7507	14.7
		20	4.23	0.9962	16.4
sin aire	luz	4	4.00	0.9663	17.3
		20	5.51	0.8593	12.6
	obscuridad	4	3.57	0.8179	17.1
		20	4.09	0.8061	16.9

Las muestras bajo condiciones sin aire/luz/20°C resultaron con mayor estabilidad de astaxantina que las almacenadas en aire/luz/20°C posiblemente debido a la poca disponibilidad de oxígeno que afectó mayormente al pigmento. Yuan y Chen (1999) reportaron que aunque los carotenoides con 9 o más dobles enlaces conjugados pueden inactivar ciertas formas reactivas del oxígeno como el oxígeno singulete, su principal papel como pro o antioxidante depende del ambiente óxido-reductor. De manera semejante, las muestras bajo condiciones de aire/obscuridad/4°C fueron mas estables que las almacenadas bajo aire/luz/4°C. La Figura 51 muestra la gráfica ln [A] versus tiempo de degradación de astaxantina. La concentración de astaxantina fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento (P<0.001); su degradación siguió una cinética de primer orden bajo todas las condiciones estudiadas. El pigmento solo fue estable por 17 días cuando fue almacenado en condiciones de aire/refrigeración/obscuridad.



- - - sin aire, 4°C - - - - sin aire, 20°C
 ——— aire, 4°C ——— aire, 20°C

Figura 51. Cinética de degradación de astaxantina.

8. CONCLUSIONES

1. Tomando como criterios de eficiencia de proceso en el ensilado químico la reducción del pH y el rendimiento del pigmento, las mezclas más eficientes fueron ácido fórmico (4%)-ácido acético (4%) y ácido fórmico (4%)-ácido propiónico (4%) (v/p residuo). El material presentó una consistencia semilíquida y agradable olor acidificado al final del tiempo de ensilado.
2. En el ensilado bacteriano, la cepa de *Pediococcus pentosaceus* demostró ser altamente acidificante, logrando disminución gradual del pH en los residuos.
3. En ambos ensilados químico y bacteriano en residuos de *L. aztecus*, las cenizas fueron parcialmente disueltas disminuyendo significativamente con respecto a los residuos frescos ($P < 0.001$). El contenido de proteína disminuyó sin presentar diferencia significativa con respecto al residuo fresco ($P > 0.01$). Los lípidos también disminuyeron significativamente en los ensilados ($P < 0.001$). Estos cambios fueron más notables en el ensilado bacteriano, debido a que durante la fermentación ocurrió mayor solubilización de minerales y a la ocurrencia de actividad enzimática.
4. La secuencia de procesos Centrifugación-Extracción (CE) fue más eficiente en cuanto se obtuvieron mayores rendimientos del pigmento. Con respecto al rendimiento de astaxantina, se encontraron diferencias significativas entre los ensilados químico y bacteriano ($P < 0.001$), así como entre las secuencias de extracción del pigmento ($P < 0.001$).
5. La máxima concentración de xantofilas totales a partir de residuos de *L. aztecus* fue obtenida en ensilado químico bajo la secuencia CE, con un incremento del 30.6 y 23.7% al aplicar las mezclas de ácidos fórmico-acético y fórmico-propiónico, respectivamente, con respecto al residuo fresco ($P > 0.01$). Asimismo, la mayor concentración de astaxantina se obtuvo en el licor del ensilado químico en la secuencia CE ($7.72 \text{ E-}03 \text{ mg/mL licor}$), mientras que se obtuvieron $5.58 \text{ E-}03 \text{ mg/mL licor}$ en el ensilado bacteriano.
6. Durante el ensilado ácido la astaxantina no sufrió oxidación debido al ambiente reductor promovido por los ácidos orgánicos.
7. El incremento en la concentración de xantofilas totales y astaxantina fue debido a que durante el ensilado previo a la extracción del pigmento se produjo una hidrólisis parcial del complejo carotenoproteína liberando los pigmentos carotenoides.

8. Las formulaciones de ácidos seleccionadas en el ensilado químico resultaron eficientes y sin diferencias significativas entre ellas. Por consiguiente, cualquiera de estas pudiera ser utilizada para un ensilado ácido eficiente.
9. Los ensilados químicos y bacterianos de residuos de *L. vannamei* y de *L. aztecus* tuvieron comportamientos similares, aunque variando en cantidades de cenizas, proteína y lípidos en las fracciones, debido posiblemente a variaciones entre especies, como ya se ha reportado en la literatura. Sin embargo, los ensilados desarrollados y descritos en esta tesis tienen validez para ambas especies.
10. La estabilidad de las xantofilas totales en el sistema proteico fue afectada significativamente por la iluminación, la temperatura y la disponibilidad de aire ($P < 0.001$). Sin embargo, estos factores no causaron un efecto significativo en la concentración de astaxantina, con excepción del tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$). En el sistema lipídico, las xantofilas totales fueron significativamente afectadas por la disponibilidad de aire, temperatura y tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$), siendo éste último, el factor que causó mayor efecto. Sin embargo, la concentración de astaxantina solo fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$).
11. Las xantofilas totales y la astaxantina fueron más estables en un sistema lipídico que en un proteico. El aceite de girasol actuó como una buena barrera al oxígeno dando mayor protección al pigmento. Asimismo, el contacto entre las moléculas de astaxantina y los antioxidantes naturales y sintéticos (tocoferoles) del aceite podrían retardar la degradación de astaxantina en este sistema.
12. En la pasta cárnica, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales añadidas tanto en xantofilas totales como en la concentración de astaxantina ($P < 0.001$), así como con respecto al tiempo ($P < 0.001$). La pasta cárnica no proporcionó protección al pigmento; algunos de sus componentes pudieron ejercer un efecto prooxidante, afectando la estructura y consecuentemente la estabilidad del pigmento ya que la concentración de astaxantina fue afectada en la segunda semana de almacenamiento.
13. En el estudio de cinética de degradación, la concentración de astaxantina fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento ($P < 0.001$); su degradación siguió una cinética de primer orden bajo todas las condiciones estudiadas y el pigmento solo fue estable por 17 días cuando fue almacenado en condiciones de aire/refrigeración/obscuridad.

De manera general, el ensilado ácido es un método relativamente económico y simple, puede ser una buena alternativa para la conservación del material y contribuye a disminuir la contaminación ambiental por residuos de camarón. Asimismo, durante el ensilado ácido, las sales de calcio contenidas presentes en los desechos de camarón son disueltas, facilitando el uso de ensilados en las dietas de salmónidos; Además, la astaxantina presentó mayor disponibilidad mejorando el rendimiento en la extracción del pigmento.

En ambos ensilados se observó buena eficiencia en la concentración de astaxantina, observándose mejores resultados en el ensilado químico, aunque éste presenta la desventaja de no ser inocuo, por lo que puede considerarse al ensilado bacteriano como una buena alternativa para la preservación del material. Se concluyó que la astaxantina parecer tener mayor estabilidad en una emulsión lipídica, que en una proteica, no así las xantofilas totales para las cuales se observaron efectos significativos en ambos sistemas modelo.

9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

El ensilado químico utilizando ácidos orgánicos como fórmico, acético y propiónico podría ser una buena alternativa de conservación de materiales biológicos. Sin embargo, es conveniente utilizar mezclas de estos ácidos para hacer más económico y eficiente el proceso de ensilado. Las combinaciones recomendadas son ácidos fórmico-acético y ácidos fórmico-propiónico, debido principalmente a sus valores de pK_a . Es posible estudiar el uso de mezclas entre ácidos inorgánicos y orgánicos para reducir costos, aunque esto implica el manejo de ácidos fuertes (sulfúrico, fosfórico, etcétera).

Se recomienda realizar previamente un análisis microbiológico de los residuos frescos utilizados, con el fin de determinar el tipo y número de microorganismos antes y después del ensilado y corroborar la eficiencia del proceso en la disminución de poblaciones microbianas, principalmente patógenas y alterantes.

Es importante realizar estudios analíticos de los lípidos obtenidos en el licor con respecto al tipo y concentración de ácidos grasos, esterificación y modificación durante el ensilado, ya que es factible que éstos presenten características importantes por tratarse de lípidos marinos.

Se recomienda analizar el grado de hidrólisis de las proteínas durante el proceso de ensilado, y la posible formación de biopéptidos reactivos.

