



Revista Virtual Pro

ISSN 1900-6241

Bogotá, Colombia

info@revistavirtualpro.com

www.revistavirtualpro.com

2015

Paulina Sarabia-Bañuelos, Diana Denisse Mendoza-García, Alejandra Luna-Rodríguez, Ronny Adrián Flores-Ortega, Rolando Salvador García-Gómez, Marisela Bernal-González, Julio Alberto Solís-Fuentes, Ruth Pedroza-Islas, María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa

Aprovechamiento integral de crustáceos: obtención de quitina y quitosana de su cefalotórax y exoesqueleto por métodos ecológicos y de carotenoproteínas para consumo humano

Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Universidad Veracruzana, Xalapa, México

Universidad Iberoamericana, México D.F., México

Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

Aprovechamiento integral de crustáceos: obtención de quitina y quitosana de su cefalotórax y exoesqueleto por métodos ecológicos y de carotenoproteínas para consumo humano

(Integral Use of Crustaceans: Production of Chitin and Chitosan from Cephalothorax and Exoskeleton Intended for Human Consumption by Ecological Methods and Carotenoproteins)

Paulina Sarabia-Bañuelos, Diana Denisse Mendoza-García, Alejandra Luna-Rodríguez, Rolando Salvador García-Gómez, Rolando Salvador García-Gómez, Marisela Bernal-González, María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa¹

*Departamento de Ingeniería, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
(México D.F., México)*

Ronny Adrián Flores-Ortega

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador (Quito, Ecuador)

Julio Alberto Solís-Fuentes

Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana (Xalapa, México)

Ruth Pedroza-Islas

Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana, (México D.F., México)

e-mail: ¹mcduran@unam.mx

Resumen

La producción total pesquera y de acuicultura mexicana se valuó en MXN\$12,9 mil millones en 2001. Dentro de esta se encuentra el camarón y, aunque sus cifras son relativamente menores desde el punto de vista cuantitativo, son mucho más altas en términos de valor económico. Durante su industrialización, los caparzones y el cefalotórax de los crustáceos son desechados por las embarcaciones en alta mar o por las fábricas empacadoras. Esto hace que, en lugar de ser un recurso renovable que se aproveche de manera integral, se transformen en un residuo contaminante de efecto ambiental negativo. Las investigaciones realizadas desde la década de los setenta del siglo XX demuestran que el cefalotórax y exoesqueleto de camarón (CC) está formado en parte por quitina, polímero que protege naturalmente frente al ambiente circundante y que, por tanto, tiene aplicación industrial limitada debido a su baja solubilidad.

Mediante el uso de métodos químicos o bioquímicos se puede obtener un derivado desacetilado de

la quitina denominado quitosana¹, el cual polímero soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos que permite aplicaciones en las áreas alimentaria, farmacéutica, entre otras, incluso en el tratamiento de aguas residuales. Para la obtención de la quitina a partir de CC existen una serie de operaciones unitarias: limpieza del CC fresco mediante lavado con agua, licuado en agua para reducir su tamaño de partícula, filtrado y tamizado para obtener CC de menor tamaño parcialmente desproteínizado (CPD) utilizado para la extracción de quitina. La parte soluble se usa para otros proyectos de aprovechamiento de carotenoproteínas para consumo humano o para las propias granjas camaronícolas, enriqueciendo los alimentos microencapsulados para nauplios (primera larva característica de los crustáceos).

En los laboratorios 301 a 303 del edificio E-3 de la Facultad de Química de la UNAM se desarrolló un método patentado siguiendo la química verde para la extracción de quitina a partir de CPD empleando un disolvente elaborado con 1 mol de metanol, 4 moles de agua y 1 mol de cloruro de calcio, al cual se denominó MAC-141[®]. Planteando el posible uso de esta goma para recubrir frutas perecederas, en esta investigación se utilizó la metodología anterior junto con sonicación para obtener, además de quitina soluble, quitina parcialmente desacetilada o quitosana. Las condiciones de sonicación estudiadas fueron de 0,0; 0,3; 0,5; 0,7 y 0,9 pulsos por segundo en un tiempo de tratamiento de 0, 5, 10 y 15 minutos con una adición de energía térmica por 40 minutos a diferentes temperaturas (ambiente, 45, 55, 60°C).

Durante el proceso de extracción, se removieron los grupos amida y se cuantificaron los grupos amina en el polímero, determinando la desacetilación de la molécula mediante el criterio de la primera derivada, así como espectroscopía de infrarrojo y su solubilidad relativa. La desacetilación obtenida a las tres mejores condiciones de sonicación estudiadas fue de 8,75, 14,87 y 29,6%, respectivamente. Esto indica que la adición de la sonicación a la disolución con MAC-141[®] puede ser un método adecuado para desacetilar la quitina a quitosana porque produce un efecto de vibración o cavitación sobre los enlaces de los grupos acetamida. Es importante continuar estos estudios para dilucidar el mecanismo preciso que promueve la desacetilación para incrementar su porcentaje sin aumentar el consumo energético.

Para la obtención de las carotenoproteínas se adicionó aceite de pescado en relaciones 1:5 y 1:10, ya que son solubles en este medio. Para la relación 1:10, se obtuvieron 286 mgL⁻¹ de pigmentos. El aceite pigmentado fue usado en dietas microencapsuladas para estadíos intermedios de camarón (nauplios) por secado por aspersión valiéndose de dos mezclas encapsulantes: goma de mezquite-concentrado de proteína de suero lácteo y goma arábica-goma de mezquite-maltodextrina 10 DE. Las microcápsulas con la mezcla de las gomas arábica y de mezquite mostraron la mejor morfología y estabilidad. Los nauplios de *Litopenaeus vannamei* tuvieron en el bioensayo a una dieta con microalgas como control. Los resultados corroboraron que las microcápsulas con aceite

¹ Las gomas en la nomenclatura química tienen el sufijo *-ana*. Por ejemplo, de la dextrosa se deriva la goma dextrana. Para la quitina debería llamarse quitana pero, por imitación del inglés *chitin* y *chitosan*, algunos investigadores la llaman *quitosan*, *quitosán* o *quitosano*. En esta investigación se le llamará quitosana.

pigmentado aumentaron la tasa de supervivencia comparadas con el lote control. El desarrollo larvario evaluado con la longitud del exoesqueleto fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del control, favoreciendo a la dieta con aceite pigmentado.

Palabras clave: química, tecnología química, química verde, química sostenible, quitina, quitosana, crustáceos, camarones, carotenoproteínas, microcápsulas con aceite pigmentado, nauplio

Abstract

In 2001, total Mexican production for fisheries and aquaculture was MXN\$12.9 billions. This included shrimp. When considered its total amount is relatively low, but concerning its economic value is much higher than other fisheries. During its industrialization, exoskeletons and cephalothorax, although having an intrinsic value when compared with the shrimp abdomen, are discarded in the ocean or in the packing facilities instead of being exploited. This situation turns a renewable raw material into a waste with negative environmental effects.

Research carried out since the nineteen seventies have demonstrated that shrimp cephalothorax and exoskeletons (CC) contain chitin, a polymer with limited applications due to its low solubility (it is the natural protection of this species in its surrounding environment). A deacetylated derivative has been chemically or biochemically obtained, it has been named chitosan and is soluble in most organic solvents. This has increased its applications in food and pharmaceutical industries, as well as in wastewater treatment. Various unit operations are needed to obtain chitin from CC: cleaning by washing with water, water blending to reduce particle size, filtering and screening to achieve small particle size partially deproteinized CC (CPD) used for chitin extraction. The water soluble part is employed in other projects dealing with carotenoproteins recovery.

In Laboratories 301, 302 and 303, Building E-3, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), a novel patented method based on green chemistry was applied to extract chitin from CPD using a solvent named MAC-141[©] (1 mole methanol, 4 moles water, 1 mole calcium chloride) and completely dissolving chitin. In order to use this liquid to cover perishable fruits, an additional unit operation, sonication, was considered to obtain soluble chitin, partially deacetylated chitin or chitosan. Sonication conditions studied were as follows: 0, 0.3, 0.5, 0.7, and 0.9 pulses per second; treatment times of 0, 5, 10, and 15 minutes; an addition of thermal energy during 40 minutes at different temperatures (room temperature, 45, 55, 60°C).

During the extraction process the amide groups were removed and the amino groups were quantified in the biopolymer. Deacetylation was determined by first derivative criterion, infrared spectroscopy and specific solubility. Best values obtained were 8.75, 14.87, and 29.6%. These results indicated that using both sonication and MAC-141[©] may become a suitable method to dissolve chitin and its deacetylation due to cavitation effect on the acetamide bonds. Research efforts to elucidate the

precise mechanism that promotes deacetylation must be continued in order to increase its yield without raising energy consumption.

Carotenoproteins were extracted using two by-product/fish oil ratios: 1:5 and 1:10. The latter yielded significant results ($p < 0.05$; 286 mg/L of pigments). Pigmented oil was microencapsulated by spray-drying employing two encapsulating blends: Arabic gum-mesquite gum-maltodextrin 10 DE and mesquite gum-whey-protein concentrate. The former showed the best morphology and stability. A bioassay using *Litopenaeus vannamei* nauplii was performed taking microalgae as a control. Results indicated that pigmented oil microcapsules increased the survival percentage when compared with control ($p < 0.05$). Larvae growth evaluated as the exoskeleton length was significantly different from control, favoring the pigmented oil diet ($p < 0.05$).

Keywords: shrimp cephalothorax and exoskeleton, green chemistry, chitin, chitosan, carotenoproteins, microcapsules with pigmented oil, nauplius

Introducción

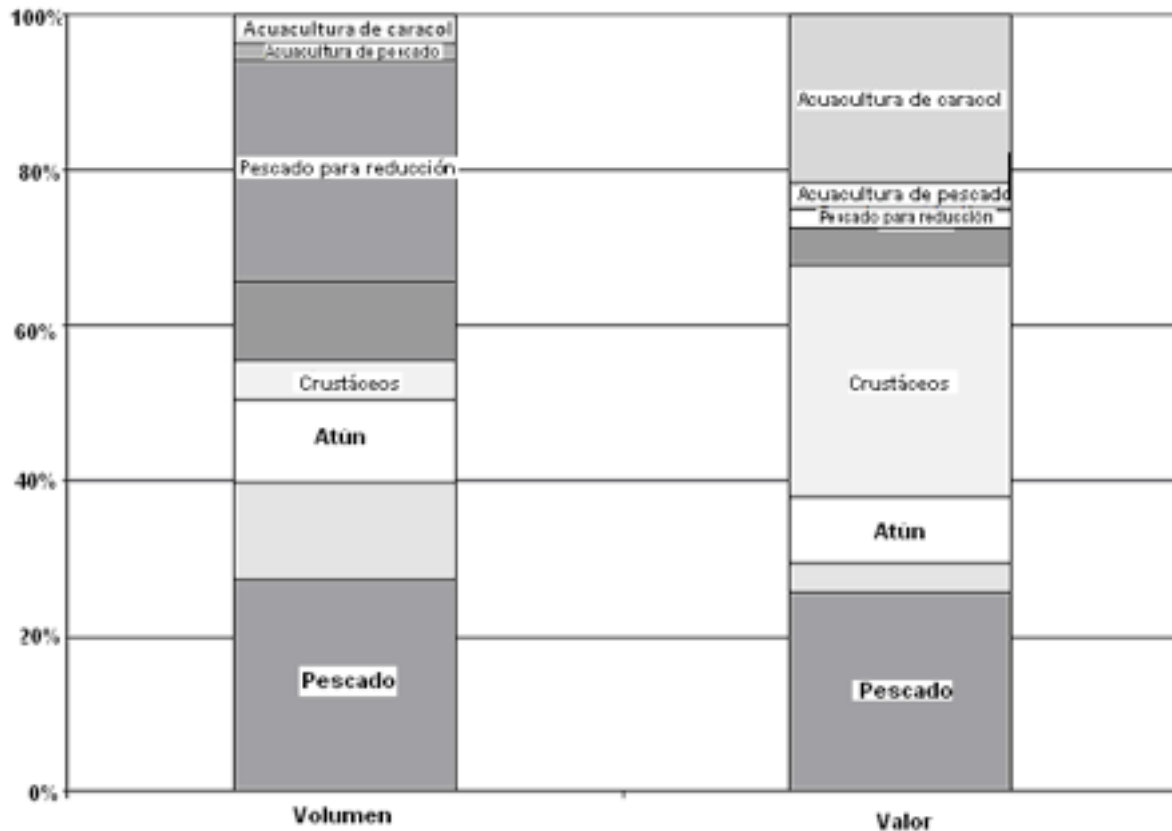
La producción mundial de camarón cultivado durante el año 2000 fue de 1 087 111 T, representando 26,1% del total desembarcado. Los principales países productores entre 2001 y 2005 fueron Tailandia (300 000 T), República Popular China (250 000 T) e Indonesia (168 000 T). En Latinoamérica, Ecuador produce 45 000 T y México ocupa el noveno lugar con 26 000 T, ya que la acuicultura se encuentra aún en las etapas iniciales de desarrollo. En este sector, el camarón corresponde a 32% de la producción total, aunque ha ido aumentando con una rapidez anual promedio de 22% a partir de 1990.

Existen altas expectativas entre el gobierno y la industria mexicanos en la expansión continua de la acuicultura de camarón; en términos de valor de producción se estimó en MXN\$12,9 mil millones en 2001. Como se observa en la figura 1, la acuicultura de camarón y crustáceos es relativamente pequeña en volumen, pero mucho más alta económicamente. México siempre ha sido un exportador neto de alimentos provenientes del mar y la balanza comercial de las pesquerías en lo concerniente a la relación de exportación/importación fue de cerca de 2:1 en 2003. Más de 60% del valor total de las exportaciones en 2003 correspondió a solo dos productos: camarón (47%) y atún (16%) (OCDE, 2007).

Tabla 1. Exportaciones e importaciones de pescado y productos pesqueros para 2003

Producto	Exportaciones		Importaciones	
	Volumen (T)	Valor (MXN)	Volumen (T)	Valor (MXN)
Pescado fresco	16113	1175302	2538	42614
Atún	5544	796566	10	1054
Pescado congelado	74428	494154	26498	314604
Atún	29797	261451	32	2068
Sardinias	35155	170985	125	1268
Filete y otra carne de pescado	1814	134005	20237	632441
Pescado salado y ahumado	369	79777	2260	198693
Crustáceos	29219	3700608	7624	369916
De los cuales el camarón representa	26280	3249123	7450	342554
Moluscos	14399	404500	5077	129730
Algas marinas y otras algas	18539	6863	1761	30814
Aceite de pescado	2179	9145	834	9756
Pescado en conserva	6776	106397	8693	269617
Crustáceos en conserva	12559	564423	5404	318143
Harina de pescado	19021	119693	14169	91136
TOTAL	195418	6794872	95095	2407468

Fuente: OCDE (2007)

Figura 1. Proporciones de volumen y valor de la producción de pesca y acuicultura para 2004

Fuente: OCDE (2007)

En el estado mexicano de Sonora se generaron 26 600 T de residuos a partir de 76 000 T de camarón durante el año 2009, de las cuales 3675 T son de quitina (López, Sánchez y Bueno, 2010). Con referencia a lo anterior, se esperaría que de las 196 000 T de camarón producidas anualmente en México (Aquahoy, 2010) se generarán de 60 000 a 68 600 T de residuos (Pacheco, Juárez-Castelán, Tromboto y Shikai, 2009; Pacheco-L., 2010) y, por tanto, casi 10 000 T de quitina que podrían ser utilizadas en diferentes áreas. Lamentablemente, el costo de conversión del cefalotórax de camarón es demasiado alto, lo que ha promovido que quienes se interesan por la explotación de la quitina busquen fórmulas que la hagan económicamente viable (Shirai-Matsumoto, 1999).

Existen dos pesquerías principales de camarón en el golfo de México, una de ellas en la Ciudad del

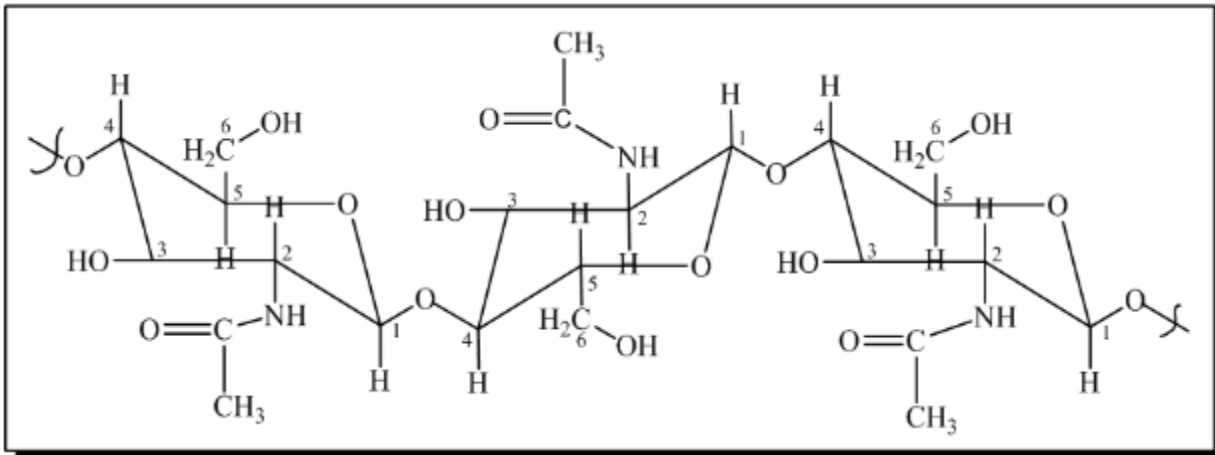
Carmen (Campeche) y otra más pequeña al norte hacia Tampico y Matamoros (Tamaulipas), consideradas como principales áreas para el desarrollo de larvas de camarón (OCDE, 2007).

Desafortunadamente, los exoesqueletos de camarón son desaprovechados por los pescadores o dueños de granjas camaronícolas, siendo son arrojados al mar o en los suelos aledaños a los sitios de camaronicultura, contaminandolos. Otros lugares de depósito son los puertos cuando son “descabezados” fuera del agua. Estas malas prácticas y la contaminación del agua que se recambia de los estanques y que contiene residuos del alimento proporcionado causan impactos negativos considerables (Flores-Ortega, 2008).

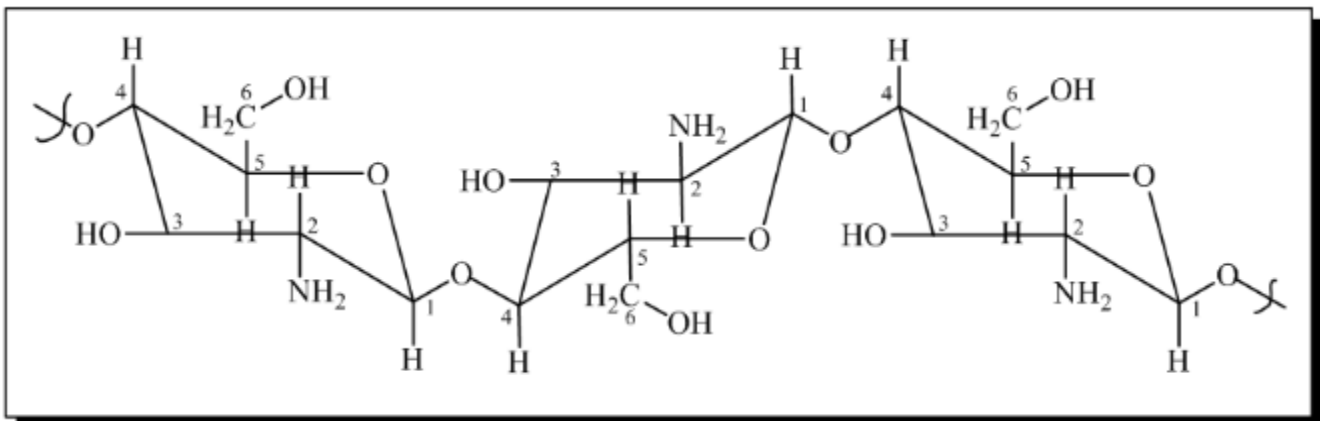
Estos problemas ambientales han motivado un creciente interés en la obtención de quitina (figura 2a) a partir del exoesqueleto (Shirai-Matsumoto, 1999), que representa entre 14 y 27% de su composición en base seca. Otros constituyentes son proteínas (44.7%), ceniza (26,3%), fibra cruda (20,7%), grasa (5,2%) y otros hidratos de carbono (3,1%) (Flores-Ortega, 2004).