Aunque la astaxantina obtenida desde los ensilados no fue estable en los sistemas proteico y lipídico, estos resultados pudieran ser una referencia para determinar las condiciones óptimas para la estabilidad del pigmento, por lo cual es necesario realizar estudios adicionales de estabilidad del pigmento utilizando otros compuestos que le proporcionen mayor protección a los factores ambientales, tales como almidones, gomas, etcétera. De igual forma, es importante el desarrollo de métodos de protección del pigmento, como la microencapsulación, y obtener un producto adecuado que pueda ser adicionado en las dietas para salmónidos y en alimentos para humanos.

Debido a que la astaxantina ha despertado gran interés por su alto poder antioxidante, sobre todo en suplementos alimenticios, es importante realizar estudios enfocados al consumo humano, empleando solventes GRAS en la extracción de astaxantina. Complemento de estos desarrollos de procesos GRAS, es necesario estudiar el efecto nutricional de la astaxantina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akdes D.H., Sutrisno N.I., Suryadi I. 2007. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil. *Bioresource Technology*. 99(10): 4414-4419.
- Akpan, E.J. 1997. Proximate composition of edible blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Food Science and Technology* 34(1):59-60.
- Almendras F.M., Sabelle M. 1999. Guía práctica: Uso de pigmentos en salmonideos bajo condiciones comerciales. Productos Roche Ltda. Hoffmann-La Roche, Ltd, dep. vitamin nutrition, Basel, Suiza.
- Andrade G. 2000. Los camarones y su importancia en la alimentación. FONAIAPA DIVULGA. No. 65. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Zulia. Estación Local El Lago de Maracaibo. Edo. Zulia, Venezuela.
- Andrewes A.G., Phaff H.J., Starr M.P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15: 1003-1007.
- Arason S. 1994. Production of fish silage. En: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*. Martin A.M. (ed.), Chapman & Hall, Londres, UK.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). 2001. *Official Methods of Analysis*. Washington D.C. USA.
- Arellano L., Carrillo S., Perez-Gil F., Avila E., y Ramos F. 1997. Shrimp head meal utilizarion un broiler feeding. *Poultry Science*. 76 (suppl 1) 85:
- Arias L., De Nogales C., Dueñas P. 1995. *Fundamentos de Acuicultura Marina*. INPA. Bogotá. Colombia. 225 pp
- Armenta-López R. 2002. Obtención de astaxantina a partir de residuos de camarón fermentados. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Armenta-López R., Guerrero-Legarreta I., Huerta S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*. 67(3): 1002-1006.
- Armenta, R.E., Guerrero Legarreta, I. 2008. Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry* 112:310-315.
- Babu C., Chakrabarti R. 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids, *Food Science and Technology*. 41 (2): 227-235.
- Badui D. 2006. En *Química de los Alimentos*. Capitulo 9 Aditivos. Compilador Badui D. Cuarta Edición. Pearson editores. Mexico. D.F. pp 512-513.
- Barnes R. 1984. *Zoología de los Invertebrados*. Interamericana, Saunders College, Filadelfia, USA. pp 1157.

Becerril G.M., Ávila G.E., Vázquez P.C. 1988. Efecto pigmentante de luteína y capsantina en aves. *Síntesis avícola* 6 (26-31).

Belén-Camacho D.R., Moreno-Alvarez M.J., Aleman R., Alvarez F. 2004. Efecto de la temperatura de secado sobre la degradación de carotenoides en frutos de coroba (*Jessenia polycarpa Karst*). *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol.4 (3): 206-210.

Bello R. 1994. Experiencias con el ensilado de pescado en Venezuela. En: Tratamiento y utilización de los residuos de origen animal, pesquero y alimentario en la alimentación animal. Memorias del Taller Regional organizado por el Instituto de Investigaciones Porcinas y la FAO. 5-8 Septiembre. La Habana, Cuba. 1-13.

En: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap1.htm>. Fecha de acceso 10 Enero 2010.

Bennedsen M., Wang X., Willen R., Wadstrom T., Andersen L.P. 2000. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters*. 70: 185-189.

Bjerkeng B., Storebakken Y., Liaaen-Jensen S. 1990. Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*. 91: 153–162.

Bjerkeng B., Storebakken T., Liaaen-Jensen S. 1992. Pigmentation of rainbow trout from feeding to sexual maturation. *Aquaculture*. 108: 333-346.

Bjerkeng B. 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes- recent progress. En: Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cruz-Suárez LE., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A., Civera-Ceredo R. (eds). Mérida, Yucatán. México.

Bjerkeng B., Peisker M., von Schwartzberg K., Ytrestøyl T., Åsgård T. 2007. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture*. 269: 476-489.

Bhaskar N., Suresh P.V., Sajhare P.Z., Sachindra N.M. 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation condition by response surface methodology and effect of optimized condition on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1427-1434.

Britton G. 1996. Carotenoids. En: Natural Food Colorants. Hendry G.A.F., Houghton J.D. (eds.). Blackie Academic and Professional. Londres, UK.

Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 2008. Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Birkhäuser Verlag. Basilea, Suiza.

Cabeza-Herrera E.A. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos starter para la industrial láctea y cárnica. Simposio Regional de Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo. Universidad Libre. Barranquilla, Colombia.

Calvo C. 1999. Uso de los colorantes en el campo de la alimentación. *Alimentos, Equipos y Tecnología*. 3: 79-88.

Cano-López A., Simpson B.K., Haard N.F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *Journal of Food Science*. 52(2): 503-506.

Carranco M.E., Calvo C., Arellano L., Pérez-Gil F., Ávila E., Fuente B. 2003. Inclusión de la harina de cabezas de camarón *Penaeus sp* en raciones para gallinas ponedoras: Efecto sobre la concentración de pigmento rojo de yema y calidad de huevo. *Interciencia*. 28(6), 328-333.

Casaus-Lara P., Hernández P.E., Cintas-Izarrá L.M. 2000. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. No 318: 61-70.

Charley, H. 1987. *Tecnología de Alimentos: procesos químicos y procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos*. Editorial Limusa. México D.F. pp 767.

Cheftel J.C., Cheftel H., Besacon P. 1992. *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*. Volumen II. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. 1989. *Proteínas Alimentarias: lpropiedades, valor nutricional y modificaciones químicas*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 345 pp

Chen H.M., Meyers S.P. 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish using a soy oil process. *Journal of Food Science*. 47: 892-896.

Chen H.M., Meyers S.P. 1982b. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30: 469-473.

Chen H.M., Meyers S.P. 1983. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *Journal of Food Science*. 48: 1516-1521.

Chen X., Chen R., Guo Z., Li C., Li P. 2007. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin, *Food Chemistry*. 101 (4): 1580-1584.

Cifuentes-Lemus J., Torres-García M., Frías M.M. 1997. *El Océano y sus Recursos*. VIII. El aprovechamiento de los recursos del mar. Capítulo XVIII: La industria pesquera. Fondo de Cultura Económica. México D.F.

Cira L.A., Huerta S., Shirai K. 2002. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 1: 45-48

CONAPESCA. 2008. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación (SAGARPA). México.

En: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2008. Fecha de acceso 25 Mayo 2010.

Coward-Kelly G., Agbogbo K.F., Holtzapple T.M. 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*. 97: 1515-1520.

Cremades O., Ponce E., Corpas R., Gutiérrez J.F., Jover M., Alvarez-Osorio M.C., Parrado J., Palomas, J.B. 2001. Processing of crawfish (*Procambarus clarkia*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 49(11): 5466-5472.

Cuca G.M., Avila G.E., Pro M. A.1990. La alimentación de las aves. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. México.

Cunningham F.X., Gantt E. 2005. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. The Plant Journal. 41: 478-492.

Dalzell J.M. 1997. LFRA Ingredients Handbook, Food Colours, Leatherhead Food R.A.

Dass Crispin R. 1999. Importance of selected genera. Starter Cultures. The Heart Research Institute Ltd. Sidney Australia. Academic Press.pp 2095-2100.

Del Río E., Acien F.G., García-Malea M.C., Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M.G. 2005. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalgae *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. Biotechnology and Bioengineering . 91: 808-815.

De la Fuente J., Oyarzún B. 2006. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. Fluid Phase Equilibria. 247(1-2): 90-95.

DeMan J. 1999. Principles of Food Chemistry. Chapman and Hall. Maryland, USA: pp 520.

Diario Oficial de la Federación, 1995. Gobierno Federal. México D.F.

Domínguez A., Fábregas J., Otero A. 2006. Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Boletín de la Sociedad Española de Ficología. 35: 4-8. En: www.sefalgas.org/boletinhtm. Fecha de acceso 4 Febrero 2010.

Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Chidambara N., Ravishankar G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. Trends in Food Science and Technology. 16 (9): 389-406.

FAO. 2006. El Estado Mundial de la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

En: <http://www.fao.org>. Fecha de acceso 5 Diciembre 2009.

FAO. 2009. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. En: <http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/a0699s00.htm>. Fecha de acceso 15 Enero 2010.

Fagbenro, O. A. 1996. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. Food Research International. 29(7): 595-599.

Faid M., Karani H., Elmarrakchi A., Achkari-Begdouri A. 1994. A Biotechnological process for the valorization of fish waste. Bioresource Technology. 49: 237-241

Fang T.J., Wang J. M. 2002. Extractability of astaxanthin in mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. Process Biochemistry. 37: 1235-1245.

Frazier, W.C. 1993. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Edge R., McGarvery D.J., Truscott T.G. 1997. The carotenoids as antioxidants - a review. Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology. 41: 189-200.

- Ernst H. 2002. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure and Applied Chemistry*. 74: 2213-2226.
- Evers D.J., Carroll D.J. 1996. Preservation of crab or shrimp waste as silage for cattle. *Animal Science Feed and Technology*. 59: 233-244.
- Fennema O.R. 1995. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Francis F.J. 1999. *Colorants: Betalains. Practical Guides for the Food Industry*. Eagan Press Handbook Series. American Association of Color Chemist. St. Paul, Minnesota, USA.
- Galicia R.M., Verde R., Ponce E., Gonzalez R.O., Saucedo C., Guerrero I. 2008. Estabilidad de licopeno en tomates cv.saladette (*Lycopersicon esculentum*) sujetos a distintas condiciones de almacenamiento. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7 (3): 253-262.
- García C., Alcalá C. 1998. Composición lipídica de huevos de gallina alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 48: 71-76.
- Gentles A., Haard N.F. 1991. Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray-dried *Phaffia rhodozyma*. *The Progressive Fish-Culturist*. American Fisheries Society. 53: 1-6.
- Gernat A.G. 2001. The effect of using different level of shrimp meal in laying hen diets. *Poultry Science*. 80: 633-636.
- Gibson R., Barker P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. In: Barnes M. (Ed.). *Oceanographic and Marine Biology: an annual review*. Revista 17: 285-346.
- Gildberg A., Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36: 809-812.
- Gimeno M., Ramírez-Hernández J.Y., Martínez-Ibarra C, Pacheco N., García-Arrazola R., Barzana E., Shira, K. 2007. One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(25): 10345-10350.
- Gómez V. 2002. México y sus recursos pequeros ante el Tratado de Libre Comercio. *Boletín Informativo*. México D.F. En: <http://www.ieconomia.gob.mx>. Fecha de acceso 5 enero 2010.
- Guadarrama-Mendoza P.C. 1997. Estudio de Factibilidad Técnica para la Obtención de Pigmentos a partir de Cefalotórax de Camarón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Gallegos A.J., Shirai K., and Guerrero-Legarreta I. 1997. Extracción de pigmentos a partir de cefalotórax de camaron (*Penaeus* sp). *Productos Naturales*. 3: 97-102.
- Goodwin T.W. 1984. *The biochemistry of the carotenoids*. Vol 1. Chapman and Hall. London, UK.
- Guerin M., Huntley M.E., Olaizola M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin. Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21: 210-216.
- Guerrero-Legarreta I., López-Hernandez E. y Armenta-López R. 2006. Pigmentos. En: *Química de los Alimentos*. Badui S. (ed.). Pearson Editorial. México. D.F.

Guerrero-Legarreta, I., Zakaria, Z., Hall, G.M. 1996. Lactic fermentation of prawn waste: comparison of commercial and isolated starter cultures. En: *Advances in Chitin Science: Volume I*. Domard I.A., Jaeuniaux C., Muzzarelli R., Roberts G. (eds.). Editorial Jacques André. Lyon, Francia.

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

Guillou A., Khalil M., Adambounou L. 1995. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*.130: 351-360.

Hall G.M., de Silva S. 1992. Lactic acid fermentation of shrimp (peneaus monodon) waste for chitin recovery. En: *Advances in Chitin and Chitosan*. C.J. Brine, P.A. Sandford y J.P. Zikakis (eds.) Elsevier Applied Sciences. London 633-638.

Hall G.M., Da Silva S. 1994. Shrimp waste ensilation. *Infofish International*. 94: 27-30.

Hagen R.R., Einbu A., Varum K.M. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*. 71 (3): 388-393.

Hannasch K., Nelson C. 1990. Efficacy of liquid Kem glo™ bran in the pigmentation of commercial Atlantic salmon: Field trial in the Bay of Fundy. *Pigmenter Research. Bulletin of Kemira Industries Inc*. 10: 609-614. Des Moines, Iowa, USA.

Hansen M.E., Illanes A. 1984. Applications of crustacean wastes in biotechnology. En: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*. Martin A.M.(ed.).Chapmann & Hall, Londres, UK.

Hayward P.M. 1992. Colorantes. *Tecnología de Alimentos*. 27(4, 5 y 6): 34-43.

Hendry G.A., Houghton J.D. 1996. *Natural Food Colorants*. Blackie Academic and Professional. Londres, UK.

Hernández H. E. 2004. Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y de salvia (*Buddleia perfoliata Kunth*) en una pasta de carne cruda de cerdo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

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

Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M, Arguellez-Monal W. 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*. 56: 41-45.

Hirschberg J. 2001. Production of carotenoids (including the ketocarotenoids astaxanthin and adonixanthin) using a novel carotenoid-secreting bacterial species. En: <http://www.yissu.co./ds11617.htm>. Fecha de acceso 20 Mayo 2009.

Holanda D.H., Neto F.M. 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis, *Journal of Food Science*. 71(5): C298-C303.

Hong H.L., Suo Q.L., Han L.M., Li Ch.P. 2009. Study on precipitation of astaxanthin in supercritical fluid. *Powder Technology*. 191:294-298.

- Horton H., Moran L., Ochs R., Rawn J., Scrimgeour K. 1993. Bioquímica. Prentice-Hall Hispanoamericana. México. D.F.
- Johnson E.A., An G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11(4): 297-326.
- Johnson E.A., Conklin D.E., Lewis M.J. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *Journal of the Fishery Research Board of Canada* 35: 2417-2421.
- Johnson E.A., Villa T.G., Lewis M.J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*. 20: 123-134.
- Johnson E.A. 1989. A pigment source in salmonid feed. *Feed Management*. 40:18-21.
- Johnson E.A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*. 6: 169-174.
- Jorgensen K., Skibsted L.H. 1993. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on atioxidative activity. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung and Forschung*. 196: 423-429.
- Jyonouchi H., Sun S., Iijima K., Gross M.D. 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*. 36: 59-65.
- Kalinowski C.T., Izquierdo M.S., Schuchardt D., Robaina L.E. 2007. Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration, *Aquaculture*. 272 (1-4): 451-457.
- Kamata T., Neamtu G., Tanaka Y., Sameshima M., Simpson K.L. 1990. Utilization of *Adonis aestivalis* as a dietary pigment source for rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Nippon Suisanankakkaishi Bulletin*. 56(5): 783-788.
- Kelley C.E., Harmon A.W. 1972. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. *Fisheries Bulletin*. 70: 111-113.
- Khachik, F., Beecher G., Vanderslice J., Furrow G. 1988. Liquid chromatographic artifacts and peak distortion: sample-solvent interactions in the separation of carotenoids. *Analytical Chemistry*. 60: 807-811.
- Kittikaiwa, P., Powthongsook S., Pasavant P., Shotipruk A. 2007. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement, *Carbohydrate Polymers*. 70: 378-385.
- Krinsky N.I., Johnson E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 26: 459-516.
- Kobayashi M., Sakamoto Y. 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 21: 265-269.
- Kühn R., Sorenson N.A. 1893. Über astaxanthin and ovoerdin. *Ber. Dtsch Chem. Ges.* 71: 1879.

Kurashige M., Okimasu E., Inoue M., Utsumi K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*. 22 (1): 27-38.

Kusdiyantini E., Gaudin P., Goma G., Blanc P.J. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnology Letters*. 20: 929-934.

Lai S.M., Gray J.I., Flegal C.J. 1996. Deposition of carotenoids in eggs from hens fed diets containing saponified and unsaponified oleoresin paprika. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 72: 166-170.