Como biopolímeros, la quitina y la quitosana son una opción de biomateriales para distintas áreas del quehacer humano: pueden eliminarse una vez que su uso útil ha cesado sin causar efectos perturbadores en el medio ambiente ni en la salud, tales como la inducción de resistencia de patógenos o su acumulación en las personas que provoquen enfermedades de efectos irreversibles (Lárez-Velásquez, 2008; Struszczyk, Pospieszny y Kotlinski, 1989).

No obstante, la quitina posee limitadas aplicaciones debido a su baja solubilidad (una de las razones por las que forma parte del exoesqueleto es la protección que brinda al organismo acuático con respecto al ambiente que lo rodea). A partir de su desacetilación se obtiene quitosana (figura 2b), la cual es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y, por tanto, le confiere mayores aplicaciones en las industrias de alimentos, química-farmacéutica y agrícola (Flores-Ortega, 2004, 2008).

Figura 2a. Estructura química de la quitina

Fuente: elaboración propia (2015)

Figura 2b. Estructura química de la quitosana

Fuente: elaboración propia (2015)

La extracción química tradicional de la quitina a partir del cefalotórax de camarón se vale de reactivos corrosivos como HCl, NaOH, KMnO_4 y $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$, los cuales causan contaminación en el ambiente. Una vez extraída, se somete a reacciones de desacetilación a altas temperaturas (Warsi, 2008), mediante presión (No, Cho, Kim y Meyers, 2000) o sonicación (Cardoso, Signini y Campana-Filho, 2001) en presencia de NaOH para obtener quitosana (quitina hasta con 85% de desacetilación) (Hidalgo, Fernández, Nieto, Paneque, Fernández y Llópez, 2009; Hidalgo, Suárez y Fernández, 2008).

Existe una extensa investigación sobre diferentes métodos alternativos que utilizan menor cantidad de reactivos y energía para obtener quitina, quitosana (tabla 2) y carotenoproteínas para aplicarlos en muchos procesos útiles (Barrera-Rodríguez, Flores-Ortega y Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2007; Calderón-Villagómez, González-Piña, Pérez-Mendoza, Jáber y Durán-de-Bazúa, 1992; Cañipa-Morales, Escobedo, García, Gálvez y Durán-de-Bazúa, 1998; Escobedo, García, Rosas, Cañipa, Gálvez y Durán-de-Bazúa, 1999; García-Gómez, Guadarrama, Cañipa, Escobedo, Gálvez y Durán-de-Bazúa, 1999; García-Gómez et al, 2004; González-Piña y Pérez Mendoza, 1991; León-Salazar, Ortega-Granados y Durán-de-Bazúa, 2013; Luna-Rodríguez, 2008; Máximo-Jiménez, Ortega-Granados y Durán-de-Bazúa, 2013; Mendoza-García, Salas-Osornio y Durán-de-Bazúa, 2010; Ramírez-Cruz, García-Gómez, Flores-Argüello, Gálvez-Mariscal y Durán-de-Bazúa, 2003; Reyes-Tacuba, García-Gómez y Durán-de-Bazúa, 2011; Sarabia-Bañuelos, Mendoza-García, Ortega-Granados, Campos-Juárez, García-Gómez y Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2010; Tenorio-García, García-Gómez y Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2012a,b). Esto permite un aprovechamiento integral de los residuos de crustáceos que comporta varias bondades: una disminución de la contaminación, valor agregado a estos subproductos y beneficios para los trabajadores de las cooperativas y a los propietarios de las granjas camaronícolas.

Tabla 2. Algunas de las aplicaciones de la quitina y la quitosana

Uso	Biopolímero	Propiedades aprovechadas	Cultivo
Películas para recubrimiento de frutos, hojas, semillas y vegetales frescos	Quitosana	Antimicrobiana	Cítricos, mango, toronja, tomate, jitomate ² , fresa, “lechosa” (papaya ³)

² Los tomates y jitomates son frutas obtenidas de plantas originarias de México y sus nombres vienen del náhuatl, la lengua de los aztecas. *Tomatl* es el nombre de un pequeño fruto verde o amarillo y *xitomatl* es el de uno rojo, significando tomate con ombligo. No pertenecen a la misma familia y, de hecho, el primero es verde (*Physalis angulata* L.). El que es amarillo se llama *miltomatl* (*Physalis pubescens* L.) o tomate de milpa (*milli*, sementera y *pan*, lugar) y hay otros como el *xaltomatl*, el *coztomatl* (*Physalis coztomatl* Moc. Sess.), entre otros. El jitomate, que es otra variedad diferente de planta, al estar maduro es rojo intenso y puede ser redondo u ovalado (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Por ello, no debe llamarse tomate al jitomate (Cabrera, 2002).

³ Los nombres de los productos vegetales varían en cada país. A la “lechosa” en México se le conoce como papaya, una palabra de origen antillano (*Carica papaya* L.). La fresa se denomina frutilla (*Fragaria x ananassa*) en otros países, a la

Clarificación de jugos de fruta	Quitosana	Coagulante y floculante	Pera, toronja, limón, manzana
Protección de plántulas	Quitosana	Fungicida	Uva de vino, tomate, jitomate
Liberación controlada de agroquímicos	Quitina y quitosana	Formación de hidrogeles	Arándano
Estimulación del crecimiento	Quitosana	Bioestimulante	Orquídea
Inhibidor del oscurecimiento de frutos y tubérculos	Quitosana	Biocida	Banana, papa
Biocidas	Quitosana	Antimicrobiana	Tomate, jitomate, papa, hortalizas
Corrección de sustratos de crecimiento	Quitina y quitosana	Fungicida, nematocida	Lúpulo blanco (altramuz), guisantes (chícharos), tomate, jitomate, papa, apio
Inductor de mecanismos de defensa	Oligómeros de quitina y quitosana	Inductor de resistencia	Soya

Fuente: Lárez-Velásquez (2008)

En estos métodos se busca que se disuelva la quitina y se desacetile de manera simultánea para producir quitosana disminuyendo o reciclando los reactivos empleados, siguiendo así los principios de la química verde. Como ya se mencionó, la quitosana posee importantes aplicaciones, y si se logra disolver la quitina también puede tenerlas; por ello, se ha intentado manipular su extracción para obtener rendimientos más altos y mayor grado de pureza a costos más bajos.

Para la desacetilación de la quitina, Cardoso et al (2001) han reportado el siguiente procedimiento. La quitina cruda se suspende en agua (4,6 g de quitina en 80 mL de agua) y sometida a sonicación con una duración de pulso ajustada a 0,5 por segundo por el tiempo deseado. Para verificar que el tratamiento por radiación ultrasónica contribuye al cambio en la reactividad de la quitina para la desacetilación, la suspensión acuosa se somete a agitación magnética durante 60 min a temperatura ambiente y 55°C, temperatura máxima alcanzada por la suspensión de la quitina en el tratamiento de

papa (*Solanum tuberosum*) le llaman patata, a los guisantes (*Pisum sativum*) chícharos (en México), a la soya (*Glycine max* L.) soja.

sonicación. Por último, la suspensión se filtra y se seca para desacetilarla completamente con hidróxido de sodio. Así, los 4,6 g de quitina se mezclan con 220 mL de hidróxido de sodio al 40% y se mantienen en agitación mecánica (350 rpm) a una temperatura de 115°C. Después de 6 h, la muestra se enfría a temperatura ambiente, se filtra el sólido y se lava con agua hasta la neutralidad, seguido de un lavado con metanol. Al producto obtenido se le seca en condiciones ambientales.

También se ha reportado la obtención de quitosana a presiones altas. Se toman 15 g de quitina y se adiciona hidróxido de sodio al 40-50% (sólido/solvente 1:10 o 1:15 (w/v)). La mezcla se coloca en un autoclave (precalentado a 100°C previamente) a una presión de 103,42 kPa por encima de la presión atmosférica (15 psi) de 5 a 30 min a 121°C. Se lava y se enjuaga la quitosana con agua destilada; luego se filtra y se seca a 60°C por 4 h en una estufa (No, Meyers, Prinyawiwatkul y Xu, 2007).

A principios del siglo XXI, se desarrolló un procedimiento basado en la química verde para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos y cefalotórax parcialmente desproteinizados (CPD) de crustáceos en los laboratorios 301, 302 y 303 del edificio E-3 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y que fue patentado (Durán-Domínguez-de-Bazúa, Barrera-Rodríguez y Flores-Ortega, 2009). Estos subproductos se mezclan con un disolvente conocido como MAC-141[®] y preparado con metanol, agua y cloruro de calcio en proporciones molares de 1:4:1. Esta extracción de quitina en su forma líquida es ecológica, ya que el disolvente se puede recuperar y volverse a utilizar (Flores, Barrera-Rodríguez, Shirai-Matsumoto y Durán-de-Bazúa, 2006, 2007).

El primer objetivo de esta investigación es probar este disolvente simultáneamente con una operación unitaria adicional, la sonicación, que ya ha sido utilizada por la química tradicional para obtener quitosana. Se obtienen exoesqueletos y cefalotórax parcialmente desproteinizados (CPD) de residuos de camarón de los cuales, junto con el disolvente MAC y el uso simultáneo de la sonicación a diferentes pulsos por segundo (p/s), se extrae quitina y se desacetila. Se caracterizó el biopolímero generado mediante espectroscopía de infrarrojo y desacetilación, empleando el criterio de la primera derivada y su solubilidad. Se estudiaron solamente los efectos de la sonicación y del disolvente sobre el CPD (cefalotórax parcialmente desproteinado). Se consideraron como variables controladas la temperatura, el tiempo y los pulsos por segundo (p/s) durante tratamiento con sonicación. Asimismo, se

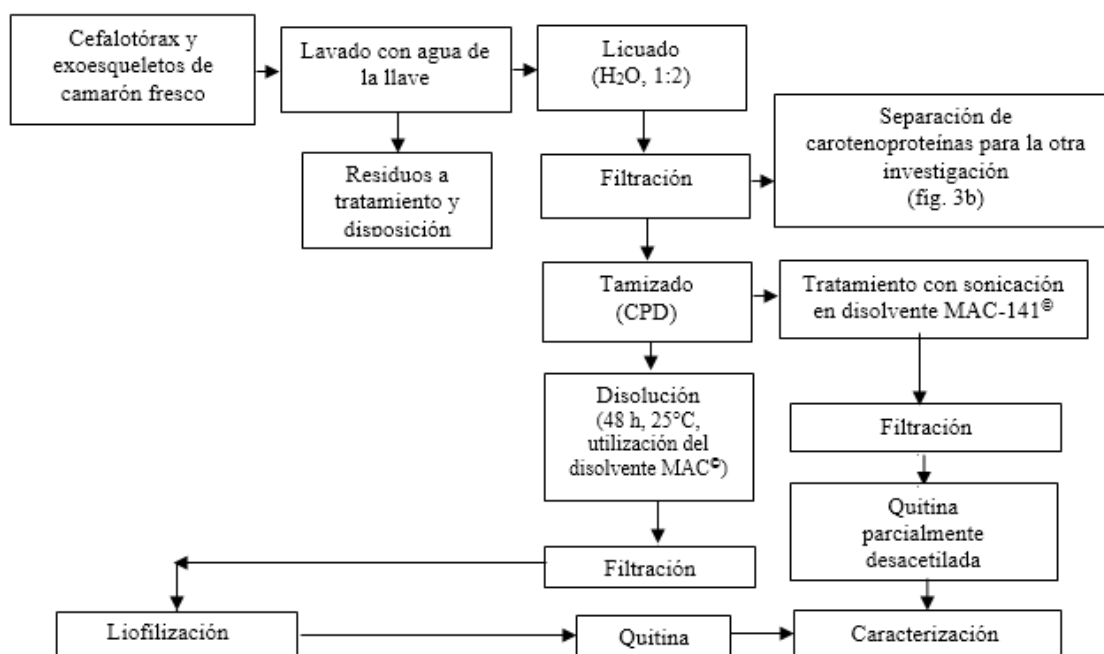
usó una sola variable no controlada: la pérdida de agua por evaporación del disolvente MAC durante la sonicación. Toda esta fase experimental se realizó a escala de laboratorio y no se analizaron las condiciones óptimas.

Otro objetivo fue corroborar la bondad del uso de las carotenoproteínas obtenidas de los cefalotórax y exoesqueletos de camarón en dietas para etapas larvarias del camarón (*nauplius*) como una primera etapa antes de aplicarla en alimentos para consumo humano directo (González-Riverón, Fernández-Cruz, García-Gómez y Durán-de-Bazúa, 2013).

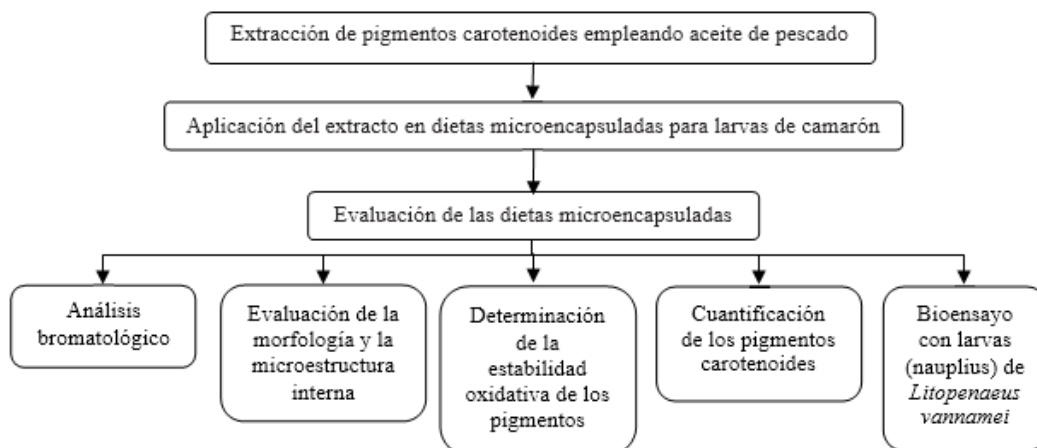
Desarrollo experimental

En las figura 3a y 3b se presenta el diagrama de bloques del desarrollo experimental que se siguió en esta investigación.

Figura 3a. Diagrama de bloques de la producción de quitina y quitosana



Fuente: elaboración propia (2015)

Figura 3b. Diagrama de bloques de la producción de microcápsulas para dietas

Fuente: elaboración propia (2015)

Relación tiempo/radiación durante la sonicación

El diseño experimental consideró tres tiempos —5, 10 y 15 min— y tres frecuencias de sonicación —0.3, 0.5, 0.7, 0.9 pulsos por segundo—.

Relación tiempo/radiación/calentamiento (temperatura ambiente, 45, 55, 60°C)

Si el tratamiento por radiación ultrasónica no contribuye al cambio en la reactividad de la quitina para la desacetilación, entonces las muestras (CPD-MAC) son sometidas a agitación magnética durante 40 min a diferentes temperaturas —ambiente, 45, 55 y 60°C— todas menores a 64.7°C —punto de ebullición del metanol que se encuentra presente en el disolvente MAC—. El producto disuelto se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se identifica por IR.

Tabla 3. Diseño experimental variando tiempo y frecuencia de sonicación con agitación y a diferentes temperaturas

Muestras (quitina-MAC)	Agitación por 40 min			
	Temp. ambiente	45°C	55°C	60°C
0,5 p/s (5, 10, 15 min)	X-0	X-1	X-2	X-3
0,7 p/s (5, 10, 15 min)	Y-0	Y-1	Y-2	Y-3
0,9 p/s (5, 10, 15 min)	Z-0	Z-1	Z-2	Z-3

Fuente: elaboración propia (2015)

Preparación del cefalotórax parcialmente desproteínizado (CPD)

Paso 1: obtención del cefalotórax de camarón fresco. Las cabezas de camarón y caparazones (CC) se obtienen de la zona de pescados y mariscos de la central de abasto de La Nueva Viga (México D.F., México), las cuales fueron proporcionadas gratuitamente por los comerciantes. Predominan en los residuos cefalotórax de camarón café y blanco.

Paso 2: lavado con agua de la llave. El cefalotórax de camarón (CC) fresco se colocó en una criba de plástico, se limpió de objetos extraños y se lavó bajo un chorro de agua corriente hasta que esta se observó limpia. Se dejó escurrir durante 30 min. El CC debe utilizarse preferentemente fresco; en caso contrario, es necesario mantenerlo en refrigeración para evitar la descomposición de las proteínas presentes.

Paso 3: licuado. En una licuadora doméstica —marca Osterizer modelo 10-C de una velocidad— se adicionó el CC (paso 1) y agua en una relación 1:2 en masa y se licuó durante 30 s. La mayor parte de proteínas, grasas y pigmentos y parte de los minerales se disuelven o emulsifican en este licuado, obteniéndose sólidos pequeños de cefalotórax y exoesqueletos parcialmente desproteínizado (CPD).

Paso 4: filtración. La pasta obtenida en el paso 3 se pasó por un tamiz con malla de 1 mm de abertura para separar la parte líquida. Se recogió el CPD sólido retenido en el tamiz y se repitió el proceso de licuado y tamizado una vez más. Se enjuagó el CPD con una parte de agua, eliminando el exceso de líquido.

Paso 5: secado. Una vez eliminada el agua, se secó el CPD en una estufa eléctrica marca Felisa a 60°C hasta alcanzar la estabilidad (alrededor de 18 h).

Paso 6: tamizado. El CPD se tamizó para obtener un tamaño de partícula promedio de 149 μm ($P < 2\text{mm}$) y se conservó en refrigeración dentro de un envase hermético.

Caracterización del CPD

Se llevó a cabo con la finalidad de saber si el CPD ha sido tratado correctamente y para disminuir el error en las pruebas propuestas que se mencionan más adelante en esta metodología de trabajo. Se siguieron las metodologías descritas en la literatura (AOAC, 2000).

Preparación del disolvente MAC-141[®]

Paso 1: mezcla de reactivos. En un balón de destilación de 500 mL se agregaron 277,5 g de cloruro de calcio anhidro, 180 mL de agua destilada y 99 mL de metanol. El matraz debe estar en un baño de hielo, pues la reacción es exotérmica.

Paso 2: reflujo. La mezcla hecha en el paso 1 se sometió a reflujo con calor moderado hasta disolver completamente el cloruro de calcio, es decir, hasta que llegó al equilibrio. El disolvente resultante se enfrió y se guardó en un recipiente hermético.

Obtención de quitosana

Sonicación de CPD con disolvente MAC-141[®]. Se utilizó un sonicador Fisher Scientific Dismembrator 550 con punta del número 4 apropiada para el tratamiento de cantidades pequeñas de muestra. Se tomó 1 g de CPD más 10 g de disolvente MAC[®] y se colocaron en un vial para sonicar marca Falcon cónico, que resultó apropiado para la sonicación al cubrir la mayor parte de la superficie de la punta. A cada muestra se tomó la temperatura después de la sonicación y se observó si existió pérdida visible de disolvente por incrustaciones de calcio en la punta del equipo. Las muestras obtenidas se filtraron con un equipo Millipore para separar el CPD no disuelto del complejo biopolímero-disolvente; posteriormente, se vaciaron en un vaso de precipitado y se pusieron en agitación por 40 min a temperatura ambiente y a 45, 55 y 60°C. Una vez que la muestra alcanzó la máxima viscosidad, se filtró en un equipo Millipore, se liofilizó y se identificó por IR.

Procedimiento de purificación

Dado que las muestras son líquidos muy viscosos, se colocaron en un “humidificador” (cámara cerrada) durante 24 h para recuperar la mayor cantidad de calcio y de metanol presentes del disolvente. Para precipitar completamente la quitina y quitosana obtenidas se lavaron con agua destilada a pH de 6,4. Las muestras se sacaron del humidificador y el sobrenadante que se formó se retiró con una pipeta Pasteur, poniéndose a secar el precipitado a 95°C durante 18 h en una estufa marca Felisa para retirar completamente el agua y el metanol.

Para realizar la fase analítica, las muestras de polvo blanco se lavaron con metanol y éter etílico

con el fin de eliminar completamente el agua ligada al polímero y permitir su identificación por IR, dejando secar por otras 18 h. Las muestras se caracterizaron mediante IR, solubilidad específica y grado de desacetilación.

Desacetilación

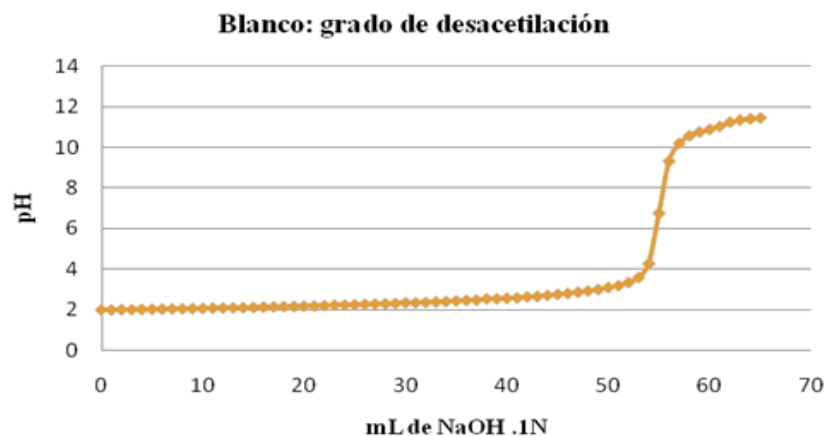
Para corroborar la desacetilación de la muestra, se pesaron 0,5 g y se disolvieron a una temperatura de 55°C, con agitación durante 15 min en 20 mL de HCl 0,3 N. Se añadieron 400 mL de agua destilada para permitir una buena dispersión del precipitado que se formó. Se tituló con NaOH 0,1N leyendo las variaciones del pH con un potenciómetro, agitando constantemente. Gráficamente se determinaron los volúmenes x e y de NaOH correspondientes a los dos puntos de inflexión. El porcentaje de grupos amino (% NH_2) contenidos en la prueba se calcularon como sigue (Sarabia-Bañuelos, Mendoza-García, Ortega-Granados, Campos-Juárez, García-Gómez y Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2010; Sarabia-Bañuelos, 2012):

$$\% NH_2 = \frac{16,1 \times (y - x) \times 0,1}{m} \quad (1)$$

donde x es el punto de inflexión, y es el punto de inflexión mayor y m es la masa de la muestra.

Para tener una referencia (blanco), se efectuó el procedimiento anterior en una muestra que no contenga biopolímero (figura 4).

Figura 4. Titulación de HCl 0,3 N con NaOH 0,1 N sin muestra de quitina y quitosana



Fuente: elaboración propia (2015)

Pruebas de solubilidad

Se colocaron 0,001 g de muestra en un vial de 2 mL con 0,5 mL del disolvente para solubilizar quitina o quitosana en HCl, H₂SO₄, CH₂O₂ y CH₃COOH. Se llevó a cabo la caracterización por su solubilidad (tabla 4).

Tabla 4. Tabla de solubilidad de quitina y quitosana

Polímero	HCl	H ₂ SO ₄	CH ₂ O ₂ (ácido fórmico)	CH ₃ COOH al 2% (ácido acético)	Agua
Quitina	Insoluble	Soluble	Soluble	Insoluble	Insoluble
Quitosana	Soluble	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble

Fuente: Flores-López (2008)

Espectrometría de infrarrojo (IR)

El análisis espectroscópico para cada una de las muestras obtenidas se realizó en el laboratorio de espectroscopía de infrarrojo de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la UNAM en un equipo FTIR 1605.

Extracción de pigmentos carotenoides a partir de la harina de cefalotórax de camarón

La extracción de pigmentos se efectuó con base en la investigación de Chen y Meyers (1982a) sobre obtención de astaxantina empleando aceite de pescado. Se manejaron relaciones de 1:5 y 1:10 de carotenoproteínas con respecto a aceite de pescado. Para esta última, se pesaron 2 g de material separado del CPD y se virtieron en matraces Erlenmeyer, junto con 20 mL de aceite de pescado y 500 ppm de etoxiquín como agente antioxidante. Los recipientes se colocaron en un baño de agua caliente con agitación continua en la oscuridad hasta que se alcanzó una temperatura de 80°C, mantenida durante 15 min.

Posteriormente, se realizó la centrifugación de la muestra a 4500 rpm a 0°C por 20 min para separar la fase oleosa que contiene el pigmento y se cuantificó el volumen de aceite obtenido. Para determinar la cantidad de astaxantina presente en el aceite, se hizo una lectura en el espectrofotómetro a 480 nm. La harina residual resultante después de la centrifugación se pasó nuevamente a los matraces para realizar dos extracciones adicionales siguiendo las condiciones descritas anteriormente.

Finalmente, se cuantificó el total de pigmento obtenido en las tres extracciones. Todas las determinaciones se llevaron por triplicado. La expresiones empleadas para cuantificar el pigmento fueron las siguientes:

$$\frac{\mu\text{g astaxantina}}{\text{g CPD}} = \frac{A \times D \times 10^6}{100 \times G \times d \times E_{1\%cm}^1} \quad (2)$$

$$\frac{\mu\text{g astaxantina}}{\text{g aceite pigmentado}} = \frac{A \times D \times 10^6}{100 \times S \times d \times E_{1\%cm}^1} \quad (3)$$

donde A es la absorbancia a 480 nm, D es el volumen total de aceite recuperado (mL), G es la masa de harina de cefalotórax de camarón (g), d es el ancho de la celda (1 cm); S es la densidad del aceite de pescado (0,86 g/L) y $E_{1\%cm}^1$ es el coeficiente de extinción para el aceite de pescado (2155).

Para el estudio de la extracción de pigmentos se utilizó un experimento factorial 2^k con tres repeticiones. Las variables fueron la proporción de material a extraer y el aceite de pescado. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$) (Chen y Meyers, 1982a).

Elaboración de microdietas (microencapsulación del extracto oleoso)

Como agentes encapsulantes se emplearon goma de mezquite purificada según lo descrito por Vernon-Carter, Gómez, Beristain, Mosqueira, Pedroza-Islas y Moreno-Terrazas (1996), maltodextrina 10 DE (equivalente de dextrosa) y goma arábiga. Se prepararon dos microdietas experimentales para probar el efecto del pigmento carotenoide. La primera sigue la formulación que se presenta en la tabla 5a (Hernández-Rojas, 2002).

Tabla 5a. Ingredientes de la dieta 1 para larvas de camarón

Ingredientes	Porcentaje (en masa)
Aceite de pescado pigmentado*	17,5
Aceite de hígado de bacalao	5,84
Almidón de trigo	25
Colesterol	0,26
Proteína concentrada de suero de leche (WPC 80% proteína)	37,5
Goma de mezquite	12,5
Mezcla de vitaminas	0,05
Mezcla de minerales	0,1
Vitamina C	0,21
Lecitina	1,04

(*) Otorga 39 ppm de astaxantina a la dieta

Fuente: Hernández-Rojas (2002)

Para elaborar la emulsión aceite:agua se preparó una dispersión acuosa de 12 g de goma de mezquite en 266 g de agua destilada y se agregó almidón de trigo (pregelatinizado) después de ser enfriado a temperatura ambiente. La pregelatinización se realizó mezclando la cantidad de almidón establecida en la tabla 5a con agua destilada fría suficiente para su suspender dicho material, calentando lentamente hasta formar un gel translúcido. La mezcla de almidón pregelatinizado y los demás ingredientes se mantuvieron en agitación en un homogenizador a una velocidad de 30 000 rpm.

La fase acuosa se colocó en un vaso de 2000 mL donde se agregaron gota a gota 22,65 g de fase oleosa junto con la lecitina, agitando a una velocidad de 15 000 rpm hasta obtener una mezcla homogénea para asegurar buenas características de flujo y de mezclado. Después se incorporó el suero de leche, la mezcla de vitaminas y minerales y, por último, la vitamina C. La mezcla se dispersó empleando de nuevo el homogeneizador durante 5 min a temperatura ambiente a una velocidad máxima de 5000 rpm. La relación final de material encapsulante con respecto a la dieta 1 fue de 1:1.

La segunda microdieta experimental se diseñó de acuerdo con lo sugerido para *Litopenaeus schmitti* (Gaxiola, 1991). Sus ingredientes (tabla 5b) se dispersaron en una mezcla de 66% de goma arábiga, 17% de maltodextrina 10 DE y 17% de goma de mezquite, adicionando una cantidad de agua que permitiera obtener 25% de sólidos disueltos totales. La relación de material encapsulante con respecto a esta dieta fue de 3:1. Las suspensiones obtenidas con ambas formulaciones se deshidrataron

por aspersión utilizando un secador equipado con un atomizador rotatorio centrífugo. La tasa de alimentación del secador fue de 20 mL/min a 2,5 bar de presión de aire y una temperatura de entrada de $150 \pm 5^\circ\text{C}$ (Pedroza-Islas, Vernon-Carter, Durán-Domínguez y Trejo-Martínez, 1999).

Tabla 5b. Ingredientes de la dieta 2 para larvas de camarón

Ingredientes	Porcentaje (en masa)
Pescado fresco	28,1
Aceite de pescado pigmentado*	13,5
Camarón fresco	17,7
Levadura de cerveza	15,6
Harina de pescado	14,6
Almidón de trigo	1,6
Aceite de hígado de bacalao	2,1
Aceite vegetal	2,1
Colesterol	0,5
Mezcla de vitaminas	1,05
Mezcla de minerales	1,6
Vitamina C	0,5
Lecitina	1,05

(*) Otorga 18 ppm de astaxantina a la dieta

Fuente: Gaxiola (1991)

Evaluación de morfología y estructura interna de las microcápsulas

La evaluación de la morfología y la estructura interna de las microcápsulas se determinaron por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB) usando dos técnicas —electrones secundarios y electrones retrodispersados— (Sheu y Rosenberg, 1998). Se colocó una pequeña cantidad de las microcápsulas en un soporte para muestra provisto de una cinta de grafito con doble adhesivo. Posteriormente, se recubrió la muestra con una delgada capa de oro grado analítico en un aparato de rociado a vacío bajo las siguientes condiciones: recubrimiento por rociado usando aire a presión a 50 militorr y con una corriente de 25 miliamperios durante 120 s. Se observó en el microscopio a 15 kV y 20 kV con aumentos de 300X, 1000X, 1500X, 5000X, 7200X con electrones retrodispersados. Para examinar la estructura interna de las microcápsulas, las muestras se colocaron en el portamuestras del MEB, se fracturaron con la ayuda de una navaja delgada golpeando perpendicularmente, se recubrieron

con una capa de oro como se explicó anteriormente y se observó al microscopio (Young et al, 1993).

Determinación de la estabilidad oxidativa de los pigmentos microencapsulados

Para determinar la estabilidad termooxidativa del aceite contenido en las microcápsulas se utilizó una técnica termoanalítica, la calorimetría diferencial de barrido en régimen dinámico (DSC). Se pesaron de 1 a 1,5 mg de muestra y se colocaron en una cápsula de aluminio hermético con tapa invertida a la cual se le realizó una perforación superior central estandarizada para permitir la entrada de aire. El intervalo de calentamiento fue de 150 a 500°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min y un flujo de aire de 20 mL/min (Litwinienko et al, 1995; Pedroza-Islas, 2000).

A partir de las curvas de calentamiento obtenidas se estableció la temperatura máxima de la exoterma de oxidación de cada muestra a la velocidad de calentamiento sugerida. Se calcularon los parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius de acuerdo con el modelo de orden n integrado en el software del equipo (Mettler Toledo Thermal Analysis) en función de la temperatura y la velocidad de la reacción:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_o \times \exp \frac{-Ea}{RT} \times (1-\alpha)^n \quad (4)$$

donde $\frac{d\alpha}{dt}$ es la velocidad de la reacción (min^{-1}), k_o es el factor preexponencial, Ea es la energía de activación (kJ/mol), R es la constante general de los gases ($8,31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T es la temperatura (K), α es el factor de conversión de la reacción y n es el orden de la reacción.

Siguiendo el procedimiento propuesto por la ASTM E698-79 (2001) se calculó la constante de la velocidad de reacción (k) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k = k_o \times \exp \frac{-Ea}{RT} \quad (5)$$

Finalmente, se determinó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) para cada una de las dietas:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

Análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas

Se realizó un análisis bromatológico de las dietas 1 y 2 (determinación de humedad, cenizas, proteína, grasa, fibra cruda e hidratos de carbono por diferencia) según lo establecido por la AOAC (2000).

Extracción de pigmentos carotenoides a partir de las dietas microencapsuladas empleando un sistema éter de petróleo, acetona y agua

Se efectuó una extracción de pigmentos siguiendo la técnica propuesta por Cañipa-Morales (1994) introduciendo modificaciones de acuerdo con las condiciones de la muestra. Se colocó 1 g de dieta en un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio y se añadieron 22,5 mL de acetona, 4,5 mL de agua y 3,0 mL de éter de petróleo. Se adicionaron perlas de ebullición, se tapó el tubo y se mantuvo la mezcla en agitación sobre un vórtex durante 30 min. Al terminar la extracción, se filtró con papel filtro al vacío. La muestra se lavó sobre el papel con una pequeña porción de éter de petróleo hasta que este se observó completamente claro.

El filtrado se lavó con 30 mL de éter de petróleo en un embudo de separación agitando con fuerza para lograr separar los pigmentos en la fase etérea y colectar el agua y la acetona en la fase acuosa. Esto se realizó tres veces hasta que ambas fases quedaron lo más claras posible. Mientras, se fue recolectando la fase etérea en otro embudo de separación al que se añadió 5 mL de agua destilada a fin de remover el resto de acetona. Posteriormente se adicionó a dicha fase sulfato de sodio anhidro para remover los restos de agua. Se dejó así durante toda la noche y al día siguiente la fase etérea se filtró en un embudo de porcelana con papel filtro cubierto de sulfato de sodio anhidro al vacío. El filtrado se evaporó a sequedad con un roto-evaporador a 40°C y 20 rpm. Finalmente, el residuo se diluyó con 5 mL de éter de petróleo.

Identificación y cuantificación de pigmentos en las microdietas

La identificación se realizó por medio de cromatografía en capa fina para separar los pigmentos carotenoides sobre placas de gel de sílice, donde se aplicaron aproximadamente 20 mL de extracto diluido en éter de petróleo. La elución de las muestras se realizó en una fase móvil que contenía éter de

petróleo:acetona (85:15) en una cámara sobresaturada. La identificación se llevó a cabo empleando un estándar de astaxantina de Sigma para comparar el R_f de este pigmento con el de aquellos obtenidos por medio de la extracción con éter de petróleo, acetona y agua. La cuantificación final se efectuó en el espectrofotómetro a 470 nm, que es la longitud de onda para dicho pigmento en el disolvente empleado. El contenido de pigmento total se reportó como astaxantina según la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{g de astaxantina}}{\text{g de dieta}} = \frac{A \times D \times 10^6}{100 \times d \times G \times E_{1\%1\text{cm}}^1} \quad (7)$$

donde A es la absorbancia a 470 nm, D es el volumen total de disolvente empleado (mL), G es la masa de dieta (g), d es el ancho de la celda (1 cm) y $E_{1\%1\text{cm}}^1$ es el coeficiente de extinción para astaxantina en éter de petróleo (2400).

Bioensayo con larvas de Litopenaeus vannamei

Unidades experimentales. Esta fase se realizó en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Mar (UMAR), ubicado en Puerto Ángel (Oaxaca, México). El sistema representó una simplificación del Larvatrón descrito por Jackson et al (1992). Se utilizaron treinta recipientes de vidrio de fondo esférico equipados con tubos de vidrio, los que proveyeron una suave aireación (2-3 burbujas de aire por segundo) con el objeto de mantener una circulación constante del agua y saturación de oxígeno disuelto.

Las unidades experimentales (UE) se colocaron en un baño de agua termostáticamente controlado a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Se utilizó agua de mar como medio de cultivo, obtenida a una distancia de 8 km de la playa y doblemente filtrada con un filtro de cartucho de 5 mm. Durante los experimentos no se realizaron recambios de agua (Jones et al, 1997; Medina, 1998). Se manejó un fotoperíodo de 12:12 h (luz-oscuridad). La intensidad luminosa se mantuvo a $4,7 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ como condición de luz.

Diseño experimental para la cría larvaria de camarón. Se tomaron nauplios en estadio larval N-III (camarón blanco, disponible gracias a la producción en el laboratorio de larvas de Industrias PECIS S.A. de C.V. de Sisal, Yucatán) y fototácticamente activos del tanque de aclimatación (29°C). Se

sembraron en las UE a una densidad de 150 nauplios/L, las cuales se llenaron a 1,5 L.

La asignación de los tratamientos y sus repeticiones se realizaron por quintuplicado aleatoriamente dentro del baño de agua. Para la dieta 1 se inoculó un tratamiento con una dosis única inicial de microalgas vivas (DUIM) a una concentración de 50 cel/mL y otro donde se proporcionó una dosis diaria de microalgas (DDM) a una concentración de 10 cel/mL. El mismo procedimiento se siguió con la dieta 2. Los controles se mantuvieron con una alimentación diaria de microalgas completando 100 cel/mL (Jones et al, 1997). Las DUIM, DDM y control se constituyeron con base en microalgas *Chaetoceros muelleri*, obtenidas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, cuyo seguimiento se realizó empleando la técnica de conteo directo.

Los tratamientos testigo se llevaron a cabo alimentando a las larvas con la formulación original de cada dieta sin la inclusión de aceite de pescado pigmentado. La identificación de los estadios larvales se determinó diariamente mediante la inspección ocular de los matraces (Kitani, 1986). Se adicionaron diariamente 10 mL de solución de EDTA a 30 ppm a todas las UE como agente quelante (Castille y Lawrence, 1981; Treece y Fox, 1993). Se pesaron 8 mgL⁻¹día⁻¹ de microdietas experimentales hidratándose en agua de mar por 3 min y se proporcionaron a los organismos a las 8:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas.

Cuando las larvas pasaron de N-III al subestadio de Mysis₁ (M_1) o Postlarva₁ (PL_1) a los 6 días de cultivo, se suspendió el experimento determinando el número de sobrevivientes (S) de cada réplica. Se tomaron aleatoriamente diez ejemplares de cada UE y se les midió la longitud del caparazón (LC) excluyendo el rostro, previa fijación en formol al 4%. Se calculó la masa seca individual (PSI) por triplicado en muestras de 10-20 organismos de cada réplica secados a 60°C por 36 horas.

Asimismo, se estableció el índice de desarrollo larval dividiendo A (valor del estadio por el número de larvas en ese estadio) por el número total de larvas identificadas (Villegas y Kanazawa, 1979; Villegas et al, 1980). El valor del estadio aumenta conforme la larva muda de Zoea₁ (Z_1) a M_1 o de Z_1 a PL_1 . También se estimó la tasa metamórfica (MR) como el porcentaje de M_1 o PL_1 presentes al final del experimento en cada tratamiento. Para fines de comparación y con base en la hipótesis de Knowlton (1974), se calculó el índice de desempeño larvario de cada tratamiento:

$$PLI_o = (PSI + LC) \times (S + ID) \quad (8)$$

donde PLI_o es el Índice de desempeño larvario, PSI es la masa seca individual (mg), LC es la longitud media del caparazón (mm), S es la supervivencia (%) y ID es el índice de desarrollo larvario (Medina et al, 2002).

Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos con cada dieta experimental se realizó empleando un análisis de varianza con un nivel de significancia de 5% (Zar, 1984). Se empleó el paquete Statgraphics de acuerdo con el instructivo del fabricante para analizar los datos experimentales y evaluar su confiabilidad, exactitud y precisión, así como determinar si existen diferencias entre ellos.

Resultados y discusión

Extracción de quitina y quitosana

CPD con MAC[®] y sonicación. Los resultados de los pulsos ajustados (0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 por segundo) durante el tiempo necesario y a las temperaturas en estudio (en agitación por 40 min a temperatura ambiente y a 45, 55 y 60°C) haciendo un seguimiento con IR (infrarrojo) y observando las bandas características para formación de quitina o quitosana indicaron que era posible obtener muestras con los dos compuestos a 0,5 pulsos/s y 10 y 15 min (M1 y M2) y a 0,7 pulsos/s y 10 min. Los rendimientos de quitina y quitina parcialmente desacetilada para esos tratamientos más efectivos fueron 0,2719 (M1), 0,4330 (M2), 0,7352 (M3) y 0,8804 (M4) g/g muestra inicial de CPD.

En esta primera parte se pudieron caracterizar por espectroscopía de infrarrojo cada una de las muestras en el diseño de experimentos de la tabla 3, pues cada uno de los tratamientos obtenidos presentó un espectro de infrarrojo diferente, como se explicará más adelante. Además, para cada muestra se midió la desacetilación; la caracterización por IR no es totalmente confiable, ya que las bandas de quitina y quitosana son muy similares por sus grupos funcionales y, además, el contenido de agua presente no permite que la frecuencia de los grupos funcionales de ambos biopolímeros se defina (caracterización de M3). Por otro lado, el grado de desacetilación brinda la pauta para saber si se está formando quitosana a partir de quitina por la identificación de grupos amino libres.