Lares-Velázquez C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*. Universidad de los Andes, Venezuela. 1(2): 15-21.
En: www.saber.ula.ve/avancesenquimica. Fecha de acceso 8 Enero 2010.

Lambertsen G., Braekkan O. R, 1971. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 22 (2): 99-101.

Larpent J.P. 1995. Las bacterias lácticas. En: ICMSF. *Microbiología Alimentaria*. Volumen 2. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Lee J.E., Peniston Q. 1982. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. En: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Martin R., Flick G., Hebard C. (eds). Avi Publishers, Westport, USA.

Lindgren, S., Pleaje, M. 1983. Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 34 (10):1057-1067.

Lotocka M., Styczynska-Jurewicz E. 2001. Astaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin esters in the copepod *Acartia bifilosa* (Copepoda, Calanoida) during ontogenetic development. *Oceanologia*. 43(4): 487-497.

Liu X., Osawa T. 2007. *Cis*-astaxanthin, and especially 9-*cis* astaxanthin, exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-*trans* isomer. *Biochemical and Biophysical Communications*. 357: 187-193. En: www.elsevier.com. Fecha de acceso 14 Mayo 2009.

Llanez-Iglesias J., Toledo-Pérez J., Valdés-Fernández I., Lazo de la Vega J. 2007. Estudio del ensilado biológico de pescado como inóculo de bacterias lácticas en la conservación de desechos pesqueros. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 8(9), 1-6.
En: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090724.pdf>. Fecha de acceso 21 Mayo 2009.

Lorenz T. 1999. NatuRose®. Natural Astaxanthin (*Haematococcus* algae meal) as a carotenoid and vitamin source for salmonids. Technical Bulletin. Cyanotech Corporation. Honolulu, Hawaii. 55: 7-9.

Lorenz R.T, Cysewski G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 18(4): 160–167.

Luna R.A. 2003. Extracción con lípidos de los pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su evaluación como ingrediente de dietas en larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mayne S.T., Janerich D.T., Greenwald P., Chorost S., Tucci C., Zaman M.B., Melamed R., McKneally M.F. 1994. Dietary beta-carotene and lung cancer risk in U.S. nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute* 86(1): 33-38.

Majeti N.V, Kumar, R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional Polymers*. 46: 1-27.

Markovits A. 1991. *Adonis*: Potencial fuente vegetal de astaxantina. *Revista Tecnología de Alimentos*. Chile Pesquero. 16 (5): 49-52.

Mateos G.G., Rebollar P.G.y Medel P. 1996. Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas. XII Curso de especialización FEDNA (Normas para la formulación de piensos compuestos. Valor nutritivo de grasas y aceites. Madrid 7 y 8 de Noviembre.

Meléndez-Martínez J., Vicario I.M., Heredia F.J. 2004. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, España.

Meyers S., Bligh D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29(3): 505-508.

Meyers P.S., Benjamin G. 1987. Feeding values of crustacean wastes can be improved through proper ensilage treatment. *Aquaculture Magazine*. 59:12-13.

Miki W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 63: 141-146.

Mordi R.C., Walton J.C., Burton G.W, Hughes L., Ingold K U., Lyndsday D.A., Moffatt D.J. 1993. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron Letters*. 49: 911-928.

Moreno-Álvarez M.J., Gómez C., Mendoza J., Belén D. 1999. Carotenoides totales en cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L. var. *Valencia*). Serie Revista Unellez de Ciencia y Tecnología. Caracas, Venezuela. 17: 92-99.

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

Nageswara R., Naseeruddin A., Nageswara B. 2005. Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1076: 189-192.

Neiva V.H. 1986. Introducción a la Tecnología de Productos Pesqueros. Compañía Editorial Continental. México D.F.

Niamnuy C., Devahastin S., Soponronnarit G.S., Raghavan V. 2008. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *Journal of Food Engineering*. 87: 591-600.

- Nishigaki I., Dimitriovskii A.A., Miki W., Yagi K. 1994. Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 16: 161-166.
- Nishino, H. 1997. Cancer prevention by natural carotenoids. *Journal of Cellular Biochemistry*. 67 (S27): 86-91.
- Nishino H., Murakoshi M., Xiao Y.M., Wada S., Masuda M., Ohsaka Y., Satomo Y., Jinno K. 2005. Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology*. 69: 38-40.
- Nizu P.Y., Rodriguez-Amaya D. 2005. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus L.* as Rich sources of lutein. *Journal of Food Science*. 70 (9): S605-S609.
- No H.K., Meyers P.S., Lee S.K. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 37(3): 575-579.
- No H.K., Storebakken T. 1991. Color stability of rainbow trout fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*. 56: 969-984.
- Noonan J.E., Meggos H. 1980. Synthetic food colours. En: *CRC Handbook of Food Additives*. Volumen II. Thomas E. Furia (ed.). CRC Press. Columbia, Missouri, USA. pp 424.
- Okada S., Nur-E-Borhan S.A., Yamaguchi K. 1994. Carotenoid composition in the exoskeleton of commercial black tiger prawns. *Fisheries Science*. 60: 213-215.
- Olaizola M., Huntley M.E. 2003. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. En: Fingerman M., Nagabhushanam R. (eds.). *Biomaterials and Bioprocessing*. Enfield Science Publishers. USA. 1:143-164.
- Oliveira J.M., Oliveira E. 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) feed. *Bioresource Technology*. 98: 602-606.
- Olsen R. L., Johansen A., Myrnes B. 1990. Recovery of enzymes from shrimp waste. *Process Biochemistry*. 25: 67-68.
- Olsen R.L., Jacobsen T. 1995. Characterization of flash-dried shrimp processing waste. *Journal of Marine Biotechnology*. 3: 208-209.
- Omara-Alwala, T., Chen, H.M., Ito, Y., Simpson, K.L., Meyers, S.P. 1985. Carotenoid pigment and fatty acid analysis of crawfish oil extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 33(2): 260-263.
- Oshima, T. 1998. Recovery and use of nutraceutical products from marine resources. *Food Technology* 52(6):50-54.
- Pacheco N., Garnica-González M., Ramírez-Hernández J., Flores-Albino, Gimeno M., Barzana E. Shirai K. 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 100: 2849-2854.
En: <http://www.elsevier.com/locate/biortech>. Fecha de acceso 25 Agosto 2010.
- Padrón C., Moreno-Alvarez M. 1999. Extracción de colorantes de cáscaras de naranjas (*Citrus sinensis L.*) por métodos no convencionales y su utilización para fortificar color en naranjadas. *Revista Unellez Ciencia y Tecnología*. 17: 125-140.

Palozza P., Krinsky N.I. 1992. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. *Methods in Enzymology*. 213: 403-420.

Parisi V., Tedeschi M., Gallinaro G., Varano M., Saviano S., Piermarocchi S. 2008. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy Italian study. Multifocal Electroretinogram Modifications after 1 year. *Ophthalmology*. 1: 324-333.

Pashkow F.J., Watumull D.F., Campbell C.L. 2008. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 101(10) Supplement 1: S58-S68.

Pearson A.M., Tauber F.W. 1984. *Processed Meats*. AVI Publishing Co. Westport, Connecticut pp19-39 y 351-353.

Pérez Chabela, M.L., Aquiahuatl, M.A. 2004. *Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. D.F.

Placencia-Jatomea M., Olvera-Novoa M., Arredondo-Figueroa J.L., Hall G.M., Shirai K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(7): 753-759.

Ponce-Palafox J.T., Arredondo F.J., Vernon E.J. 2004. Pigmentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) con carotenoides de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en comparación con la astaxantina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3: 219-225.

Putnam M. 1991. A review of the nature, function, variability and supply of pigments in salmonid fish. En: *Aquaculture and the Environment*. De Pauw N., Joyce J. (eds.). European Aquaculture Society Special Publication. Gante, Bélgica.

Raa J., Gildberg A. 1977. Properties of a propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28 (7): 647-653.

Raa J., Gildberg A. 1982. Fish silage: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 16: 383-420.

Ramírez-Córdova J.J. 2000. Generación de productos con alto valor agregado a partir de la levadura *Phaffia rhodozyma* mediante un proceso de producción de astaxantina. Grupo piloto. Avance última milla. Proyecto CONACYT. México D.F.

Rivas-Vega M.E., Rouzaud-Sandez O., Martínez-Córdoba L.R., Ezquerro-Bauer J.M. 2001. Effect of feed protein levels on digestive proteolytic activity, texture, and thermal denaturation of muscle protein in reared blue shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 10: 25-38.