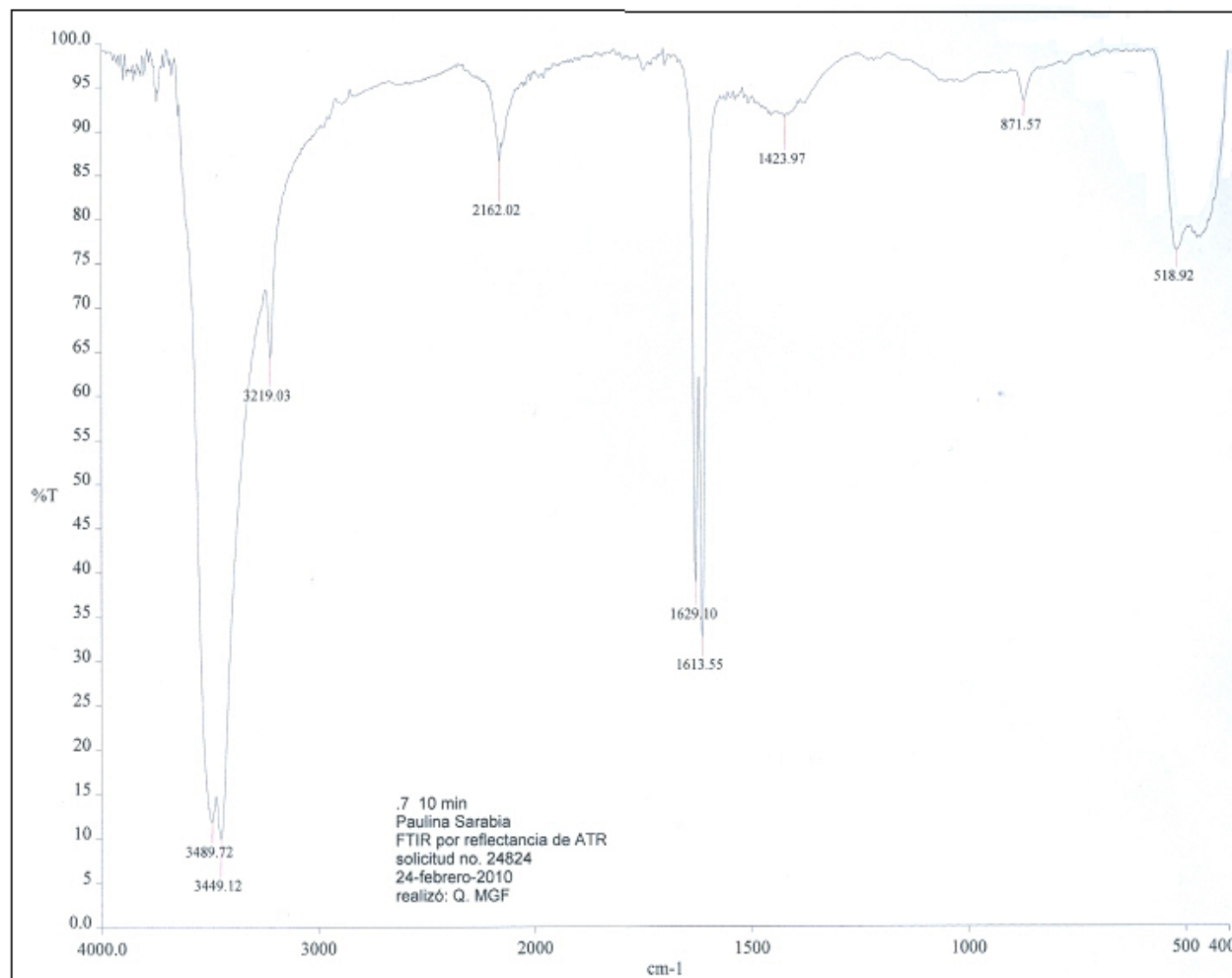
Como se mencionó en la metodología, las muestras obtenidas M1, M2 y M3 que presentaron los

resultados esperados para la obtención de mezclas de quitina y quitosana (quitina parcialmente desacetilada) se caracterizaron mediante IR y desacetilación para determinar su grado de desacetilación. Se obtuvieron gráficos de valores de pH respecto al volumen añadido de NaOH, igual que del blanco (sin muestra) y de un control de quitina comercial Sigma.

Caracterización de M3

De acuerdo con los tratamientos realizados, se pudieron obtener resultados para la posible obtención de mezclas de quitina y quitosana con las siguientes condiciones: M3 (muestra); 10 min (tiempo de máxima exposición al sonicador); 0,7 pulsos/s (sonicación); 0,7352 g muestra /g CPD.

Antes que la muestra M3 fuera identificada por su desacetilación o IR, se colocó en un humidificador para que el disolvente MAC[®] en el que se encuentra disuelto el biopolímero absorbiera la mayor cantidad de agua y solubilizara los iones calcio del complejo biopolímero-calcio, pudiendo así retirar la mayor cantidad del metal y de metanol para que no interfieran en su caracterización.

Figura 5. Espectro de infrarrojo para caracterización de M3

Fuente: elaboración propia (2010)

Debido a que la quitina y la quitosana contienen grupos hidrofílicos, tales como $-OH$ o $-NH_2$, estos biopolímeros tenderían a presentar gran cantidad de agua ligada con picos característicos en $1640,3\text{ cm}^{-1}$ o agua libre con vibraciones correspondientes en el IR en $1655,8\text{ cm}^{-1}$ (Velázquez del Valle, Martín Polo y Herrera Gómez, 2000). Esto no permitiría la identificación de las bandas características del compuesto a caracterizar. Por ello, se realizaron lavados con metanol y éter etílico para quitar la mayor cantidad de agua ligada al biopolímero y visualizar las bandas de quitina o quitosana.

Así, en el espectro de la figura 5 sólo se aprecian cuatro bandas con mayor intensidad en la región de $3449,12\text{ cm}^{-1}$ asignadas al grupo $-OH$ característico de ambos biopolímeros, pues una aparece en

3444,0 cm^{-1} (Cañipa et al, 1994). La banda en 1613 y 1629 cm^{-1} se asigna al grupo $-\text{NH}_2$, presente en la quitosana y característico en 1656 (Cañipa et al, 1994) o en 1621 cm^{-1} (Hernández, Águila, Flores, Viveros y Ramos, 2009). La diferencia entre las bandas obtenidas experimentalmente y las encontradas en la bibliografía se puede deber a que las muestras fueron caracterizadas con calcio presente en la muestra; además, el contenido de agua ligada y agua libre no se encuentra presente, lo que provoca un desplazamiento distinto al mostrado en la quitosana comercial Sigma.

La banda en 3489,72 cm^{-1} se asigna al grupo N-H, característico de quitosana entre 3400 y 3500 cm^{-1} (Mármol, Gutiérrez, Páez, Ferrer y Rincón, 2004) y del grupo amida de la quitina. A mayor frecuencia, se asigna al grupo N-H teniendo un enlace sencillo, le permite más vibraciones entre sus átomos y, por tanto, aparece a mayor frecuencia en el espectro de infrarrojo. En la figura 5 se muestran los grupos característicos de quitina y quitosana. No obstante, no se puede definir si existe quitina parcialmente desacetilada, ya que no aparecen bandas del anillo piranósico del polímero, por lo que se decidió obtener el grado de desacetilación para determinar el porcentaje de grupos amino ($-\text{NH}_2$), característicos de la quitosana.

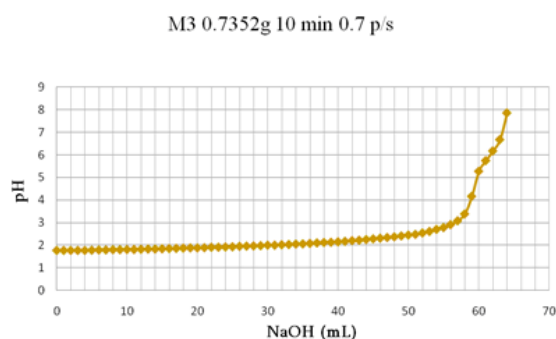
Grado de desacetilación de M3

La figura 6 muestra que los 0,7352 g obtenidos de M3 se titularon según el procedimiento señalado en la metodología para determinar el grado de desacetilación. El porcentaje de grupos amino ($-\text{NH}_2$) se obtiene mediante la cantidad de NaOH gastada que reaccionó primero con el ácido libre en la disolución y después, dado que debe desplazarse de la molécula de quitosana el anión cloruro unido al grupo amino libre. La quitosana precipita para quedar libre en un medio neutro, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y obtener una curva de pH con respecto al volumen de NaOH añadido con dos puntos de inflexión.

El primer y segundo puntos de inflexión son equivalentes a la titulación del exceso de ácido clorhídrico y al de la titulación de la quitosana protonada, respectivamente. La diferencia del volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite la determinación de la desacetilación (Hidalgo et al, 2008). En este procedimiento para determinar la desacetilación se encontraron un punto máximo y uno mínimo, lo que no necesariamente

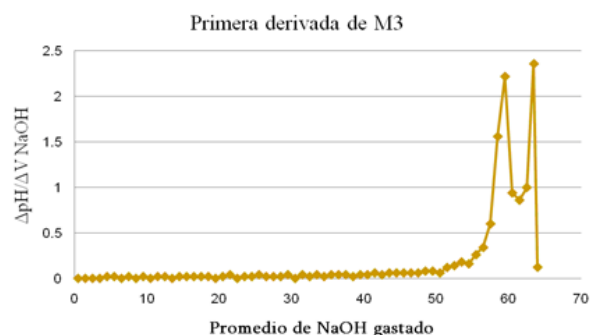
indica que existen grupos amino presentes en la muestra M3, pero pueden ser los que están ligados a la quitina parcialmente desacetilada o aminoácidos que no se retiraron en el procedimiento de desproteinización de CPD. Si estos aminoácidos de proteínas estuvieran presentes, entonces se observarían en el espectro de infrarrojo (figura 5) en $1204-1224\text{ cm}^{-1}$. Para determinar grupos amino presentes en la quitina parcialmente desacetilada se decidió obtener la primera derivada correspondiente a la titulación de la figura 6.

Figura 6a. Curva de titulación de la muestra M3 para determinar el porcentaje de grupos amino



Fuente: elaboración propia (2015)

Figura 6b. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M3



Primera derivada de M3

La tendencia mostrada por la curva obtenida permite encontrar los puntos de inflexión cuyos valores se determinaron por el criterio de la primera derivada, graficando $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ contra el promedio de NaOH gastado. Los picos representan el punto mínimo y máximo de la cantidad de NaOH gastado, los cuales pueden ser identificados en la curva de titulación (figura 6b) que corresponden al porcentaje de grupos amino ($-\text{NH}_2$) presentes en la muestra. Si se toman los puntos máximo y mínimo como $y = 63,5$ y $x = 59,5$ y se corresponden con la masa de M3 = 0,7352 g, entonces el porcentaje de grupos amino es de 8,75% (calculado de acuerdo a la ec. (1)), que es igual al porcentaje de desacetilación.

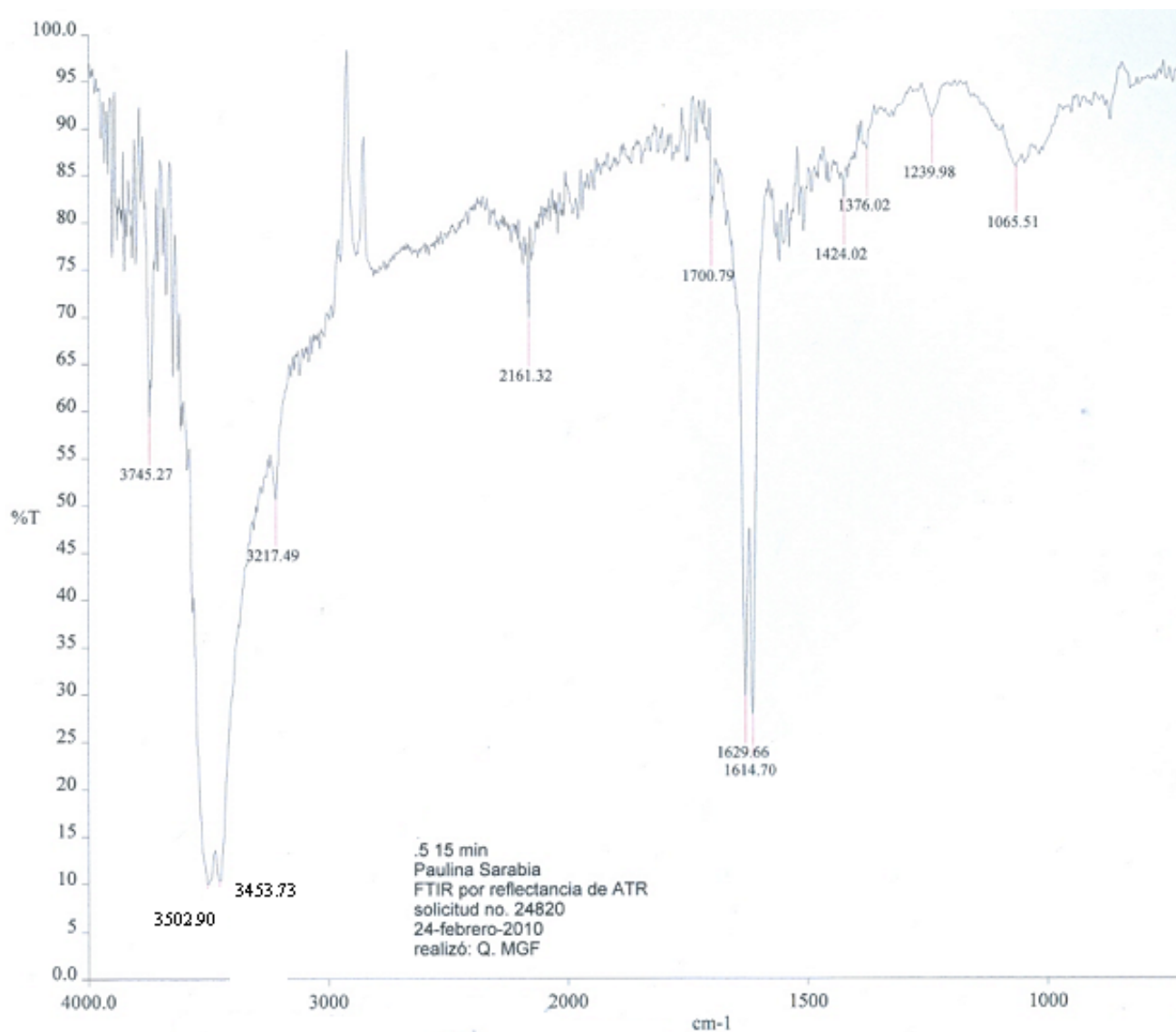
Dado que el porcentaje de grupos amino es bajo, es difícil la caracterización del biopolímero por

espectroscopia de infrarrojo; sin embargo, este método permite observar que, aunque hay un grado de desacetilación de quitina relativamente bajo, no hay grupos amino de proteínas. En la muestra M3 se encontraron en el análisis por IR grupos característicos de quitina y quitina parcialmente desacetilada. También se observó una relación entre la desacetilación y el criterio de la primera derivada para identificar solo y específicamente quitina parcialmente desacetilada. Otra cosa que se vio durante la titulación de la muestra M3 fue un precipitado a pH básico que, según Hidalgo et al (2008), puede ser quitosana, ya que precipita en medios neutros.

Caracterización de M2

Las condiciones para esta muestra fueron las siguientes: 15 min (tiempo máximo de exposición al sonicador); 0,5 pulsos/s (sonicación); 0,4330 g muestra/g CPD. Se caracterizó mediante espectroscopía de infrarrojo (figura 7). En ella, la banda presente en $3453,73\text{ cm}^{-1}$ se compara con otras en 3434 cm^{-1} (Hernández et al, 2009) y 3444 cm^{-1} (Cañipa et al, 1994) que corresponden al grupo -OH. El desplazamiento en $3502,90\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con el grupo N-H, el cual se caracteriza en 3400 y 3500 cm^{-1} (Mármol et al, 2004). La banda en 1629 cm^{-1} es característica del grupo $-\text{NH}_2$; cuando está ligado a la quitosana aparece en 1621 cm^{-1} (Hernández et al, 2009), 1647 cm^{-1} (quitosana Sigma) y 1656 cm^{-1} (Cañipa et al, 1994).

En M2 aparece la banda característica del anillo piranósico en 1065 cm^{-1} el cual se reporta en 1060 cm^{-1} (quitosana Sigma), 1070 cm^{-1} (Hernández et al, 2009) y 1074 cm^{-1} (Cañipa et al, 1994). Las bandas para quitina y el grupo $-\text{NH}_2$ correspondiente a la desacetilación de la quitina son visibles, al igual que las bandas del anillo aromático. Además, no se encuentran bandas características de aminoácidos.

Figura 7. Espectro de infrarrojo para la caracterización de M2

Fuente: elaboración propia (2010)

Grado de desacetilación de M2

La figura 8 muestra el grado de desacetilación para M2 con masa de 0,4330 g. De los datos obtenidos, que representan la titulación de la muestra, se obtuvo la primera derivada para determinar los puntos de inflexión máximo y mínimo. Por medio de la diferencia entre estos dos puntos, se calculó la cantidad de HCl consumido para protonar los grupos amino (Parada, Crespín y Miranda, 2004)

unidos a la quitina parcialmente desacetilada. Esto se puede asegurar ya que, como se muestra en la figura 8a, la espectroscopía de infrarrojo no presenta bandas correspondientes a aminoácidos de proteínas. Al igual que en M3, se buscó la coincidencia entre el grado de desacetilación y el criterio de la primera derivada.

Figura 8a. Curva de titulación M2 para determinar porcentaje de grupos amino ($-\text{NH}_2$)

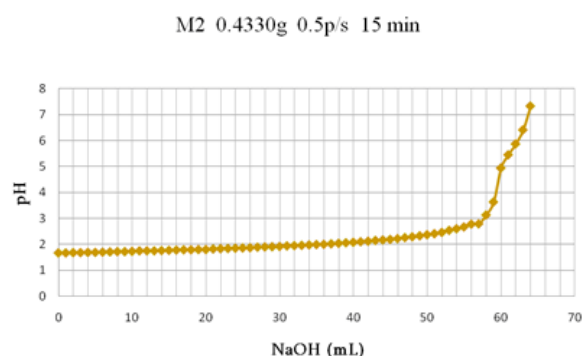
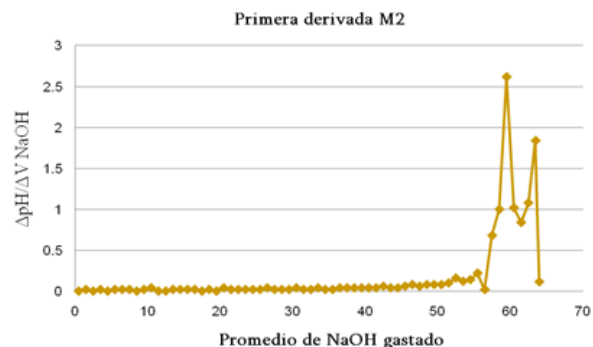


Figura 8b. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M2



Fuente: elaboración propia (2010)

Primera derivada de M2

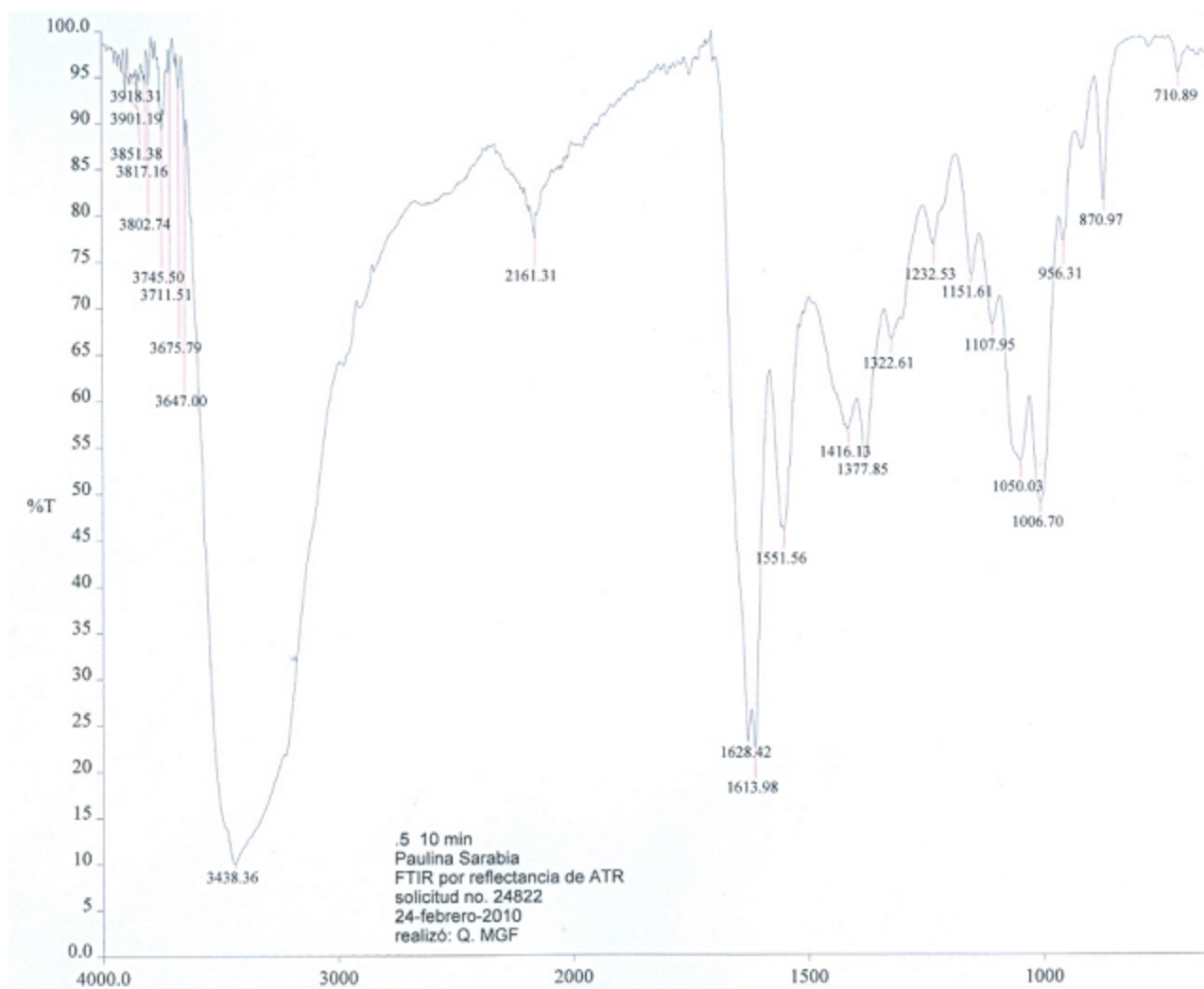
La figura 8b muestra la primera derivada de la curva de titulación (figura 8a) de la muestra M2. El porcentaje de grupos amino (14,87%) se determinó localizando los puntos $y = 63,5$ y $x = 59,5$ —que, al igual que en la curva de titulación, corresponden al máximo y mínimo, respectivamente— y tomando la masa de la muestra (0,4330 g) considerada pura, ya que durante el proceso de liofilización se retiró la mayor cantidad de disolvente MAC[®], especialmente la sal de calcio.