Rodríguez-Amaya D. 1999a. Carotenoides y preparación de alimentos. La retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. OMNI Edition. Departamento de Ciencia de Alimentos. Universidad de Campinas. Brasil.

Rodríguez-Amaya D. 1999b. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 49(3,supl.1): 38S-47S.

Rodríguez-Amaya D. 2001. *A Guide to Carotenoids Analysis in Foods*. Departamento Ciencia de los Alimentos. Human Nutrition Institute. ILSI Press. Washington D.C., USA.

- Rodríguez M.M. 2002. El color en los alimentos. Diario de la Seguridad Alimentaria. En: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/10/09/3639>. Fecha de acceso 15 Abril 2009.
- Rouvinen K. 2001. Feeding fish silage to fur bearers. Department of Agriculture and Fisheries. Nova Scotia Agricultural College. Nueva Escocia, Canadá.
- SAGARPA. 2008. Anuario Estadístico de Pesca. México D.F. En: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2008>. Fecha de acceso 18 Noviembre 2010.
- Schiedt K., Liaaen-Jensen S. 1995. Isolation and analysis. En: Carotenoids. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Birkhauser Verlag. Basilea, Suiza.
- Sachindra N.M., Mahendrakar N.S. 2005a. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*. 96: 1195-1200.
- Sachindra N.M., Bhaskar N., Mahendrakar N.S. 2005b. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 167-172.
- Sachinda N.M., Bhaskar N., Mahendrakar N.S. 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*. 26: 1092-1098.
- Sachindra N.M., Bhaskar N., Siddegowda G.S., Sathisha A.D., Suresh P.V. 2007. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*. 98: 1642-1646.
- SAS. Statistical Analysis System Institute. 2002. Manual del usuario del software para windows version 1995. Cary. Carolina del Norte, USA.
- Shahidi F. 1994. Seafood processing by-products, En: *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality*. Shahidi F., Botta J.R. (eds.). Chapman and Hall. Nueva York, USA.
- Santocono M., Zurria M., Berretini M., Fedeli D., Falcioni G. 2007. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 88: 1-10.
- Saxelin U., Grenov B., Svensson U., Fondé R., Reniero R., Mattila-Sandholm. 1999. The Technology of Probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 387-392.
- Shahidi, F., Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39: 1527-1532.
- Shahidi F., Metusalach G., Brown J.A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. CRC. 38 (1): 1-67.
- Shirai K., Guerrero-Legarreta I., Hall M.G. 1996. La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Revista Ciencia*. 47: 317-328. México D.F.
- Shirai K., Guerrero-Legarreta I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., González R.O., Hall G.M. 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microbial Technology*. 28: 446-452.

- Shimidzu N., Goto M., Miki W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*. 62: 134-137.
- Simpson B.K., Dauphin L., Smith J.P. 1992. Recovery and characterization of carotenoprotein from lobster (*Homarus americanus*) waste. *Journal of Aquatic Food Technology*. 1: 129-146.
- Skoog D., Holler J., Nieman T. 2000. *Principios de análisis instrumental*. McGraw Hill. Madrid, España.
- Sorella K., Speck M.L. 1970. Inhibition of *Salmonella galinarum* by culture filtrate of *Leuconostoc citrovrum*. *J. Dairy Sci.* 53: 239-241 citado en Llanez-Iglesias J., Toledo-Pérez J., Valdés-Fernández I., Lazo de la Vega J. 2007. Estudio del ensilado biológico de pescado como inóculo de bacterias lácticas en la conservación de desechos pesqueros. *Revista Electrónica de Veterinaria* 8(9): 1-6.
- Stahl W., Sies H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*. 24: 345-351.
- Steel R.G., Torrie J.H. 1997. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill. Bogotá, Colombia.
- Su Q., Rowley K.G., Balazs D.H. 2002. Carotenoids Review: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*. 781: 393-418.
- Tafoya A., García H.A. 1993. Colorantes. En: *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa. México D.F.
- Tangerás A., Slinde E. 1994. Coloring of salmonids in aquaculture: the yeast *Phaffia rhodozyma* as a source of astaxanthin. En: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*,. Martin, A.M. (ed.). Chapman & Hall, Londres, UK.
- Tanaka T., Makita H., Ohnishi M., Mori H., Satoh K., Hara A. 1995. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Research*. 55: 4059-4064.
- Toledo P.J., Llanes I. J. 2007. Estudio comparativo de los desechos de pescado ensilados por vías bioquímica y biológica. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET VIII (9): 1-7*. En: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090727.pdf>. Fecha de acceso 21 Mayo 2009.
- Topisirovic L., Kojic M., FiraD., Golic N., Strahinic I., Lozo J. 2006. Potential of lactic bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 112 (3): 230-235.
- Torrissen O J., Tideman E., Hansen F., Raa J. 1981. Ensilage in Acid. A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigments by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 26: 77-83.
- Torrissen O.J. 1985. Pigmentation of salmonids: interaction of astaxanthin and cantaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture*. 49: 363–374.

Torrissen O.J. Hardy R.W., Shearer, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids: carotenoid deposition and metabolism. *CRC Critical Reviews in Aquaculture Science*. 1: 209–225.

Torrissen O.J., Ingebrigten K. 1992. Tissue distribution of *cis*-astaxanthin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 108: 381-386.

Tso M., Lam T.T. 1996. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage. U.S. Patent 5: 527,536.

Turujman S.A., Wamer W.G., Wei R.R. 1997. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. U.S. Food and Drug Administration, Office of Cosmetics and Colors. *Journal of AOAC International*. Washington, DC. USA. 80: 622–632.

Vidoiti R.M, Carneiro D.J. Macedo V.e. 2002. Acid and fermented silage characterization and determination of Apparent digestibility coefficient of crude protein for Pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(1): 57-62.

Visser H., van Ooyen J.J., Verdoes J.C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrohous*. *FEMS Yeast Research*. 4:221-231.

Vizcarra-Magaña L., Avila E., 1999. Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:1915-1922.

Wang X., Hirno S., Willen R., Wadstrom T. 2001. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALb/cA mouse model. *Journal of Medical Microbiology*. 50: 430-435.

White D.A., Page G.I., Swaile J., Moody A.J., Davies S.J. 2002. Effect of esterification on the absorption of astaxanthin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 33: 343-350.

Wilches A.F 2005. Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacaridos (EPS). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. Universidad de Pamplona. Bucaramanga, Colombia. 3(2): 12-18.

Wilson, P.D., Wilson, D.R., Waspe C.R. 2000. Weak acids: dissociation in complex buffering systems and partitioning into oils. *Society of Chemical Industry. Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:471-476.

Winter K.A., Feltham, L.A.W. 1983. Fish silage. The protein solution. *Agriculture Canada Research Branch*. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.

Yamane Y., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. 1997. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnology Letters*. 19: 1109-11.

Yong Y.R., Lee Y.K. 1991. A possible role of photoprotection for secondary carotenoids in the cytoplasm of the green alga *Haematococcus lacustris* (Chl. Rophyta). *Phycologia*. 30: 257-261

Yuan J.P., Chen F. 1999. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers on organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3656-3660.

Yuan J.P., Chen F, 2000. Purification of *trans*-astaxanthin from high-yielding astaxanthin ester producing strain of the micoralga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*. 68: 443-488.

Zdzislaw E. Sikorski and Adrian Ruitter 1994. Changes in proteins and nonprotein nitrogen compounds in cured, fermented and dried seafoods: in *Seafood Proteins*. Chapman&Hall.

Zeigler R. 1989. A review of the epidemiological evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *The Journal of Nutrition*. 119 (1): 116.122.

A N E X O S

Anexo 1. ANOVA. Ensilado químico de *L. aztecus*

Secuencia de proceso	Variable de Respuesta	gl	Error MC	P> modelo	R ²	CV
Extracción-Centrifugación EC	pH	12	0.00481	0.0001	0.9992	1.1834
	Humedad	12	0.1018	0.0001	0.996	1.3712
	Cenizas	12	8.9208	0.0166	0.6466	8.3413
	Proteína	16	6.2471	0.0001	0.9724	9.4058
	Lípidos	16	0.0426	0.0001	0.994	8.3477
	xantofilas	12	1923.84	0.0001	0.9633	13.7264
Centrifugación-Extracción CE	pH	16	0.00585	0.0001	0.9988	1.405
	Humedad	12	1.1560	0.0001	0.9561	1.4265
	Cenizas	12	3.036	0.0001	0.9377	5.2531
	Proteínas	20	2.649	0.0001	0.9912	7.6805
	Lípidos	16	0.3286	0.0001	0.9359	15.6668
	Xantofilas	8	1767.53	0.0001	0.9112	7.155

Anexo 2. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado químico en *L. aztecus*.