En M2, el porcentaje de desacetilación fue casi del doble que en M3 y, por esta razón, en la figura 7 aparece la banda del anillo piranósico. El grado de desacetilación para considerar que el biopolímero obtenido es quitosana debe ser mayor a 60% según la literatura (Pastor-de-Abram, 2004); allí se señala que esta desacetilación se puede lograr con la adición de hidróxido de sodio (Muzzarelli, 1985). En este caso se logra desacetilar parcialmente la quitina en M2 en casi 15% solo con metanol-agua-cloruro de calcio recuperables y sonicación. Asimismo, Ramos-Ponce (2009) indica que el procedimiento físico por microondas provoca la desacetilación parcial de la quitina entre 15 y 20%.

Caracterización de M1

Las condiciones de tratamiento para la muestra M1 son las siguientes: 10 min (tiempo máximo de exposición al sonicador); 0,5 pulsos/s (sonicación); 0,2719 g muestra/g CPD. Su caracterización mediante IR se muestra en la figura 9.

Figura 9. Espectro de infrarrojo para caracterización de M1



Fuente: elaboración propia (2010)

Como puede apreciarse, se presenta una banda muy ancha en $3438,36 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo -OH (Cañipa et al, 1994; Hernández et al, 2009) para la quitosana Sigma, lo que impide observar bandas de N-H y C-H. Aparece una señal en 1628 cm^{-1} relacionada con el grupo -NH_2 . Se observan

señales del anillo piranósico en 1050 cm^{-1} características en 1060 cm^{-1} (quitosana Sigma) y 1006 cm^{-1} del enlace C-O-C, identificados también en 1014 cm^{-1} (Hernández et al, 2009), 1026 cm^{-1} (quitosana Sigma) y 1030 cm^{-1} (Cañipa et al, 1994). Se manifiesta una banda en $1551,56\text{ cm}^{-1}$ perteneciente a una amida secundaria, grupo presente en la quitina.

Grado de desacetilación de M1

Se estableció el porcentaje de grupos amino de M1 por el método de titulación, obteniéndose la curva de la figura 10a. Asimismo, se obtuvieron los puntos máximo ($y = 61,5$) y mínimo ($x = 56,5$) mediante el criterio de la primera derivada (figura 10b).

Figura 10a. Curva de titulación de la muestra M1 para determinar el porcentaje de grupos amino ($-\text{NH}_2$)

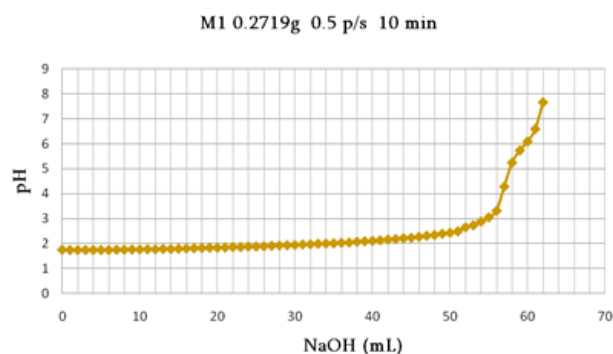


Figura 10b. Criterio de la primera derivada para determinar el punto máximo y mínimo de la curva de titulación de M1



Fuente: elaboración propia (2010)

Tomando los valores de estos puntos y de M1 (0,2119 g), el porcentaje de grupos amino en la muestra es de 29,6%. El porcentaje de desacetilación en M1 es mayor que en M2 y M3, lo que indica que existe un mayor grado de desacetilación en la quitina; esto también se puede comprobar al comparar el espectro de infrarrojo de M1, obtenido experimentalmente, con el correspondiente a la quitosana Sigma.

De las tres muestras caracterizadas se pudo observar que, a mayor grado de desacetilación, el espectro de infrarrojo de quitina parcialmente desacetilada se parece más a uno de quitosana comercial. Si existieran aminoácidos presentes en M1, tal como se observa en la figura 9 (región $1204\text{-}1224\text{ cm}^{-1}$), entonces no habría una secuencia en los puntos de la titulación para determinar el grado de

desacetilación. Así fue como se pudo comprobar que las condiciones de sonicación y tiempo son importantes para obtener quitina parcialmente desacetilada.

Datos experimentales de CPD con MAC-141[®] y sonicación más calentamiento a temperatura ambiente, 45°C, 55°C y 60°C

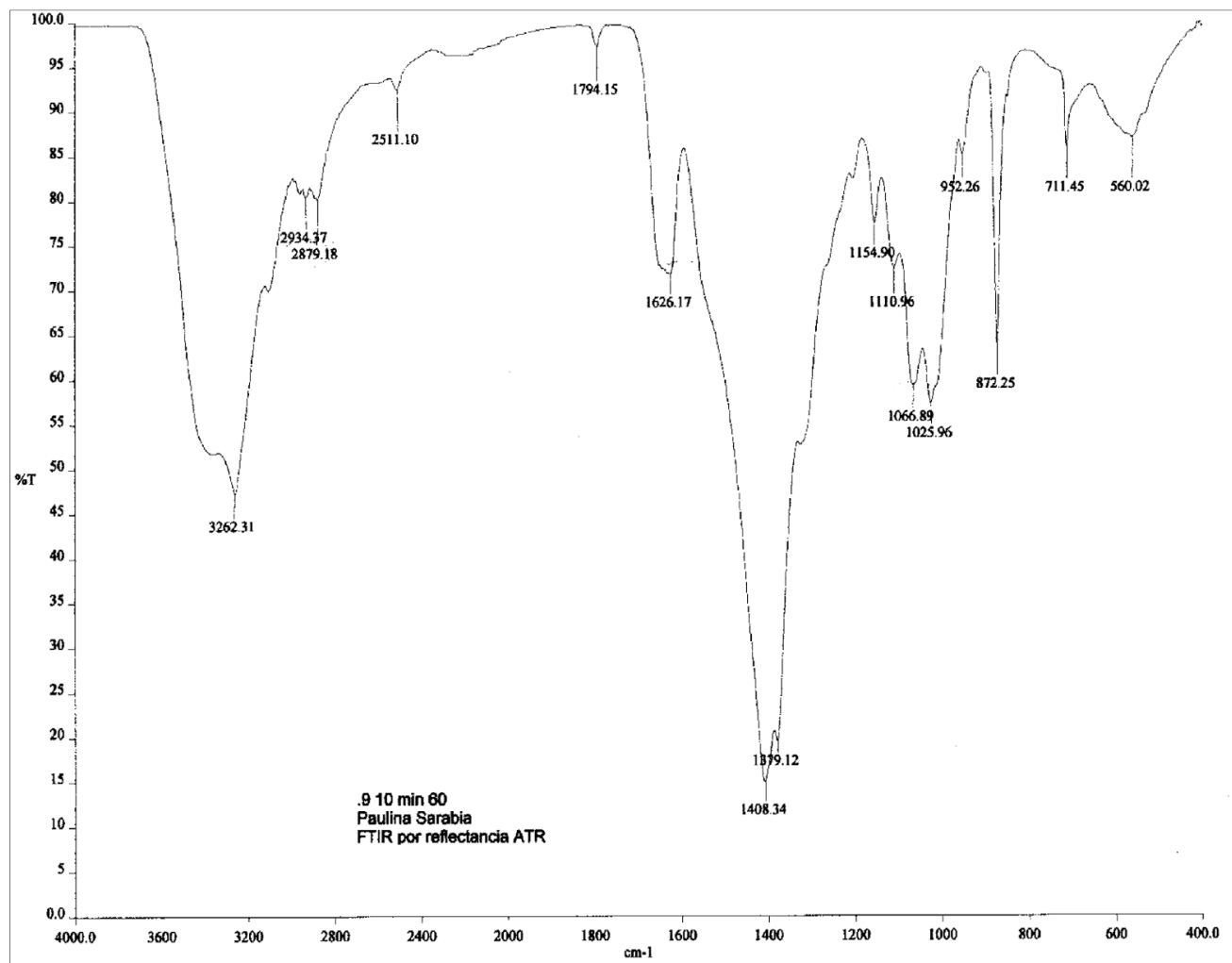
Las siguientes fueron las condiciones para la muestra M4: 0,8804 g (masa); 0,9 pulsos/s (sonicación); 10 min (tiempo máximo de exposición al sonicador); 60°C (tiempo de calentamiento).

Caracterización de M4

Se obtuvo quitosana con un porcentaje de desacetilación de 36,574%. Durante el procedimiento, se observó un precipitado al titular la muestra con hidróxido de sodio, lo cual sugiere que es quitosana, precipitando a pH neutro-básico. Este precipitado filtrado y seco fue identificado por IR (figura 11).

En este espectro se observan bandas características de quitosana en 3262,31 cm⁻¹, correspondiente al grupo N-H que aparece en 3254 cm⁻¹ (Hernández et al, 2009) y comparado con un espectro de quitina comercial Sigma en 3293,8 cm⁻¹. La banda en 2879,18 cm⁻¹ pertenece al grupo C-H de la quitosana que comúnmente aparece en 2873,62 cm⁻¹ (quitina Sigma) y en 2892 cm⁻¹ (Hernández et al, 2009). El grupo amino -NH₂ característico para quitosana se presentó en 1626,17 cm⁻¹ el cual, según Hernández et al (2009) y la quitosana Sigma, está vinculado a 1621 y 1647,10 cm⁻¹, respectivamente. Las bandas en 1066,89 y 1025 cm⁻¹, que conciernen al grupo piranósico y C-O-C, se aparecen en 1070 y 1014 cm⁻¹ (Hernández et al, 2009) y 1060 y 1026 cm⁻¹ (espectro Sigma).

En este último procedimiento se pueden apreciar bandas características de quitosana comparadas con espectros de la bibliografía y de la quitosana Sigma. Por ello, puede confiarse en que los tratamientos de M1 (10 min, 0,5 pulsos/s, MAC[®]) y M4 (10 min, 0,9 pulsos/s, 60°C, MAC[®]) permiten desacetilar la quitina. En procedimientos comunes para la desacetilación con hidróxido de sodio se requiere calentar la quitina a 100°C (Muzzarelli, 1985). En el caso de la muestra M4, llevada 60°C, este aumento de temperatura contribuye al incremento del grado de desacetilación cuando se compara con M1.

Figura 11. Espectro de infrarrojo para la caracterización de M4

Fuente: elaboración propia (2010)

Análisis estadístico de los datos

Empleando el programa Statgraphics versión 5.1 se determinaron los tratamientos con los que se obtuvo un mayor rendimiento en la obtención de las mezclas de quitina y quitosana.

Relación tiempo/radiación

La tabla 6a presenta la información evaluada estadísticamente.

Tabla 6a. Análisis estadístico de rendimientos de quitina (Q) y quitina parcialmente desacetilada (M) en g/1 g muestra inicial de CPD obtenidos por sonicación a diferentes pulsaciones y tiempo de proceso a temperatura ambiente

Tiempo (min)	Sonicación (pulsos/s) de CPD con disolvente MAC [®]			
	0,0; 0,3	0,5	0,7	0,9
0	0	0,1204 ± 0,1655 (Q)	0,5065 ± 0,7006 (Q)	0,4723 ± 0,4275 (Q)
5	0	0,3400 ± 0,096 (M1)	0,839 ± 0,1470 (M3)	0,236 ± 0,3050 (Q)
10	0	0,322 ± 0,156 (M2)	0,214 ± 0,268 (Q)	0,170 ± 0,2269 (Q)
15	0			

Fuente: elaboración propia (2015)

La relación de la variable pulsos por segundo en función del tiempo de tratamiento en la sonicación-disolución con MAC[®] mostró que el mayor rendimiento se logró mediante 0,7 pulsos/s durante 10 minutos, obteniéndose quitosana y quitina soluble (M3). Se realizó el análisis de medias para saber si existía diferencia significativa entre los rendimientos arrojados de los diferentes tratamientos; no obstante, evidenció que son similares a $p \leq 0,05$.

El análisis de varianza (*anova* en inglés), donde $F(anova) = 0,46$ y $P(anova) = 0,64$, confirma que no hay diferencia significativa en el rendimiento, es decir, se generan cantidades similares del biopolímero en todos los tratamientos. Después de 10 min de sonicación comienza a disminuir la extracción del biopolímero, lo cual puede deberse a que hay una degradación más pronunciada de este a medida que el tiempo de sonicación es mayor (Chen, Chang y Shyur, 1997).

Para saber si existía una diferencia significativa entre estos tres tratamientos con respecto a los pulsos por segundo se llevó a cabo una comparación de medias y un análisis de varianza. Se observó que no hubo diferencias significativas en el rendimiento, con valores de $P = 0,53$ y $F = 0,68$. Esto indica que al menos un tratamiento de pulsos por segundo es diferente, 0,7 pulsos/s, y que, por tanto, el efecto de sonicación es más efectivo a esta radiación.

Sonicación de CPD con disolvente MAC[®] a temperatura ambiente, 45, 55 y 60°C

Después del tratamiento por ultrasonido a 0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 pulsos/s durante 0, 5, 10, 15 min a temperatura ambiente, cada una de las muestras se calentó durante 40 min a 45, 55 y 60°C para provocar la reacción de desacetilación de la quitina en presencia del disolvente MAC[®]. Se puede observar en la tabla 6b que la única muestra para la que se obtiene quitina parcialmente desacetilada es

M4 con tratamiento de 0,9 pulsos/s, 10 min y calentamiento a 60°C por 40 min; para aquellas a 0,5; 0,7 y 0,9 pulsos/s (en negrita) no presentaron desacetilación, aun cuando sus rendimientos eran iguales o incluso más altos.

Tabla 6b. Datos de rendimientos de quitina y quitosana parcialmente desacetilada (M) en g/1 g muestra inicial de CPD, obtenidos por sonicación a diferentes pulsaciones durante tres tiempos a tres temperaturas

Muestras (quitina-MAC)	Agitación 40 min		
	45°C	55°C	60°C
0,3 pulsos/s			
5, 10, 15 min	0	0	0
0,5 pulsos/s			
5 min	0,1935	0,8424	0,4443
10 min	0,7393	0,4382	0,9241
15 min	0,5759	0,6064	0,6911
0,7 pulsos/s			
5 min	1,0408	0,1507	0,3101
10 min	0,4808	0,6864	0,3161
15 min	0,6604	1,5000	0,6992
0,9 pulsos/s			
5 min	0,3312	0,6821	0,9741
10 min	0,6474	0,7064	0,8804 (M4)
15 min	0,2470	0,2633	0,2540

Fuente: elaboración propia (2015)

Propuesta para corroborar el mecanismo de reacción de la desacetilación de la quitina

Flores-Ortega (2004), vinculado a nuestro grupo de investigación, extrajo quitina por métodos ecológicos mezclando CPD con disolvente MAC[®] (figura 12). A partir de la anterior propuesta, se llevó a cabo la misma reacción, pero ahora utilizando de modo simultáneo la sonicación (figura 13). Como se muestra en la figura 12, se mezcló 1 g de CPD con 10 mL de MAC[®] y se sonicó a 0,3; 0,5; 0,7 y 0,9 pulsos/s durante 5, 10 y 15 min. Las muestras también se calentaron a 45, 55 y 60°C. Se obtuvieron paralelamente mezclas de quitosana y la propia quitina del CPD que no se descompuso. Por tanto, parece ser que la sonicación sí tiene un efecto sobre los enlaces C-N del grupo amida de la quitina (Liu, Du y Kennedy, 2007; Tsaih y Chen, 2003).

Figura 12. Extracción de quitina por métodos ecológicos

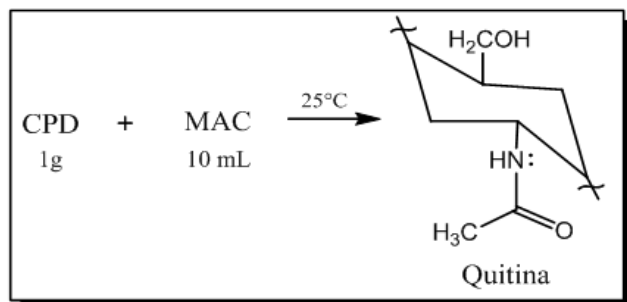
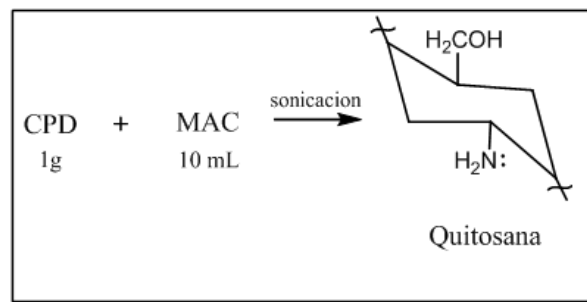


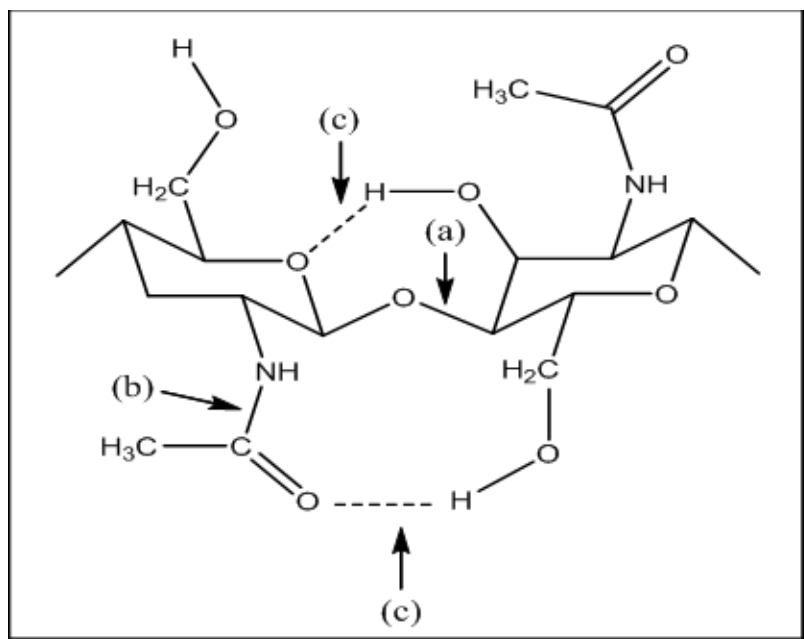
Figura 13. Extracción de quitina y su desacetilación a quitosana utilizando sonicación



Fuente: elaboración propia (2015)

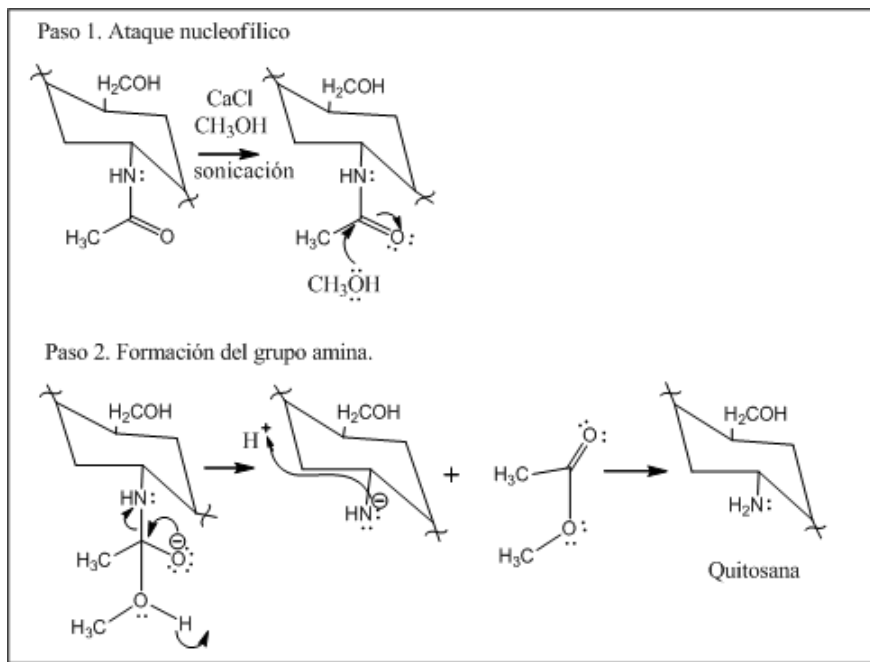
La energía de sonicación es específica sobre algunos enlaces de los grupos funcionales que se encuentran en la quitina. Si la reacción de hidrólisis de amidas se lleva a cabo por el ataque de un nucleófilo —como lo es el grupo -OH— y la subsiguiente eliminación del ion amina ($\bar{\text{N}}\text{H}_2$), se propone el siguiente mecanismo de reacción. En el primer paso ocurre un ataque nucleofílico del -OH del metanol al carbono del grupo amida presente en la quitina formando un catión inestable del oxígeno. En una segunda etapa, el oxígeno recuperaría su estabilidad, pues la densidad electrónica regresa al carbono del grupo amida y, debido a la energía generada por la cavitación de las burbujas del mismo disolvente, el enlace C-N se rompe para formar posiblemente acetato de metilo y el catión $\bar{\text{N}}\text{H}$ que, posteriormente, se protonaría para constituir el grupo amino (-NH₂) característico de la quitosana (figuras 14 y 15). Esto deberá corroborarse en una siguiente etapa de la investigación.