Bloque principal Secuencia de proceso	Sub-bloque Fracción	Combinación de ácidos	Variables de respuesta: valor medio*					
			pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Xantofilas
Extracción- centrifugación	Residuo Fresco	FA	8.83 A	76.83 B	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Residuo Fresco	FP	8.77 A	76.83 B	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Ensilado	FA	4.46 B	77.96 A,B	37.23 B	35.58 A	1.70 C	na
	Ensilado	FP	4.34 B	78.79 A	34.42 B	35.07 A	2.10 B	na
	Residuo Sólido	FA	4.45 B	46.80 D	30.07 B	29.46 B	0.10 E	na
	Residuo Sólido	FP	4.34 B	56.97 C	34.28 A,B	30.07 B	0.60 D	na
	Licor	FA	4.45 B	na	na	6.11 C	1.60 C	27.45 B
	Licor	FP	4.33 B	na	na	5.00 C	1.50 C	25.88 B
Centrifugación- Extracción	Residuo Fresco	FA	8.67 A	76.83 B	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Residuo Fresco	FP	8.61 A	76.83 B	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Ensilado	FA	4.28 D,E	79.60 A	34.39 B	34.14 A	4.92 D	na
	Ensilado	FP	4.40 C,D	79.40 A	33.66 B	34.05 A	3.62 D	na
	Residuo Sólido	FA	4.63 B	69.90 C	25.03 C	27.58 B	1.37 B	na
	Residuo Sólido	FP	4.44 C	69.66 C	27.12 C	27.85 B	1.84 B	na
	Lo	FA	4.40 C,D	na	na	6.56 C	3.55 D	na
	Lo	FP	4.20 E	na	na	6.20 C	1.78 C	na
	Licor final	FA	na	na	na	2.17 D	na	34.79 B
	Licor final	FP	na	na	na	2.06 D	na	32.94 B

*letras iguales indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

Anexo 3. ANOVA. Ensilado bacteriano en *L. aztecus*.

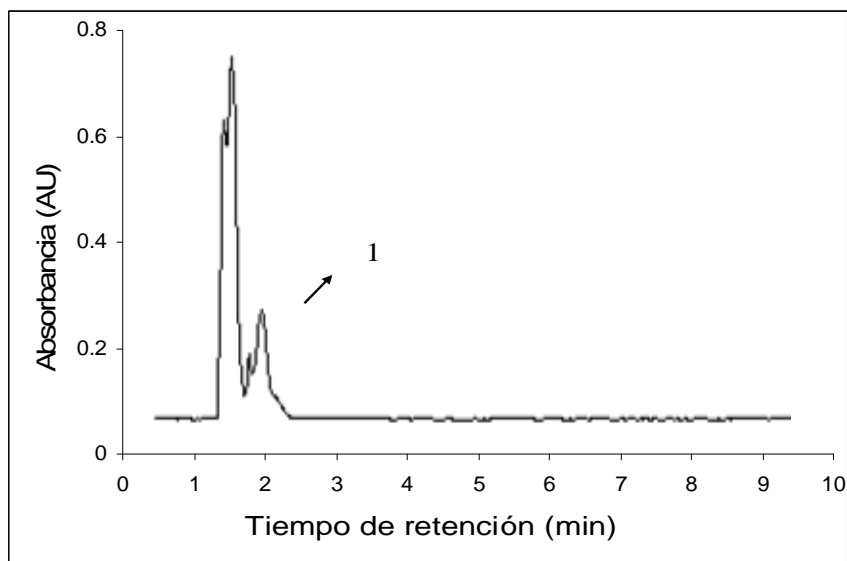
Bloque principal	Sub-bloque	Variable de respuesta	Error					
			gl	MC	P> Modelo	R ²	CV	
Extracción-Centrifugación	Materia prima Ensilado Residuo sólido licor	pH	8	0.00106	0.0001	0.9996	0.5463	
		Proteínas	8	4.532	0.0001	0.9804	8.872	
		Lípidos	8	0.5924	0.0001	0.9206	31.225	
		Xantofilas	8	1853.37	0.0004	0.9235	13.4727	
	Materia prima Ensilado Residuo sólido	Humedad	6	2.0293	0.0053	0.8258	1.8581	
		Cenizas	6	4.2809	0.0004	0.9245	6.660	
	Centrifugación-Extracción	Materia prima Ensilado Resido sólido Licor	pH	8	0.00285	0.0001	0.9991	0.895
		Materia prima Ensilado Residuo sólido Licor (Lo2) Licor	Proteínas	10	2.2797	0.0001	0.9925	7.637
		Materia prima Ensilado Resido sólido Licor (Lo2)	Lípidos	8	0.6428	0.0001	0.8561	17.654
		Materia Prima Licor	Xantofilas	4	14518.79	0.0476	0.6659	19.490
Materia prima Ensilado Licor		Humedad	6	0.4826	0.0001	0.9792	0.9613	
		Cenizas	6	2.6718	0.0001	0.9490	5.223	

Anexo 4. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado bacteriano en *L. aztecus*

Bloque principal Secuencia de proceso	Sub-bloque Fracción	Variables de respuesta: valor medio*					
		pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Xantofilas
Extracción- Centrifugación	Residuo fresco	8.52 A	76.83 A	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Ensilado	5.15 B	73.50 B	27.25 B	33.17 A	1.88 B	na
	Resido sólido	5.12 B	69.70 C	26.52 B	26.79 B	0.68 B	na
	Licor	5.10 B	na	na	7.38 C	1.20 B	25.68 B
Centrifugación- Extracción	Materia prima	8.50 A	76.83 A	39.42 A	35.65 A	6.10 A	22.63 A
	Ensilado	5.13 B	72.70 B	27.63 B	33.61 A	6.03 A	na
	Resido sólido	5.12 B	67.30 C	26.83 C	27.37 B	2.35 B	na
	Licor de centrifugación	na	na	na	6.24 C	3.68 B	na
	Licor final	na	na	na	1.96 D	na	31.82 B

*letras iguales indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

Anexo 5. Cromatograma del estándar de astaxantina



Anexo 6. Análisis cuantitativo de astaxantina y astaceno en los ensilados químico y bacteriano en *L. aztecus*.

Ensilado	Secuencia de Extracción	Fracción	Análisis por HPLC		
			Xantofilas mg/Kg	Astaxantina mg/mL Licor	Astaceno mg/mL licor
	Extracción-Centrifugación				
Químico	Fórmico-Acético	Licor	27.45	2.1934 E-02	3.735 E-05
	Fórmico-Propiónico	Licor	25.88	1.9899 E-02	0
	Centrifugación-Extracción				
		Licor	34.79	4.0106 E-02	0
	Fórmico-Acético	Licor	32.94	3.5632 E-02	2.833 E-05
	Fórmico-Propiónico				
Bacteriano	Centrifugación-Extracción	Licor	25.68	1.6993 E-02	0
	Extracción-Centrifugación	Licor	31.82	2.7350 E-02	4.05 E-05

Anexo 7. ANOVA. Ensilado químico de *L. vannamei*.