Figura 14. Posibles sitios en los que actúa el ultrasonido: (a) β -1,4-enlace glucosídico, (b) acetamido y (c) enlace de hidrógeno por energía de cavitación durante la reacción de ultrasonido



Fuente: elaboración propia (2015)

Figura 15. Propuesta de mecanismo de reacción para la obtención de quitosana por sonicación



Fuente: elaboración propia (2015)

Repetibilidad experimental para las muestras identificadas como quitina parcialmente desacetilada en el tratamiento MAC-141© con sonicación

En la evaluación de la repetibilidad de los procedimientos para la desacetilación parcial de la quitina se obtienen valores bajos de los porcentajes ya que, durante el procedimiento de sonicación, el disolvente presenta evaporación y se da la incrustación de las sales de cloruro de calcio (tabla 7). El agua y el metanol —que tiene un punto de ebullición menor— se evaporan, lo cual no permite que el grupo -OH de este protone al grupo amida de la quitina pues, como ya se mencionó, la hidrólisis tiene lugar debido a la sonicación y sí parece existir un efecto sobre el enlace C-NH de dicho grupo.

El átomo de hidrógeno del grupo -OH o de agua protona al grupo amida de la quitina, tal como lo hace este mismo átomo del NaOH en el método químico para la desacetilación de la quitina (Sarabia-Bañuelos, 2012). Las pruebas de repetibilidad mostradas en la tabla 7 arrojan valores de desacetilación de 3 a 8% y, aunque relativamente bajos, son comparables a los obtenidos por métodos enzimáticos (0,5-9,5%) (Ramos-Ponce, 2009) y otros (Sarabia-Bañuelos, 2012).

Tabla 7. Resultados de repetibilidad para tratamientos con MAC-141 y sonicación

Muestra	Pulsos/s	Tiempo (min)	% desacetilación	Masa (g)	Relación % desacetilación/masa
1	0,7	10	3,4132	0,9434	3,61798
2	0,7	10	3,2200	1,5000	2,14667
3	0,5	10	3,3207	1,4545	2,28305
4	0,5	10	7,8882	0,4082	19,32435
5	0,7	10	3,4000	0,9434	3,603986
6	0,7	10	3,8618	0,8338	4,63157

Fuente: elaboración propia (2015)

Solubilidad de las muestras de quitina parcialmente desacetilada

La tabla 8a presenta las pruebas de solubilidad de la muestra M4 obtenida a 0,9 pulsos/s durante 10 min a 60°C por 40 min en ácidos concentrados y diluidos. La solubilidad en los primeros corresponde a la solubilidad característica de quitosana mostrada en la tabla 6 con respecto a HCl concentrado (No et al, 2007), a excepción del ácido acético concentrado.

Cuando se realizan pruebas de solubilidad de M4 para ácidos diluidos, la quitosana es parcialmente

soluble en HCl; esto es favorable, pues la quitosana es soluble en HCl y parcialmente soluble en H₂SO₄ en el cual debería ser insoluble. La solubilidad en ácido fórmico concuerda con lo reportado en la tabla 4, pero existe insolubilidad en ácido acético; esto último es contradictorio, ya que la quitosana es soluble en ácidos diluidos, principalmente de ácido acético (No et al, 2000; Cartaya, Peniche y Reynaldo, 2009). Esta disparidad de la solubilidad del biopolímero se debe a que la mezcla no está completamente desacetilada, lo que provoca cambios en su reactividad y, por lo tanto, en la solubilidad en los diferentes disolventes. Así, la solubilidad depende del grado de desacetilación.

Tabla 8a. Pruebas de solubilidad de M4 (0,9 pulsos/s, 10 min, 60°C, 0,0411 g)

Tubo	Masa (g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0,0014	HCl	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observa una sola fase ➤ No presenta turbidez ➤ Se disolvió completamente la muestra ➤ No hay cambio de color en el disolvente
2	0,0011	H ₂ SO ₄	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observa un cambio de color en el disolvente ➤ Se ve opaco (no permite el libre paso de la luz) ➤ Muestra una sola fase ➤ Se disolvió completamente la muestra
3	0,0014	CH ₂ O ₂	Concentrado	Parcialmente soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ve turbio el tubo ➤ Presenta dos fases, una líquida y una de grumos gelatinosos ➤ Se disolvió parcialmente
4	0,0014	CH ₃ COOH	Concentrado	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ven dos fases, una sólida y una líquida ➤ No solubilizó la muestra
5	0,0015	HCl	2%	Parcialmente soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ven dos fases, una sólida y una líquida ➤ La muestra sólida inicial era mayor antes de la agitación, por lo que se considera parcialmente soluble
6	0,0011	H ₂ SO ₄	2%	Parcialmente soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ven dos fases, una sólida y una líquida ➤ Reducción del tamaño de la fase sólida después de la agitación, por lo que se considera parcialmente soluble
7	0,0012	CH ₂ O ₂	2%	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ven dos fases, una sólida y una líquida ➤ Muestra insoluble
8	0,0013	CH ₃ COOH	2%	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se ven dos fases, una sólida y una líquida ➤ Muestra insoluble

Fuente: elaboración propia (2015)

Tabla 8b. Pruebas de solubilidad de M1 (0,5 pulsos/s, 10 min, temperatura ambiente, 0,0127 g)

Tubo	Masa (g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0,0016	HCl	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observa una sola fase ➤ Se disolvió completamente ➤ No hay cambio de color en el disolvente
2	0,0019	H ₂ SO ₄	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se disolvió completamente ➤ Se alteró aparentemente la viscosidad del disolvente, ➤ El disolvente se ve opaco
3	0,0011	CH ₃ COOH	Concentrado	Parcialmente insoluble	Cambio el color del disolvente (de transparente a translúcido), aunque no es muy evidente: por ello, se considera casi insoluble.
4	0,0012	HCl	2%	Parcialmente insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Parcialmente soluble ➤ Disminución del tamaño de la muestra sólida ➤ Dos fases (líquida/sólida) ➤ Fase líquida transparente
5	0,0018	H ₂ SO ₄	2%	Parcialmente insoluble	Parcialmente soluble, pero menos que el tubo 4 y más que el tubo 3
6	0,0016	CH ₂ O ₂	2%	Parcialmente insoluble	Similar al tubo 4
7	0,0018	CH ₃ COOH	2%	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Totalmente insoluble ➤ No muestra cambios después de adicionar el disolvente ➤ La muestra permaneció intacta

Fuente: elaboración propia (2015)

Tabla 8c. Pruebas de solubilidad de M3 (0,7 pulsos/s, 10 min, temperatura ambiente, 0,4710 g)

Tubo	Masa (g)	Disolvente	Concentración	Solubilidad	Características
1	0,0010	HCl	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observa una sola fase ➤ Se disolvió completamente ➤ Transparente ➤ No hay cambio de color en el disolvente
2	0,0015	H ₂ SO ₄	Concentrado	Soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observa una fase opaca ➤ Se disolvió completamente ➤ Cambio de color ➤ El disolvente pasó de transparente a translúcido
3	0,0018	CH ₃ COOH	Concentrado	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ No se disolvió ➤ Se ven dos fases (líquida/sólida) ➤ La fase sólida pertenece a la muestra que no solubilizó y la líquida al disolvente
4	0,0015	HCl	2%	Parcialmente soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observó una disminución de la muestra, lo que hace suponer que una fracción se disolvió ➤ Dos fases (líquida/sólida)
5	0,0012	H ₂ SO ₄	2%	Parcialmente soluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Parcialmente soluble, pero en menos cantidad que el tubo 4 ➤ Existe una disminución de muestra sólida
6	0,0012	CH ₂ O ₂	2%	Parcialmente soluble	Parcialmente soluble, similar al tubo 4
7	0,0010	CH ₃ COOH	2%	Insoluble	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Insoluble ➤ Dos fases (líquida/sólida) ➤ No hay disminución de la muestra sólida

Fuente: elaboración propia (2015)

Tanto en la muestra M1 (0,5 pulsos/s, 10 min) como en la M3 (0,7 pulsos/s, 10 min), que aparecen en las tablas 8b y 8c, se presentan discrepancias con respecto a lo reportado en la tabla 4 debido a que se tienen mezclas de quitina y quitosana y no corresponden a la solubilidad de esta última con más de 60% de desacetilación.

Reaprovechamiento de las carotenoproteínas

Considerando lo discutido anteriormente respecto a la extracción de pigmentos carotenoides con aceite y tomando en cuenta las formulaciones de las dietas para larvicultura según el diseño de experimentos preliminares planteado en la metodología, se empleó el aceite pigmentado obtenido con una proporción de subproducto de cefalotórax/exoesqueleto y aceite de 1:5 para tener una cantidad de pigmento suficiente en el extracto oleoso.

Aunque en este estudio se corroboró que con una proporción de 1:10 se obtiene la máxima cantidad de pigmento respecto al resto de los tratamientos, se estimó que, para este experimento, era mejor emplear una cantidad de aceite tal que permitiera tener un balance lipídico adecuado en las dietas. Es importante aclarar que el aceite pigmentado se sustituye por todos o algunos de los ingredientes lipídicos de las fórmulas originales de las dietas (figura 16).

Figura 16. (a) Muestras de aceites vegetales (1) y de pescado (2) usados en pruebas preliminares; (b) aceite pigmentado

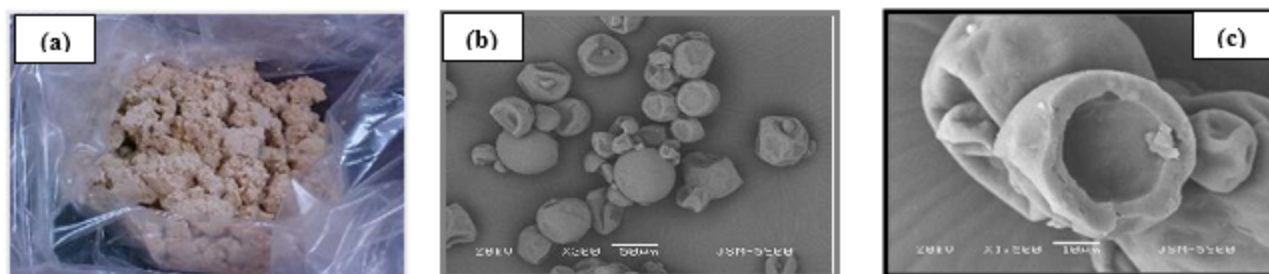


Fuente: elaboración propia (2015)

Evaluación de morfología y estructura interna de las dietas microencapsuladas

La figura 17 (a,b,c) presenta las microcápsulas con el aceite pigmentado empleando la mezcla de gomas. Allí se puede ver que la apariencia de las microcápsulas en la dieta 1 es muy heterogénea, ya que se apreciaron características variables principalmente en la distribución del tamaño de partícula y la topografía. La morfología resultó prácticamente esférica, aunque es de notarse que algunas partículas adquieren esta forma con superficie lisa, mientras que en la mayoría pudo apreciarse una superficie irregular con presencia de indentaciones; esto se atribuyó a las propiedades del material encapsulante y a los fenómenos inherentes a la deshidratación por el proceso empleado (Ré, 1998). Ocasionalmente se encontraron defectos representados fundamentalmente por agujeros, lo que indicó que la proporción del material encapsulante no fue suficiente para recubrir las partículas (Pedroza-Islas et al, 1999).

Figura 17. Dieta secada por aspersión en diferentes tamaños: (a) normal, (b) 50 μm , (c) 10 μm



Fuente: elaboración propia (2015)

En las microfotografías se observaron algunas de las cápsulas esféricas y con superficie lisa. Esto concuerda con lo reportado por Espinoza-Herrera (2002) para dietas microencapsuladas con pared de proteína-polisacárido, donde se encontró que a medida que se incorpora una mayor cantidad de proteína concentrada de suero de leche en una mezcla con goma de mezquite, la superficie de las microcápsulas se vuelve más tersa y se observan menos agujeros.

La microestructura interna de las microcápsulas exhibe la distribución de la grasa en las paredes de la microcápsula, que fue heterogénea, sugiriendo una inestabilidad de la emulsión durante el proceso de secado. Cabe recordar que el contenido de lípidos en esta formulación fue considerable (23,3%) y, aunque se incluyó lecitina, la proporción de esta tampoco fue suficiente para lograr una buena estabilidad. La presencia de gotas de grasa grandes junto con otras menores indica algún grado de

coalescencia entre ellas. Espinoza-Herrera (2002) encontró el mismo tipo de comportamiento para productos microencapsulados con suero de leche donde la proporción encapsulante y encapsulado fue de 1:1. También demostró el mismo efecto cuando utilizó un concentrado de proteínas de suero de leche con 34% de proteínas.

Las microcápsulas correspondientes a la dieta 2 tienden a ser más esféricas, con tamaños de partícula más regulares y con superficie lisa, aunque también se presentaron partículas de superficie dentada y arrugada. En este caso, los agentes encapsulantes fueron una mezcla de polisacáridos en una proporción de 3:1 con respecto a la dieta (66% de goma arábica, 17% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE). Tanto la goma arábica como la de mezquite exhiben propiedades emulsificantes y estabilizantes de sistemas de aceite en agua (Islam, Phillips, Sljivo, Snowden y Williams, 1997; Vernon-Carter et al, 1996, 1998) y ello, aunado a una alta proporción en la mezcla con la dieta, produjo un sistema más estable lo que se reflejó en la microestructura de las microcápsulas obtenidas.

Se ha reportado en diversos estudios que la goma arábica tiene una excelente capacidad emulsificante y encapsulante, lo que se relaciona con su alta masa molecular y la presencia de una fracción proteínica que interactúa en la interfase para favorecer la formación de multicapas, con lo que se incrementa su idoneidad para estabilizar emulsiones. Este efecto se ve aumentado con la adición de goma de mezquite, que muestra características similares tomando en cuenta que se ha sugerido que tiene un mayor porcentaje de proteína respecto a la goma arábica (Vernon-Carter et al, 1998).

La maltodextrina, cuya masa molecular es mucho menor que la de las gomas (1800 g/mol), colabora en la estructura; sin embargo, no posee capacidad emulsificante (Kenyon y Anderson, 1988), así que la estabilidad del sistema aceite-agua puede atribuirse principalmente a las gomas. La microestructura interna de estas microcápsulas presenta una superficie lisa, compacta, con los glóbulos de grasa de tamaño diminuto y distribuidos uniformemente. Este tipo de pared reveló mayor eficiencia de encapsulación de grasas (Pedroza-Islas, 2000).

Determinación de la estabilidad oxidativa de los pigmentos encapsulados

De las curvas de flujo de calor (mW) contra temperatura (°C) se obtuvieron los parámetros cinéticos correspondientes para las dietas microencapsuladas. De acuerdo con los resultados obtenidos

y mostrados en la tabla 9 se puede observar que la dieta 2 tuvo una mayor resistencia a la degradación termo-oxidativa, ya que la energía de activación necesaria (E_A) fue mayor que la que se presentó en el caso de la dieta 1; esto se debe principalmente al contenido de lípidos que tiene cada una y a sus ingredientes, ya que las formulaciones son diferentes (Lin et al, 1995).

Cabe resaltar que, para ambas dietas, las temperaturas máximas de las exotermas fueron superiores a 300°C, por lo que puede considerarse que, finalmente, se logró una mejor estabilidad utilizando una combinación de materiales encapsulantes —goma arábica-goma de mezquite-maltodextrina y goma de mezquite-suero de leche—; para otro tipo de encapsulantes hidrofílicos (albúmina de huevo, caseinatos, gelatina, entre otros) se ha reportado una temperatura máxima cercana a los 200°C, determinada por DSC (Espinoza-Herrera, 2002).

Puede señalarse que la dieta 2 además de presentar una estabilidad térmica-oxidativa mayor que la dieta 1, el tiempo de vida media calculado a temperatura ambiente para la dieta 2 es de más de 8.5 años, mientras que el de la dieta 1 es de 1.2 años. La importancia de encontrar una cubierta adecuada para proteger al pigmento de la oxidación térmica es determinante cuando se desea que este tipo de dietas se pueda manejar en granjas camaronícolas ubicadas en las zonas costeras donde, debido a las altas temperaturas y humedades ambientales, se requiere de un alimento estable a la oxidación.

Tabla 9. Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para las microcápsulas de las dietas 1 y 2

Tratamiento	E_A (kJmol ⁻¹)	k_0 (min)	k (min ⁻¹)
Dieta 1 (goma de mezquite-suero de leche)	61,34	5,84 x 10 ²	1,04 x 10 ⁻⁸
Dieta 2 (goma arábica-goma de mezquite-maltodextrina)	84,81	11,02 x 10 ⁴	1,52 x 10 ⁻¹⁰

E_A = energía de activación; k_0 = factor preexponencial de Arrhenius; k = velocidad de reacción

Fuente: elaboración propia (2015)

Análisis bromatológico de las dietas microencapsuladas

En la tabla 10 se muestra la composición bromatológica y el aporte calórico de las dietas empleadas en este estudio. El contenido lipídico fue un factor importante durante las pruebas de estabilidad, influyendo de manera directa sobre la estabilidad térmica-oxidativa. El resto de las fracciones no variaron mucho en cuanto a porcentaje. Los hidratos de carbono aumentaron en la dieta 2

como resultado de la cantidad de gomas usadas como encapsulantes, siendo mayor esta fracción que la de lípidos y proteínas. La inclusión de proteína concentrada de suero de leche en la dieta 1 incrementó el contenido proteínico de las microcápsulas.

Tabla 10. Composición bromatológica y contenido energético de las dietas 1 y 2

Dieta	Lípidos (%) (extracto etéreo)	Proteína (%) (N x 6,25)	Hidratos de carbono (%) (por diferencia)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	Aporte calórico (kcal/100 g)
1	16,79	24,57	52,12	0,68	2,81	457,87
2	3,10	18,53	70,81	0,99	3,57	385,26

Fuente: elaboración propia (2015)

Extracción de pigmentos carotenoides a partir de las dietas microencapsuladas empleando el sistema éter de petróleo-acetona-agua

Las dietas 1 y 2 se sometieron a una determinación de pigmentos carotenoides por medio de un sistema de extracción con éter de petróleo-acetona-agua, Además, se identificaron tales pigmentos sobre una cromatoplaque de gel de sílice y se cuantificaron con base en la astaxantina como el principal carotenoide activo en la dieta. Los resultados se muestran en las tablas 11a y 11b.