Secuencia de proceso	Variable de Respuesta	gl	Error MC	P> modelo	R ²	CV
Extracción-Centrifugación EC	pH	10	0.00481	0.0001	0.9592	1.1294
	Humedad	11	0.1018	0.0001	0.9666	1.9871
	Cenizas	12	8.9208	0.0166	0.8416	7.3499
	Proteína	14	6.2471	0.0001	0.9899	8.4285
	Lípidos	16	0.0426	0.0001	0.9940	7.7874
	xantofilas	10	1923.84	0.0001	0.9777	14.8367
Centrifugación-Extracción CE	pH	14	0.00585	0.0001	0.9912	1.4960
	Humedad	14	1.1560	0.0001	0.9731	1.1298
	Cenizas	13	3.036	0.0001	0.9587	6.3245
	Proteínas	18	2.649	0.0001	0.9865	8.9805
	Lípidos	16	0.3286	0.0001	0.9234	14.1368
	Xantofilas	9	1767.53	0.0001	0.9487	9.7585

Anexo 8. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado químico de *L. vannamei*

Bloque principal	Sub-bloque	Formulación de ácidos	Variables de respuesta: valor promedio*					
			pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Xantofilas
Extracción-centrifugación	Residuo Fresco	FA	7.98A	78.6 B	19.15 A	44.95 A	9.96 A	36.17 A
	Ensilado	FA	3.5 C	79.7A	14.71 B	44.19 B	5.12 B	na
	Residuo Sólido	FA	5.77 B	53.03 C	6.45 C	32.69 C	1.38 C	na
	Licor	FA	3.9 C	na	na	10.2 C	3.74 C	45.09 B
Centrifugación-Extracción	Residuo Fresco	FA	7.98 A	78.6 B	19.15 A	44.95 A	9.76 A	36.17 A
	Ensilado	FA	3.44 C	79.60 A	16.23 B	43.06 A	6.26 B	na
	Residuo Sólido	FA	6.39 A	73.7 C	11.40 C	40.79 B	1.71 C	na
	L centrifugacion	FA	5.33 B	na	na	2.27C	3.55 D	na
	L final	FA	4.10 B	na	na	na	na	54.2 B

* letras iguales indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)
na= no analizado

Anexo 9. ANOVA. Ensilado bacteriano de *L. vannamei*

Bloque principal Secuencia de proceso	Sub-bloque Fracciones	Variable de respuesta	Error		P> Modelo	R ²	CV
			gl	MC			
Extracción-Centrifugación	Materia prima	pH	7	0.0011	0.0001	0.9885	0.5065
	Ensilado	Proteínas	8	3.5432	0.0001	0.9840	7.814
	Residuo sólido	Lípidos	9	0.6914	0.0001	0.9111	30.115
	licor	Xantofilas	8	1553.3	0.0004	0.9023	12.4717
	Materia prima	Humedad	7	2.3498	0.0053	0.8158	1.5881
	Ensilado	Cenizas	6	4.1399	0.0004	0.9034	6.589
Centrifugación-Extracción	Residuo sólido	pH	8	0.0019	0.0001	0.9789	0.905
	Licor (Lo2)						
	Materia prima						
	Ensilado	Proteínas	9	2.2797	0.0001	0.9814	7.628
	Residuo sólido						
	Licor (Lo)						
	Licor (final)						
	Materia prima	Lípidos	7	0.621	0.0001	0.9331	15.634
Ensilado							
Residuo sólido							
Licor (Lo2)							
Materia Prima	Xantofilas	5	1251.7	0.0476	0.7939	17.297	
Licor (LR2)							
Materia prima	Humedad	8	0.5822	0.0001	0.9745	0.9219	
Ensilado							
Licor final	Cenizas	7	2.6908	0.0001	0.9699	6.212	

Anexo 10. Modelo 1. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado bacteriano de *L. vannamei*

Bloque principal	Sub-bloque	Variables de respuesta: valor promedio*					
Secuencia de proceso	Fracción	pH	Proteínas	Lípidos	Humedad	Cenizas	Xantofilas
Extracción- Centrifugación	Residuo fresco	7.98 A	44.95 A	9.96 A	78.6 A	19.15 A	36.17 A
	Ensilado	4.45 C	42.12 B	6.76 B	73.50 B	13.83 B	na
	Resido sólido	6.19 B	31.15 B	2.10 D	54.55C	11.74 B	na
	Licor	4.99 D	10.97 C	4.66 C	na	na	40.88 B
Centrifugación- Extracción	Residuo fresco	7.98 A	44.95 A	9.96 A	78.6 B	19.15 A	36.17 A
	Ensilado	4.33 B	43.95 B	7.02 B	75.3 A	15.42 B	na
	Resido sólido	5.12 B	35.40C	2.95 D	67.5 C	10.75 C	na
	Licor	0.11 B	8.05 D	5.07 C	na	na	na
	Licor final		na.	na	na	na	46.56 B

*letras iguales indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

Bloque principal	Sub-bloque	Variables de respuesta						
		Fración	Secuencia de proceso	pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos
Ensilado	EC		3.5 C	79.7 A	14.71 A	44.19 A	9.96 B	36.17 A
	CE		3.44 C	79.6 A	16.23 B	43.06 A	6.26 B	
Residuo sólido	EC		5.77 B	53.03 C	6.45 C	32.69 C	1.38 C	
	CE		6.39 A	73.7 C	11.40 C	40.79 B	1.71 C	
Licor	EC		3.9 C	na	na	11.54 C	3.74 C	45.09 B
	CE		5.33 B	na	na	2.27C	3.55 D	54.2 C

Anexo 11. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado químico de *L. vannamei*.

Anexo 12. Comparación múltiple de medias de Duncan. Ensilado bacteriano de *L. vannamei*

Bloque principal	Subbloque	Variables de respuesta						
		Fración	Secuencia de proceso	pH	Humedad	Cenizas	Proteínas	Lípidos
Ensilado	EC		4.17 C	73.5 A	13.83 B	42.12 A	6.76 B	36.17 A
	CE		4.20 C	75.3 A	15.42 B	43.45 B	7.02 B	
Residuo sólido	EC		5.19 B	54.55C	11.74 B	31.15 B	2.1 D	
	CE		5.12 B	67.5 B	10.75 C	35.40C	2.95 D	
Licor	EC		3.9 C	na	na	10.97 C	4.66 C	40.88 B
	CE		4.33 B	na	na	8.05 D	5.07 C	46.56 C

Anexo 13. Análisis cuantitativo de xantofilas, astaxantina y astaceno en los ensilados químico y bacteriano de *L. vannamei*.

Ensilado	Secuencia de Extracción	Fracción	Análisis por HPLC		
			Xantofilas mg/mL	Astaxantina mg/mL Licor	Astaceno mg/mL licor
Químico	Extracción-Centrifugación Fórmico-Acético	Licor	45.09	3.2370 E-03	6.085 E-06
	Centrifugación-Extracción Fórmico-Acético	Licor	54.20	7.7160 E-03	7.570 E-06
Bacteriano	Extracción-Centrifugación	Licor	40.88	3.2340 E-03	0
	Centrifugación-Extracción	Licor	46.56	5.3830 E-03	0

Anexo 14. ANOVA. Estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en el sistema Proteína-pigmento.

Variable de Respuesta	Error		P> modelo	R ²	CV
	gl	MC			
Xantofilas	69	2173.469	<0.0001	0.99.9	4.8608
Astaxantina	69	0.00002765	<0.0001	0.5318	18.860

Anexo 15. Valores de probabilidad de fuentes de variación e interacciones en la concentración de xantofilas totales y astaxantina en proteína-pigmento

Fuente de variación	P>	
	Xantofilas totales	astaxantina
Aire	<0.0001	0.5864
Temperatura	<0.0001	0.3990
Iluminación	<0.0001	0.1080
Tiempo	<0.0001	<0.0001
Aire x temperatura	0.0014	0.8891
Aire x iluminación	0.6606	0.4032
Aire x tiempo	<0.0001	0.1640
Temperatura x iluminación	0.0003	0.1376
Temperatura x tiempo	<0.0001	0.0562
Iluminación x tiempo	0.0374	0.0373

Anexo 16. Comparación múltiple de medias de Duncan. Estabilidad de pigmentos en el sistema proteína-pigmento.

	Valores medios*					
	Disponibilidad de Aire		Temperatura (°C)		Iluminación	
	Sin	Con	4	20	Luz	oscuridad
Xantofilas ¹	343.996 B	385.473 A	414.97A	314.497 B	392.014 A	337.456 B
Astaxantina ²	0.01574 A	0.01633 A	0.0155 A	0.016494 A	0.01691 A	0.01516 A

	Tiempo (semanas)					
	0	1	2	3	4	5
Xantofilas ¹	821.10 A	430.85 B	366.32 C	274.56 D	187.69 E	107.90 F
Astaxantina ²	0.04988 A	0.015310 B	0.009156 C	0.0800 C	0.007219C	0.006656 C

* letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

¹ mg /kg

² E-02 mg /100 mL

Anexo 17. ANOVA. Estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en el sistema aceite- pigmento.

Variable de Respuesta	Error		P> modelo	R ²	CV
	gl	MC			
Xantofilas	69	71.522	0.0001	0.7569	4.860
Astaxantina	69	0.000054	0.0001	0.5399	18.860

Anexo 18. Valores de probabilidad de fuentes de variación e interacciones en la concentración de xantofilas totales y astaxantina en aceite-pigmento.

Fuente de variación	P>	
	Xantofilas totales	astaxantina
Aire	0.0043	0.1371
Temperatura	0.0157	0.9672
Iluminación	0.1384	0.8513
Tiempo	<0.0001	<0.0001
Aire x temperatura	0.8374	0.0619
Aire x iluminación	0.007	0.1197
Aire x tiempo	0.0003	0.9959
Temperatura x iluminación	0.7135	0.0016
Temperatura x tiempo	0.4056	0.8314
Iluminación x tiempo	0.5391	0.3903

Anexo 19. Comparación múltiple de medias de Duncan para xantofilas totales y astaxantina en sistema Aceite-pigmento.

	Valores medios*					
	Disponibilidad de Aire		Temperatura (°C)		Iluminación	
	Sin	Con	4	20	Luz	Oscuridad
Xantofilas ¹	176.53 A	171.43 B	171.88B	176.12 A	175.27A	172.69A
Astaxantina ²	0.04044 A	0.0381A	0.0392A	0.0393A	0.0394A	0.0391A

	Tiempo (semanas)					
	0	1	2	3	4	5
Xantofilas ¹	191.33 A	181.65 B	176.105 B, C	171.39 C	164.41 D	159.00 D
Astaxantina ²	0.0489 A	0.435 B	0.0395 B,C	0.0365 C,D	0.0342 C,D	0.0329 D

*letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

¹ mg /kg

² E-02 mg /100 mL

Anexo 20. ANOVA. Estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en una pasta cárnica modelo.

Variable de Respuesta	gl	Error MC	P> modelo	R ²	CV
Xantofilas	12	1.551E-10	0.0002	0.8650	21.5765
Astaxantina	12	4.24E-06	<0.0001	0.9083	14.7978

Anexo 21. Valores de probabilidad de fuentes de variación en la concentración de xantofilas totales y astaxantina en una pasta cárnica modelo.

Fuente de variación	Xantofilas totales	P> astaxantina
Concentración inicial añadida	0.0016	0.0163
Tiempo	0.0003	<0.0001

Anexo 22. Comparación múltiple de medias de Duncan. Estabilidad de xantofilas totales y astaxantina en una pasta cárnica modelo.

Valores medios*					
Concentración inicial de pigmento ¹					
	0.1722	0.3444	0.5167	0.6889	0.8612
Xantofilas ²	7.50A ²	6.77A	5.47A	6.34A	2.76B
Astaxantina ³	16.22A ³	13.7681A,B	16.100A	12.080B	11.38B

Tiempo (semanas)					
	0	1	2	3	4
Xantofilas ¹	7.86 A	7.54 B	7.116 C	4.774 D	3.34 E
Astaxantina ³	18.8 A	17.43 B	16.96 C	12.9 D	6.84 E

*letras iguales en el mismo reglón indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

¹ g astaxantina/kg emulsión

² E-05 mg/kg

³ E-03 mg/100 mL

PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Presentaciones en Congresos Nacionales

1. M. E. Franco-Zavaleta, E. Ponce-Alquicira, G. Gutiérrez-López , I. Guerrero Legarreta. 2006. Ensilado ácido de residuos de camarón como tratamiento previo a la extracción de astaxantina. XXVII Encuentro Nacional de la Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Ixtapa, Gro. 2 a 5 de Mayo.
2. Franco, M.E., Ponce, E., Gutiérrez, G.F., Guerrero Legarreta, I. 2007. Efecto de dos procesos de ensilado ácido en la extracción de astaxantina de residuos de camarón. XXVIII Encuentro Nacional de la Academia mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. 1 a 4 de mayo, Manzanillo, Colima.
3. Franco, M., Ponce, E., Gutiérrez, G., Guerrero Legarreta, I. 2007. Eficiencia del ensilado bacteriano de residuos de camarón en dos procesos de extracción de astaxantina. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Mich. 25 a 29 de Junio.
4. Franco, M., Gutiérrez, G., Ponce, E., Guerrero Legarreta, I. 2008. Efecto del ensilado químico y bacteriano en desechos de camarón para la extracción de astaxantina. XXIX Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. 13-16 Mayo, Puerto Vallarta, Jal.
5. M.E. Franco-Zavaleta, R. Jiménez-Pichardo, E. Ponce-Alquicira, G.F. Gutiérrez-López, I. Guerrero-Legarreta. 2009. Eficiencia del ensilado químico en desechos de camarón para la extracción de astaxantina. XXX Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 19 a 22 de Mayo de 2009. Mazatlán, Sin.
6. Franco Zavaleta, M., Ponce Alquicira, E., Jiménez Pichardo, R., Guerrero Legarreta, I. 2010. Estudio comparativo de la eficiencia del ensilado químico y bacteriano de residuos de camarón en dos procesos de extracción de astaxantina. XXXI Encuentro Nacional de AMIDIQ. 4 a 7 de Mayo de 2010, Huatulco, Oaxaca.

Presentaciones en Congresos Internacionales

1. Franco-Zavaleta, M., Ponce-Alquicira, E., Gutiérrez-López, G., Guerrero- Legarreta, I. 2006. Stabilization of shrimp wastes by chemical ensilation for astaxanthin extraction. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Orlando, Florida. 24 a 28 de Junio.
2. Franco, M., Ponce, E., Gutiérrez, G., Guerrero Legarreta, I. 2007. Acid ensilation of shrimp wastes for astaxanthin extraction. Institute of Food Technologists Annual Meeting, Chicago, Illinois, 28 Julio-2 Agosto
3. Franco, M., Ponce, E., Gutierrez, G., Guerrero Legarreta, I. 2007. Eficiencia del ensilado ácido en desechos de camarón para la extracción de astaxantina. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos, 5-8 Noviembre. Ambato, Ecuador.
4. Franco, M., Ponce, E., Gutierrez, G., Guerrero Legarreta, I. 2008. Comparative efficiency of chemical and bacterial ensilation for astaxanthin extraction from shrimp wastes. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Junio 27 a Julio 2, New Orleans, Louisiana.

5. Franco, M., Jiménez Pichardo, R., Ponce, E., Gutiérrez, G., Guerrero, I. 2008. Astaxanthin extraction from shrimp wastes by bacterial ensilation. 3rd. International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Queretaro, 14-17 Octubre.
6. Rodrigo Jiménez-Pichardo, Miriam Franco-Zavaleta, Gustavo F. Gutiérrez-López, Edith Ponce-Alquicira, Isabel Guerrero-Legarreta. 2009. Stability in two model systems of astaxanthin obtained from shrimp wastes. IFT Annual Meeting. 5 a 9 de Junio de 2009. Anaheim, California.
7. Franco, M., Jiménez, R., Tomasini, A., Guerrero, A. 2009. Estabilidad de astaxantina en sistemas modelo de emulsiones lipídica y proteica. VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos., 6 a 9 de Septiembre. Bogotá, Colombia.
8. Franco, M., Ponce, E., Gutierrez, G., Guerrero, I. 2009. Astaxanthin extraction from shrimp waste silage. World Aquaculture 2009. Veracruz, Ver, 27 a 30 de septiembre
9. Guerrero, I., Guzmán, X., García Barrientos, R., Hernández Sámano, A., Franco Zavaleta, M., Hernández Ortiz, V. 2010. Biomateriales de Mares Mexicanos. 1^a Reunión de Coordinación del Proyecto CYTED-Iberofun. Incorporación de Nuevos Ingredientes Funcionales a Alimentos como Contribución a la Promoción de la Salud y/o a la Prevención de Enfermedades de la Población Iberoamericana. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. 27, 28 y 29 de Abril.

Capítulos de libros

1. Franco Zavaleta, M., Guerrero Legarreta, I. 2009. Capítulo 1. La pesca en México. En: Tecnología de Productos Acuáticos. I. Guerrero, M. Rosmini, R. Armenta (eds.). Noriega Editores, México D.F., ISBN: 978-607-05-0086-2, 530 pp., pp. 19- 26.
2. Hernández Sámano, A., Franco Zavaleta, M., Hernández Ortiz, V., García Barrientos, R., Guzmán García X., Guerrero Legarreta, I. 2010. Biomateriales de Mares mexicanos. Memoria de la Red CYTED-Iberofun "Incorporación de Nuevos Ingredientes Funcionales a Alimentos como Contribución a la Promoción de la Salud y/o a la Prevención de Enfermedades de la Población Iberoamericana" www.iberofun.org

Artículos de investigación publicados

1. Franco Zavaleta, M., Jiménez Pichardo, R., Tomasini Campocosio, A., Guerrero Legarreta, I. 2010. Astaxanthin extraction from shrimp wastes and its stability in 2 model systems. Journal of Food Science 75(5):C394-C399.