Tabla 11a. Identificación de pigmentos carotenoides por medio de cromatografía en capa fina

Muestra	R _f de la muestra	Compuesto identificado
Astaxantina de Sigma	0,2	No aplica
Dieta 1	0,18	Astaxantina
Dieta 2	0,18	Astaxantina

Fuente: elaboración propia (2015)

Tabla 11b. Cuantificación de astaxantina en las dietas 1 y 2 por medio de espectrofotometría (µg de astaxantina / g de dieta)

Muestra	Réplica I	Réplica II	Réplica III	Total *
Dieta 1	6,4	6,9	6,6	6,6 ± 0,2
Dieta 2	4,5	4,7	4,4	4,5 ± 0,1

(*) Valores promedio ± desviación estándar

Fuente: elaboración propia (2015)

En la tabla 11b se muestra que el pigmento de ambas dietas disuelto en éter de petróleo eluyó a un *Rf* muy similar al del estándar de astaxantina de Sigma; además, no se encontraron otras señales sobre la cromatoplaca; esto indicó una extracción satisfactoria de pigmentos, pues no se determinaron otro tipo de carotenoides que se derivaran de la forma oxidada de la astaxantina.

Una vez que se confirmó la presencia de astaxantina en el extracto etéreo, se realizó una cuantificación en la que, de acuerdo con los datos que se muestran en la tabla 11b, se obtuvo un promedio de 6,6 y 4,5 ppm de astaxantina en las dietas 1 y 2, respectivamente. La mayor cantidad de pigmento en la dieta 1 era de esperarse ya que, a diferencia de la dieta 2 —que contenía un total de 18 ppm de astaxantina— se adicionaron 39 ppm.

El contenido de carotenoides (astaxantina) en la dieta asegura su actividad biológica para las larvas de camarón blanco. La baja cantidad encontrada en ambas dietas respecto al total inicial agregado pudo deberse al aumento de la temperatura a 150°C al pasar la mezcla por el secador durante el proceso de formación de microcápsulas, por lo que no se pudo evitar la descomposición térmica parcial de los carotenoides durante esta etapa; tampoco se utilizó un agente antioxidante como parte de las formulaciones que ayudará a mantener su estabilidad. Otra de las razones por las que se puede explicar lo ocurrido es el proceso de extracción con disolventes orgánicos. Las gomas son solubles en agua, pero probablemente no fue suficiente la cantidad empleada para poder liberar todo el pigmento presente en la dieta. Asimismo, se debió aumentar el tiempo de agitación para permitir la salida de los carotenoides de la matriz de material encapsulante que los mantenía estables.

Evaluación biológica con larvas (nauplius) de Litopenaeus vannamei

En la tabla 12 se presentan los resultados del bioensayo preliminar que se realizó con larvas de *Litopenaeus vannamei* empleando las dietas 1 y 2. La figura 18 muestra los sistemas en operación.

Tabla 12. Resultados de la evaluación biológica de las dietas en larvas de *Litopenaeus vannamei*

Tratamiento/Clave	MSI (μg)	S (%)	LC (mm)	ID	MR (%)	PLI _c
Dieta 1 + DIUM (A1)	27,78 \pm 1,9 ^b	71,11 \pm 4,5 ^b	0,640 \pm 0,03 ^a	3,31 \pm 0,3 ^b	38,30 \pm 27,5 ^c	0,96 \pm 0,01 ^a
Dieta 1 + DDM (A2)	23,67 \pm 3,4 ^c	41,60 \pm 8,0 ^d	0,610 \pm 0,02 ^b	3,63 \pm 0,1 ^b	63,24 \pm 10,2 ^b	0,92 \pm 0,02 ^a
Dieta 2 + DIUM (B1)	29,00 \pm 6,6 ^a	81,20 \pm 9,7 ^a	0,623 \pm 0,03 ^b	3,71 \pm 0,2 ^a	71,31 \pm 18,7 ^b	0,97 \pm 0,01 ^a
Dieta 2 + DDM (B2)	23,33 \pm 5,7 ^c	55,33 \pm 14,1 ^c	0,587 \pm 0,01 ^b	3,15 \pm 0,1 ^b	19,57 \pm 6,6 ^d	0,92 \pm 0,03 ^a
Control	38,00 \pm 8,3 ^a	72,80 \pm 6,9 ^b	0,711 \pm 0,03 ^a	4,34 \pm 0,2 ^a	97,87 \pm 1,9 ^a	1,00 \pm 0,01 ^a

MSI = masa seca individual; S = supervivencia; LC = longitud del caparazón; ID = índice de desarrollo; MR = tasa metamórfica; PLI_c = índice de desempeño larvario (\pm desviación estándar); DIUM = dosis única inicial de microalgas; DDM = dosis diaria de microalgas

a, b, c, d: indican las diferencias significativas entre los tratamientos a $p < 0,05$

Fuente: elaboración propia (2015)

Figura 18. Sistemas en operación para el bioensayo preliminar que se realizó con larvas (nauplius) de *Litopenaeus vannamei* empleando las dietas 1 y 2

Fuente: elaboración propia (2015)

Los indicadores de desarrollo larvario fueron satisfactorios en general, destacando B1 por ser superior al resto de los tratamientos en la mayoría de los parámetros evaluados con respecto al control (microalgas de *Chaetoceros muelleri*). De estos resultados, cabe hacer énfasis que el tratamiento B1 aumentó el porcentaje de supervivencia de las larvas al superar el valor que se obtuvo con el control, A1, A2 y B2, ya que fue significativamente mayor a todos ellos.

La masa seca individual (*PSI*) mostró que B1 tuvo el valor más elevado, únicamente superado por el control (aunque no hubo diferencia estadística entre ambos). El crecimiento de las larvas de camarón, evaluado como *LC*, indicó que solamente en este caso A1 tuvo un rendimiento alto en comparación con los tratamientos A2, B1 y B2; a pesar de que fue mayor el crecimiento obtenido por el control, entre este y A1 no hubo diferencia estadística significativa. En el índice de desarrollo (*ID*) y tasa metamórfica (*MR*), B1 tuvo los valores más altos; no obstante, el control siguió siendo superior en todos los tratamientos, solo igualándose significativamente con B1 en el *ID*.

Respecto al índice de desempeño de las larvas (*PLI_c*) que, finalmente, es el factor que indica cuál es el rendimiento real de las dietas, B1 y A1 tuvieron valores similares y muy cercanos al obtenido por el control. Debe mencionarse que los tratamientos A2 y B2 también fueron satisfactorios, aunque más bajos que el control (el cual no fue estadísticamente diferente a todos los tratamientos). Los resultados altamente halagadores que arrojaron todos los tratamientos en *PLI_c* se debieron a que se adiciona alimento vivo (microalgas) durante el primer día de cultivo. En aquellos en los que se agrega el alimento diariamente a lo largo de los seis días del ensayo, se aseguró que se llevará a cabo la digestión de alimento inerte, ya que en otros estudios se ha comprobado que la completa sustitución de alimento vivo (microalgas) por dietas inertes provoca un bajo rendimiento larvario (Hernández-Rojas, 2002; Sangha, Puello-Cruz, Chávez-Sánchez y Jones, 2000).

En el análisis bromatológico de la dieta 2 se observó que la fracción proteínica (18,53%) fue mayor a la lipídica (3,1%), la cual está muy por debajo del nivel óptimo recomendado por Jacinto-Nolasco (2002), que es de 11,5%. El contenido de hidratos de carbono fue de 70,81%, un valor alto en comparación con el resto de las fracciones. Por otra parte, el contenido energético total de esta dieta fue de 16,13 kJ/g, una cifra ligeramente baja de acuerdo con lo que se considera necesario para la cría de larvas de camarón (20 kJ/g) según Cruz-Terán (2000) y Hernández-Rojas (2002).

A pesar del desequilibrio en el perfil nutrimental que presentó esta dieta, el buen desempeño larvario que mostró el tratamiento B1 (dieta 2 + DUIM) se podría explicar por la presencia de pigmentos carotenoides en aceite (4,5 ppm de astaxantina), pues se ha probado que la falta de lípidos ocasiona que tenga lugar un crecimiento deficiente de las larvas de camarón (Jones et al, 1997). Con este resultado se hace evidente el efecto de los pigmentos carotenoides extraídos con aceite sobre la

actividad biológica de las larvas de camarón.

El tratamiento A1 (dieta 1 + DUIM) obtuvo un valor de PLI_c ligeramente bajo con respecto a B1. A pesar de que la dieta 1 contenía una mayor cantidad de pigmentos carotenoides (6,6 ppm de astaxantina), una fracción proteínica de 24,57% (mayor que el de la dieta 2 por la inclusión de suero de leche como sustituto de gomas), un porcentaje de hidratos de carbono de 52,12% (menor que la dieta 2) y un aporte energético de 19,17 kJ/g, su efecto no fue tan satisfactorio como el obtenido por B1. Esto puede explicarse por la presencia de una alta fracción lipídica (16,79%) en comparación con lo recomendado (Jacinto-Nolasco, 2002), factor que trajo como consecuencia un balance inadecuado respecto a su perfil nutrimental que hizo evidente la importancia del equilibrio de lípidos en la dieta.

No obstante, los tratamientos B1 y A1 en general fueron favorables para el desarrollo larvario ya que, con una dosis única inicial de microalgas, se desarrollaron las enzimas necesarias para digerir las microcápsulas, lo que permitió absorber los nutrientes y logró mantener a las larvas durante el estadio de protozoa. Es claro que estas pruebas *in vivo* son preliminares y que requieren de más experimentos usando controles para todas las variables, pero sus resultados indican que se camina por la vía correcta para emplear las astaxantinas extraídas de las harinas de cefalotórax de camarón.

Conclusiones y recomendaciones

Con base en el primer objetivo de esta investigación, que era el de obtener mezclas de quitina y quitosana mediante la química verde a partir de residuos del camarón mediante el uso del disolvente MAC-141[®] (metanol-agua-cloruro de calcio) y sonicación a diferentes pulsos por segundo y temperaturas para, posteriormente, caracterizar el biopolímero obtenido mediante espectroscopía de infrarrojo, desacetilación, criterio de la primera derivada y solubilidad, con la información obtenida experimentalmente puede concluirse lo siguiente:

- El aprovechamiento integral de los residuos de camarón fue logrado mediante la obtención de la mezcla de quitina y quitosana en disolución empleando una técnica químico-mecánica, la utilización de reactivos de bajo impacto ambiental y la sonicación. La generación de quitosana se puede medir mediante su grado de desacetilación, el cual fue de 8,75 a 29%. Los vendedores de la quitosana comercial (Sigma) señalan que el producto que comercializan posee 85% de

desacetilación. En esta investigación se observó la tendencia de la curva y el porcentaje calculado es cercano al reportado por la empresa. Considerando la operación mecánica involucrada, la sonicación, la obtención de quitosana se logró hasta con 29% de desacetilación mediante un método ecológico. Este procedimiento se puede considerar una técnica ambientalmente amigable, ya que el disolvente se recupera y las operaciones unitarias pueden realizarse a temperatura ambiente.

- En la reacción de sonicación se puede considerar que el grupo -OH del metanol influye en la formación de aminas unidas al polímero por medio del efecto de cavitación de la operación.
- Se pudo comprobar que no solamente la sonicación influye en la obtención de quitosana desacetilada, sino que el aumento de la temperatura a 60°C por 40 min también provoca desacetilación.

Considerando el segundo objetivo de este estudio, se comprobó que se logra obtener una mayor cantidad de pigmentos carotenoides mediante el empleo de aceite comestible como disolvente durante la extracción y la variación de las condiciones de la operación.

- Con respecto al uso de la microencapsulación realizada por medio de la técnica de secado por aspersión, se logró estabilizar el extracto oleoso de pigmentos carotenoides el tiempo suficiente para llevar a cabo las pruebas preliminares *in vivo*.
- La morfología y la estructura interna de las microcápsulas se vieron afectadas por el tipo de material encapsulante y la proporción encapsulante-dieta. Esto refuerza la necesidad de que en estudios posteriores se logren optimizar estas variables para obtener cápsulas adecuadas.
- El uso de una mezcla de goma de mezquite, goma arábiga y maltodextrina en las dietas favoreció la formación de microcápsulas de una distribución de tamaño más uniforme, con una superficie más lisa y con menos defectos; además, aumentó la estabilidad de la emulsión del aceite pigmentado en agua durante el secado.
- La estabilidad térmica-oxidativa de los ingredientes de la dieta donde se utilizó una combinación de 66% de goma arábiga, 17% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE como encapsulantes fue más eficiente que en aquella donde se empleó como pared 75% de goma de mezquite y 25% de suero de leche.

- Con respecto a los estudios preliminares *in vivo* sobre el efecto de los pigmentos carotenoides (astaxantina) extraídos con aceite comestible en la alimentación de larvas de *Litopenaeus vannamei*, su adición como ingrediente de dietas para el cultivo de camarón mejoró el índice de desempeño larvario (*PLI*). Estos resultados son alentadores y permitirán continuar con estas pruebas en trabajos posteriores que definan las mejores condiciones de operación en la obtención de los ingredientes de las dietas y la evaluación de ellas.

Estas conclusiones indican que todas las expectativas planteadas se cumplieron. Como recomendaciones a partir de los resultados obtenidos en esta investigación se pueden plantear las siguientes:

- La utilización del método de sonicación y del disolvente MAC[®] directamente sobre el CPD permite extraer la quitina y desacetilarla parcialmente. Deben optimizarse las operaciones unitarias correspondientes a la separación física, ya que la alta masa molecular de la solución de quitina vuelve difícil la reacción de los grupos amida.
- Para optimizar estas operaciones unitarias es necesario elucidar el mecanismo de reacción, lo cual también debe estudiarse.
- Durante la reacción del CPD-MAC-141[®] por sonicación se formó un complejo biopolímero-calcio. Este queda en la quitina o la quitina parcialmente desacetilada, confiriéndoles características físicas y químicas para aplicaciones específicas tales como la formación de esponjas (Arias-Torres y Mendoza-Márquez, 2010; Bárcenas-Ochoa, 2010). Si se quisieran formar películas transparentes, es necesario retirar el calcio del biopolímero (Barrera-Rodríguez et al, 2007; Ortega-Granados, 2011; Salas-Osornio, 2011).
- El biopolímero obtenido pudo ser caracterizado por espectroscopía de infrarrojo, solubilidad y grado de desacetilación para diferenciar entre quitina y quitosana. Es conveniente determinar nitrógeno total, pues la quitosana tiene un contenido mayor a 7%, así como cenizas para evaluar la presencia de residuos de calcio.
- Usar otro tipo de reactivos, como el ácido láctico, junto con el disolvente MAC-141[®] podría permitir un mayor grado de desacetilación de la quitina, ya que tiene grupos -OH que podrían favorecerla.

- Corroborar el efecto del disolvente MAC-141[®] y la sonicación en controles de quitina comercial Sigma para observar el grado de desacetilación y aplicar los resultados a las muestras reales de cefalotórax y exoesqueletos de crustáceos.
- Iniciar una línea de investigación sobre la combinación simultánea de MAC[®] y microondas evaluando el grado de desacetilación de la quitina. Una de las posibles ventajas de este proceso es que existe mayor transferencia de calor en menor tiempo, por lo que sería recomendable extraer quitina del CPD, mezclar el biopolímero con disolvente MAC[®] y llevar a cabo la reacción de desacetilación por microondas variando el tiempo de irradiación.
- Uno de los problemas señalados en la literatura para el método enzimático es que la enzima quitina-desacetilasa no es específica si la quitina es poco soluble (Ramos-Ponce, 2009). Afortunadamente, la quitina se solubiliza perfectamente en MAC[®], por lo que sería conveniente iniciar la línea de investigación del uso de este disolvente junto con la enzima para desacetilar la quitina y poder obtener quitosana.
- Es importante mejorar la eficiencia de extracción de pigmentos carotenoides realizando una hidrólisis enzimática previa a la extracción con el aceite, empleando para tal fin una proteasa comercial. Esta operación previa debe plantearse realizando un estudio técnico-económico de factibilidad a nivel industrial para verificar la bondad de esta operación unitaria adicional considerando el costo del pigmento recuperado.
- Se debe tener en cuenta que el porcentaje de lípidos en las dietas para larvas de camarón es limitado debido al balance nutrimental, por lo que se sugiere la realización de estudios posteriores encaminados a que se logren concentrar los pigmentos carotenoides en una menor cantidad de aceite durante la extracción.
- Es conveniente utilizar otros componentes para la microencapsulación, como los propuestos por Pedroza-Islas et al (1997, 1999) y Espinoza-Herrera (2002), con una mayor proporción de suero de leche en la mezcla goma de mezquite-suero de leche para mejorar la estabilidad de las microcápsulas e incrementar el aporte nutrimental en su aplicación para dietas.

Símbolos y nomenclatura

AMT	Masa y tiempo exacto (<i>accurate mass and time</i>).
Antimicrobiana	Dicho de una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios, tales como bacterias, hongos, parásitos o virus.
Base de Schiff	Nombrado así en honor a Hugo Schiff, es un grupo funcional que contiene un enlace doble carbono-nitrógeno con el átomo de nitrógeno conectado a un grupo arilo o alquilo, pero sin hidrógeno. Tienen la fórmula general $R_1R_2C=N-R_3$, donde R_3 es un grupo arilo o alquilo que hace que la base de Schiff sea una imina estable.
Biopolímeros	Compuestos con alta masa molecular que pueden extraerse de materias primas naturales. Su principal característica es que pueden degradarse en el medio ambiente, tal como lo hace la materia orgánica proveniente de seres vivos.
Bromatología	Es la ciencia que estudia los alimentos desde varios aspectos, tales como su valor nutritivo, sensorial, higiénico, sanitario y de química analítica, incluyendo la higiene, toxicidad y otras alteraciones.
CC	Cefalotórax y exoesqueleto de crustáceos.
CDA; EC	Nomenclatura de la enzima quitina desacetilasa (<i>chitin deacetylase</i>).
Cefalotórax	Es la parte del cuerpo de los crustáceos y arácnidos formada por la unión de la cabeza y el tórax en una única unidad funcional.
CPD	Cefalotórax y exoesqueleto parcialmente desproteinizados.
Desacetilación	Es el proceso de eliminación de los grupos acetilo en la molécula de quitina con hidróxido de sodio y temperaturas de hasta 100°C.

Desmineralización	Se entiende como la eliminación de las sales disueltas (iones catiónicos y aniónicos).
Exoesqueleto	Es el esqueleto externo continuo que recubre toda la superficie de los animales artrópodos (arácnidos, insectos, crustáceos, miriápodos) Cumple una función protectora, de respiración y otra mecánica, proporcionando el sostén necesario para la eficacia del aparato muscular. Debido a ello, es muy resistente al ataque de sustancias químicas.
Glucopiranososa	Formas cíclicas posibles de la D-glucosa. Puede observarse que el ciclo formado es de seis átomos, cinco carbonos y un oxígeno.
Glucanohidrolasa	Enzima que actúa sobre porciones amorfas de las fibras de celulosa. Rompe enlaces glucosídicos generando oligosacáridos de distintas longitudes.
GRAS	Siglas en inglés para definir a una sustancia “reconocida como segura” (<i>generally recognized as safe</i>).
Hidrogel	Son sistemas en estado coloidal con apariencia sólida. Se hinchan y aumentan de volumen por absorción de agua y sustancias en ella disueltas
Histona deacetilasas	Son un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina.
MAC-141[®]	Disolvente con 1 mol de metanol, 4 moles de agua y 1 mol de cloruro de calcio.
MXN\$	Pesos mexicanos

Nauplius Nauplio (también llamada *nauplius*) es la primera larva característica de los crustáceos. Posee forma piriforme (aproximadamente de pera) y presenta solo tres pares de apéndices cefálicos con los que nada: anténulas, antenas y mandíbulas. Este tipo de larva puede desarrollarse dentro del huevo o ser de vida libre. Cuando es de vida libre, puede o no alimentarse, siendo habitual que pase este estado reabsorbiendo sustancias de reserva (sin alimentación activa); de hecho, en muchos casos no tiene desarrollado aún el tubo digestivo ni abierta la boca al exterior. Al ser la larva de un crustáceo, para crecer necesitan mudar (ecdisis). A medida que van mudando y desarrollándose van incorporando segmentos entre las mandíbulas y la región final del cuerpo, el telson. A estos estados se les suele denominar **metanauplius**, o también se pueden nombrar asignando números romanos detrás del término nauplius, como por ejemplo, **nauplius I**, **nauplius IV**, etc. Los nauplios, al igual que otras larvas de tamaño pequeño, se utilizan en acuicultura (piscifactorías), siendo a su vez objeto de cultivo (en los llamados cultivos auxiliares). Un valor importante de este método de alimentación es que, al encontrarse generalmente en un medio salino, hay menor posibilidad de inclusión parasitaria.

Oligómero Es una molécula con radicales asociados distintos entre sí. En cambio, un polímero es una molécula con dos o más radicales de la misma especie.

Organolépticas Conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color.

Peptización Un proceso generalmente indeseado en el que un precipitado cristalino

retorna a su primitiva forma coloidal al entrar en contacto con el disolvente frío.

- Polímeros** Son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.
- Poliamina** Son moléculas de naturaleza policatiónica presentes en plantas, animales y microorganismos. Afectan a aspectos del desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés.
- Polielectrolito** Polímero que posee grupos electrolitos (sustancia que contiene iones libres y se comporta como un medio conductor eléctrico).
- Polimerización** Es un proceso químico por el que los monómeros (compuestos de baja masa molecular) se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de mayor masa llamada polímero, bien sea una cadena lineal o una macromolécula tridimensional.
- psi** Unidad de presión del sistema inglés cuyo valor equivale a 1 libra-fuerza (*pound*) por pulgada cuadrada (*square inch*) (14,7 psi en valor absoluto).
- Quitina** Es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente N-acetil-D-glucos-2-amina). Estas están unidas entre sí con enlaces β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa
- Quitinasas** Son enzimas que degradan la quitina hidrolizándola. Se encuentran en una gran variedad de organismos, tales como bacterias, virus, hongos, plantas y animales tanto invertebrados como vertebrados. En hongos, las quitinasas cumplen funciones autolíticas, nutricionales y

morfogenéticas; en las bacterias intervienen en la digestión de quitina para la obtención de energía a partir de esta; en crustáceos e insectos, las quitinasas participan en los procesos de muda, mientras que en las plantas actúan en la defensa y desarrollo

Quitosana Es un derivado polimérico desacetilado que se obtiene a partir de la quitina.

Sonicación Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión. La intensa agitación producida rompe las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada, también se pueden destruir las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se aplica en frío para evitar el sobrecalentamiento que podría provocar la desnaturalización de las proteínas

Termogravimetría (TG) Basada en la medida de la variación de la masa cuando se somete a un cambio de temperatura en atmósfera controlada. La variación puede ser pérdida o ganancia de masa y brinda información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

Reconocimientos

Esta investigación ha sido premiada varias veces durante sus diferentes fases. Desde la fase de captura del camarón con la propuesta de diseño e instalación de molinos-secadores en los buques de captura que operan calentando aire con los gases de combustión de sus motores para recuperar el exoesqueleto y cefalotórax e incluso la fauna de acompañamiento (González-Piña y Pérez-Mendoza, 1991); su transporte a tierra firme en forma de harinas, de las que pueden obtenerse por química verde quitina y quitosana (Mendoza-García et al, 2010; Sarabia-Bañuelos et al, 2010); la producción de esponjas de quitina-quitosana para sustituir al poliestireno espumado, conocido en México como *unicel* (León-Salazar et al, 2013; Máximo-Jiménez et al, 2013) y la preparación de *mousses* de salmón

intensificando el color rosado y el sabor, mejorando sus características por el efecto antioxidante de las carotenoproteínas del aceite pigmentado (González-Riverón et al, 2013; Jiménez-Espinosa et al, 2003; Luna-Rodríguez et al, 2002; Reyes-Tacuba et al, 2011; Tenorio-García et al, 2012a,b).

Referencias

- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis* (17th ed.) Gaithersburg, MD: autor.
- Aquahoy (2010, 26 de octubre). México: Prevén camareros exportaciones por 340 mdp esta temporada [grupo de noticias]. Consultado el 5 de noviembre de 2012 en http://aquahoy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=12064%3Amexico-preven-camareros-exportaciones-por-340-mdp-estemporada&catid=58&Itemid=100032&lang=es
- Arias-Torres, Ó. y Mendoza-Márquez, A.M. (2010). *Caracterización mecánica de un polímero de origen natural derivado de cefalotórax y exoesqueletos de camarón* (tesis profesional). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Bárceñas-Ochoa, E.M. (2010). *Biopolímeros de cefalotórax y exoesqueleto de camarón. Uso de aditivos químicos para modificar sus propiedades mecánicas* (tesis profesional). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Barrera-Rodríguez, S., Flores-Ortega, R.A. y Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. (2007). Extracción de quitina del cefalotórax de camarón para la elaboración de películas (serie *Tecnologías más limpias*, vol. 10, 2^a ed.). México D.F., México: UNAM.
- Cabrera, L. (2002). *Diccionario de aztequismos*. México D.F. México: Editorial Colofón, S.A.⁴
- Calderón-Villagómez, H.E., González-Piña, G., Pérez-Mendoza, V.M., Jáber, C. y Durán-de-Bazúa, C. (1992). Reaprovechamiento de cabezas de camarón. Un proyecto con futuro. *Revista del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos*, 33, 44-57.
- Cañipa-Morales, A.J. (1994). *Obtención de quitina a partir de cefalotórax de camarón* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Cañipa-Morales, A.J. y Durán-de-Bazúa, C. (1997). Reaprovechamiento del cefalotórax de camarón. Un proyecto exitoso. *Industria Alimentaria*, 19(3), 10-17.
- Cañipa-Morales, A.J., Escobedo-Olea, G., Gálvez-Mariscal, A. y Durán-de-Bazúa, C. (1994). Aprovechamiento integral de los residuos del camarón (serie *Tecnologías más limpias*, vol. 2., 1^a ed.). México D.F., México: UNAM.

⁴ Luis Cabrera no llegó a conocer la versión final de su diccionario. Fue puesto en orden y revisado por J. Ignacio Dávila Garibi y ahora se publica por primera vez. Para tal efecto, Luis Reyes García revisó los términos nahuas y Esteban Inciarte los que aparecen en latín.

- Cañipa-Morales, A.J., Durán-de-Bazúa, C. Escobedo-Olea, G., Gálvez-Mariscal, A. y García-Gómez, R.S. (2000). Aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. (serie *Tecnologías más limpias*, vol. 2., 2ª ed.). México D.F., México: UNAM.
- Cañipa-Morales, A.J., Escobedo, G., García, R.S., Gálvez, A. y Durán-de-Bazúa, C. (1998). Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 1: separación química de pigmentos y quitina y producción de quitosana. *Industria Alimentaria*, 20(6), 28-38.
- Cardoso, M.B., Signini, R. y Campana-Filho, S.P. (2001). On Sonication of Chitin: Effects on its Structure and Morphology and Influence on its Deacetylation. *Polymer Bulletin*, 47(2), 183-190.
- Cartaya, O., Peniche, C. y Reynaldo, I. (2009). Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(2), 81-84.
- Chen, R.H., Chang, J.R. y Shyur, J.S. (1997). Effects of Ultrasonic Conditions and Storage in Acidic Solution on Changes in Molecular Weight and Polydispersity of Treated Chitosan. *Carbohydrate Research*, 299(4), 287-295.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. (1982a). Extraction of Astaxanthin Pigment from Crawfish Waste and Oil Extract. *Journal of Food Science*, 47(3), 892-896.
- Chen, H.M. y 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(3), 469-473.
- Chen, H.M. y Meyers, S.P. (1983). Ensilage Treatment of Crawfish Waste for Improvement of Astaxanthin Pigment Extraction. *Journal of Food Science*, 48(5), 1516-1520.
- Cruz-Terán, E.M. (2000). *Efecto de la fuente de lípidos dietarios en la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis de larvas de camarón blanco Litopenaeus vannamei* (tesis de licenciatura). Universidad del Mar, Puerto Ángel, México.
- Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C., Barrera-Rodríguez, S. y Flores-Ortega, R.A. (2009). *Extracción ecológica de quitina y subproductos*. Patente No 264482. México D.F., México: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
- Escobedo, G., García, R.S., Rosas, J., Cañipa, A.J., Gálvez, A. y Durán-de-Bazúa, C. (1999). Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte

- 2: separación enzimática de quitina y producción de quitosana. *Industria Alimentaria*, 21(1), 14-24.
- Espinoza-Herrera, N.L. (2002). *Elaboración y caracterización de microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) como alimento para acuicultura* (tesis de maestría). Universidad Iberoamericana, México D.F., México.
- Flores-López, M.L. (2008). *Recuperación termoquímica de quitina de camarón por tecnología limpia y su caracterización fisicoquímica* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México.
- Flores-Ortega, R.A. (2004). *Bioplástico de quitina: Formación de películas de quitina a partir de desechos de camarón por métodos ecológicos* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Flores-Ortega, R.A. (2008). *Obtención y caracterización de esponja de quitina a partir de cefalotórax de camarón* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Flores, R., Barrera-Rodríguez, S., Shirai-Matsumoto, C.K. y Durán-de-Bazúa, C. (2006). Obtención de esponjas de quitina a partir de cefalotórax de camarón para empaques. *AlimenPack*, 2(4), 26-28.
- Flores, R., Barrera-Rodríguez, S., Shirai-Matsumoto, C.K. y Durán-de-Bazúa, C. (2007). Chitin Sponge, Extraction Procedure from Shrimp Wastes Using Green Chemistry. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(6), 3909-3916.
- Flores, R., Shirai, K. y Durán-de-Bazúa, C. (2006, noviembre). Revalorización de residuos que contaminan los suelos: esponja de quitina biodegradable a partir de residuos de camarón. En C. Durán-de-Bazúa y L.I. Ramírez-Burgos (eds.), *Memorias del Cuarto Minisimposium Internacional sobre Remoción de Contaminantes de Aguas, Atmósfera y Suelos* (pp. 74-79).
- García-Gómez, R.S., Guadarrama, P.C., Cañipa, A.J., Escobedo, G., Gálvez, A. y Durán-de-Bazúa, C. (1999). Producción de pigmentos, quitina y quitosana a partir de residuos de la industria camaronera. Parte 3: extracción enzimática de carotenoproteínas. *Industria Alimentaria*, 21(2): 27-43.
- García-Gómez, R.S. et al (2004). Aprovechamiento integral de los residuos del camarón y otros crustáceos: Fuente de pigmentos y polímeros naturales. *Revista del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos*, 45(3-4), 5-13.

- González-Piña, G. y Pérez Mendoza, V.M. (1991). *Molino secador para cabezas de camarón*. Investigación sin publicar.
- González-Riverón, D.E., Fernández-Cruz, V., García-Gómez, R.S. y Durán-de-Bazúa, C. (2013). *Determinación de la vida de anaquel de un alimento al cual se le incorporaron pigmentos carotenoides (astaxantinas) obtenidos a partir del cefalotórax de camarón empleando un aceite vegetal*. Investigación sin publicar.
- Hernández, C.H., Águila, A.E., Flores, A.O., Viveros, N.E.L. y Ramos, C.E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), 57-60.
- Hernández-Rojas F. (2002). *Evaluación biológica de las microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) para larvas de camarón blanco (Litopenaeus vannamei)* (tesis de licenciatura). Universidad del Mar, Puerto Ángel, México.
- Hidalgo, C., Fernández, M., Nieto, M.O., Paneque, A.A., Fernández, G. y Llopiz, C.J. (2009). Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(1), 11-27.
- Hidalgo, C., Suárez, Y. y Fernández, M. (2008). Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. *Ars Pharmaceutica*, 49(3), 245-257.
- Islam, A.M., Phillips, G.O., Slijivo, A., Snowden, M.J. y Williams, P.A. (1997). A Review of Recent Development on the Regulatory, Structural and Functional Aspects of Gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 493-505.
- Jacinto-Nolasco, P. (2002). *Evaluación del orbital de barrilete negro (Euthynnus lineatus) en el cultivo zoario del camarón blanco* (tesis de licenciatura). Universidad del Mar, Puerto Ángel, México.
- Jiménez-Espinosa, M.S., Luna-Rodríguez, A. y Ramírez Cruz, M.A. (2003). *Obtención de pigmentos carotenoides provenientes del cefalotórax de camarón mediante su extracción con aceite comestible y su aplicación como complementos alimenticios*. Investigación sin publicar.
- Jones D.A. et al (1997, mayo). Progress in the use of artificial feeds in penaeid larval culture. *Proceedings of the 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific*

Conference on Algal Biotechnology. pp. 107.

- Kenyon, M. y Anderson, R. (1988). Maltodextrin and Low-dextrose Equivalent Corn Syrup Solid: Production and Technology for the Flavor Industry. En S. Rish y G. Reineccius (eds.), *Flavor encapsulation* (pp. 7-11). Washington D.C.: American Chemical Society.
- Lárez-Velásquez, C. (2008). Algunas de las potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22.
- León-Salazar, M., Ortega-Granados, J.A. y Durán-de-Bazúa, C. (2013). *Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: Producción de bioesponjas de residuos de la industria camaronícola con posible aplicación en el área de alimentos*. Investigación sin publicar.
- Lin, C.C., Lin S.Y. y Sun H.L. (1995). Microencapsulation of Squid Oil with Hydrophilic Macromolecules for Oxidative and Thermal Stabilization. *Journal of Food Science*, 60(1), 36-39.
- Liu, H., Du, Y.M. y Kennedy, J.F. (2007). Hydration Energy of the 1,4-bonds of Chitosan and their Breakdown by Ultrasonic Treatment. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 598-600.
- López, C.J., Sánchez, M.D.I. y Bueno, S.C. (2010). Envases activos e inteligentes con bioproductos de los residuos de camarón. *Ide@s Concyteg*, 5(60), 590-597.
- Luna-Rodríguez, A. (2008). *Extracción con lípidos de los pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su evaluación como ingredientes de dietas en larvocultivos de Litopenaeus vannamei* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Luna-Rodríguez, A., Medina-Reyna, C.E., Pedroza-Islas, R. y Durán-de-Bazúa, C. (2008). Oleous Extraction of Carotenoids from Shrimp Cephalothorax and its Effect on a Microencapsulated Diet with Nauplii Larvae. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 17(4), 367-386.
- Luna-Rodríguez, A., Ramírez-Cruz, M.A. y Jiménez-Espinosa, M. (2002). *Reaprovechamiento integral de los residuos de la camaronicultura*. Investigación sin publicar.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J. y Rincón, M. (2004). Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4(2), 1-10.
- Máximo-Jiménez, C. Ortega-Granados, J.A. y Durán-de-Bazúa, C. (2013). *Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: Producción de bioesponjas de residuos de la industria camaronícola con posible aplicación en el área de alimentos*. Investigación sin publicar.

- Mendoza-García, D.D., Salas-Osornio, J. y Durán-de-Bazúa, C. (2010). *Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: obtención de quitina y quitosana por medio de química verde*. Investigación sin publicar.
- Muzzarelli, R.A. (1985). Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6), 461-472.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. y Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, 72(5), 87-100.
- No, H.K, Cho, Y.I., Kim, H.R. y Meyers, S.P. (2000). Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 psi/121°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2625-2627.
- OCDE (2007). *Política agropecuaria y pesquera en México. Logros recientes, continuación de las reformas*. París, Francia: autor. Consultado el 17 de noviembre de 2012 de <http://www.oecd.org/agriculture/agricultural-policies/38778312.pdf>
- Ortega-Granados, J. (2011). *Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos. Aplicación de un biopolímero funcional quitina/quitosana para el recubrimiento y protección de productos perecederos. Caso fresa (Fragaria × ananassa)*. Investigación sin publicar.
- Pacheco-L., N.A. (2010). *Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación* (tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.
- Pacheco, N., Juárez-Castelán, C., Tromboto, S. y Shirai, K. (2009, junio). Extracción de quitina a escala industrial mediante fermentación ácido láctica de desechos de camarón (*Litopenaeus vannamei*). Ponencia presentada al XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Consultado el 18 de noviembre de 2012 en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_V/OV-02.pdf
- Parada, L.G., Crespín, G. y Miranda, D.R. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 1-16.
- Pastor-de-Abram, A. (ed.) 2004. *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima,

Perú: CYTED, CIAD, Pontificia Universidad Católica del Perú.

- Pedroza-Islas, R. (2000). *Estudios de difusión de nutrimentos en alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
- Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J., Durán-de-Bazúa, M.C. y Chávez-Martínez, M.P. (1997). Las dietas balanceadas para larvas de crustáceos. Situación actual de los alimentos microencapsulados. *Industria Alimentaria*, 19(3), 37-42.
- Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E. J., Durán-Domínguez, C., Trejo-Martínez, S. (1999). Using Biopolymer Blends for Shrimp Feedstuff Microencapsulation — I. Microcapsule Particle Size, Morphology and Microstructure. *Food Research International*, 32(5), 367-374.
- Ramírez-Cruz, M.A., García-Gómez, R.S., Flores-Argüello, I., Gálvez-Mariscal, A. y Durán-de-Bazúa, C. (2003). Empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de carotenoproteínas a partir de cefalotórax de camarón. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 18(1), 32-39.
- Ramos-Ponce, L.M. (2009). *Producción y caracterización de quitosán y sus derivados a partir de quitina mediante tecnologías emergentes* (tesis de maestría). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, México.
- Ré, M.I. (1998). Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195-1236.
- Reyes-Tacuba, E., García-Gómez, R.S. y Durán-de-Bazúa, C. (2011). *Cuantificación de pigmentos carotenoides de cefalotórax de crustáceos partiendo de aceites comerciales y su empleo en la industria alimentaria*. Investigación sin publicar.
- Salas-Osornio, J. (2011). *Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: evaluación de los recubrimientos de frutas frescas usando mezclas de quitina y quitosana obtenidas por medio de química verde* (tesis profesional). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
- Sangha, R.S., Puello-Cruz, A.C., Chávez-Sánchez, M.C. y Jones, D.A. (2000). Survival and Growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) Larvae Fed a Single Dose of Live Algae and Artificial Diets with Supplements. *Aquaculture Research*, 31(8-9), 683-689.

- Sarabia-Bañuelos, P. (2012). *Aprovechamiento integral de los residuos de crustáceos: obtención de quitina y quitosana por métodos ecológicos* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
- Sarabia-Bañuelos, P., Mendoza-García, D.D., Ortega-Granados, J.A., Campos-Juárez, O.J., García-Gómez, R.S. y Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. (2010, septiembre). Aprovechamiento integral de residuos de crustáceos: Producción verde de quitina y quitosana. Ponencia presentada en el VI Minisimposium Internacional sobre Remoción de Contaminantes de Agua, Atmósfera y Suelo, México D.F., México.
- Shirai-Matsumoto, C.K. (1999). *Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana* (tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, México D.F., México.
- Statgraphics versión 5.1 [software] (s.f.). Warrenton, VA: Statpoint Technologies, Inc.
- Struszczyk, H., Pospieszny, H. y Kotlinski, K. (1989). Some New Applications of Chitosan in Agriculture. En G. Skåj-Bræk, T. Anthonsen y P.A. Sandford (eds.), *Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications* (pp. 733-742). Londres, Reino Unido: Elsevier.
- Tenorio-García, E. García-Gómez, R.S. y Durán-de-Bazúa, C. (2012a). *Evaluación y aplicación de los pigmentos obtenidos del cefalotórax de camarón empleando aceites vegetales comestibles*. Investigación sin publicar.
- Tenorio-García, E., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. (2012b, septiembre). Obtención de pigmentos carotenoides del cefalotórax de camarón y su aplicación en muestras alimenticias. Ponencia presentada en el VII Minisimposium Internacional sobre Remoción de Contaminantes de Agua, Atmósfera y Suelo, Xalapa de Enríquez, Veracruz, México.
- Tsaih, M.L. y Chen, R.H. (2003). Effect of Degree of Deacetylation of Chitosan on the Kinetics of Ultrasonic Degradation of Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 90(13), 3526-3531.
- Velázquez del Valle, M.G., Martín Polo, M.O. y Herrera Gómez, A. (2000). Cuantificación por IR del agua directamente unida a una matriz polimérica. *Superficies y Vacío*, (11), 24-31.
- Vernon-Carter, E.J., Gómez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R. y Moreno-Terrazas,

R.C. (1996). Color Degradation and Coalescence Kinetics of Aztec Marigold Oleoresin-in-water Emulsions Stabilized by Mesquite or Arabic Gums and their Blends. *Journal of Texture Studies*, 27(6), 625-641.

Vernon-Carter, E.J., Pedroza-Islas, R. y Beristain, C.I. (1998). Stability of *Capsicum annuum* Oleoresin-in-water Emulsions Containing *Prosopis* and *Acacia* Gums. *Journal of Texture Studies*, 29(5), 553-568.

Warsi, A.A. (2008). Novel Edible Coating for Tropical Fruits as an Alternative to Synthetic Fungicide [diapositivas de PowerPoint]. Consultado el 8 de noviembre de 2012 en <http://www.itfnet.org/gfruit/Slides/ISCTE%202008/Novel%20Edible%20Coating%20for%20Tropical%20Fruits%20as%20an%20Alternative%20to%20Synthetic%20Fungicide.pdf>