

FCN y CS, U.N.P.S.J.B.

Mejoramiento de la calidad nutricional de alimento balanceado para acuicultura

Autor de Tesis: Martina Cretton

Director de Tesis: Dra. Marcia Mazzuca

Co-Director de Tesis: Dra. Gabriela Malanga

2019

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud,

Departamento de Química, U.N.P.S.J.B.

Ruta Prov. N°1, Km 4, (9000) Comodoro Rivadavia, Chubut.

Martinacretton1988@gmail.com

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de Tesis la Dra. Marcia Mazzuca, por confiar en mí y tenerme en cuenta en cada posibilidad que se presentó en estos años, por brindarme el espacio de trabajo, por su dedicación y paciencia. A la Dra. Gabriela Malanga, mi Co-directora, agradecer fundamentalmente la oportunidad de trabajar con ella, la paciencia, perseverancia, entusiasmo que siempre me dedicó y el aliento que me brindó en los momentos justos.

Por otro lado, quiero agradecer a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, casa de altos estudios que me dio la posibilidad de una formación académica de grado y de post grado. A los distintos laboratorios y docentes que durante estos años me permitieron hacer uso de distintos equipos, Dra. Ofelia Katusich, laboratorio de fisicoquímica, laboratorio de bioquímica. Al laboratorio del IBIMOL-CONICET, por permitirme realizar parte de los experimentos fundamentales de este trabajo, por el aporte no solo de equipamiento, sino también por la predisposición y capacitación recibida de su gente. A la Agencia Comodoro Conocimiento, el acuerdo de trabajo establecido posibilita el uso del espacio del Laboratorio de cría de moluscos y especies de aguas frías, para llevar a cabo la experiencia *in vivo*.

A las pesqueras, Mar del Chubut, B/P el Gauchito, a integrantes del Instituto de Desarrollo Costero, y al Sr. Ernesto Silva por proveerme el material de trabajo. Al Sr Carlo Capella de la empresa Patagonia Pura, por su donación de astaxantina y cantaxantina sintética y su buena predisposición para brindar información sobre alimentos comerciales para salmónidos.

A mi familia y a mi compañero de cada día Ezequiel, por el amor, la paciencia y acompañamiento en todo este tiempo.

Por último, reconocer especialmente el apoyo incondicional en cada etapa, de mis compañeros de laboratorio, personas maravillosas que me brindaron aliento, ayuda y cariño cada día.

Índice

AGRADECIMIENTOS	I
Índice	ii
<i>Resumen</i>	iv
<i>Summary</i>	vii
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Recursos pesqueros</i>	12
1.2. <i>Acuicultura</i>	14
1.3. <i>Características de los alimentos balanceados</i>	17
1.4. <i>Astaxantina</i>	21
1.5. <i>Uso de astaxantina como antioxidante</i>	24
1.5.1. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	27
1.6. <i>Metodologías para la extracción de carotenoides a partir de fuentes naturales</i>	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. <i>Material biológico</i>	32
2.2. <i>Composición centesimal</i>	32
2.2.1. <i>Humedad</i>	32
2.2.2. <i>Cenizas</i>	33
2.2.3. <i>Nitrógeno total y proteínas</i>	33
2.2.4. <i>Quitina</i>	34
2.2.5. <i>Lípidos</i>	34
2.2.6. <i>Hidratos de carbono</i>	34
2.3. <i>Ácidos grasos (FA)</i>	34
2.4. <i>Colesterol</i>	35
2.5. <i>Preparación de los extractos</i>	35
2.6. <i>Carotenoides</i>	36
2.6.1. <i>Astaxantina</i>	37
2.7. <i>Disponibilidad de biomasa</i>	37
2.8. <i>Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo</i>	38
2.9. <i>Preparación de dietas</i>	39
2.10. <i>Capacidad antioxidante</i>	40
2.10.1. <i>Espectroscopia de resonancia paramagnética</i>	40
2.10.1.1. <i>Generación de radicales lipídicos</i>	41
2.10.1.2. <i>Producción de radical hidroxilo</i>	41
2.10.1.3. <i>Detección de radical ascorbilo</i>	42
2.10.2. <i>Ensayo de la inhibición de la oxidación de fluoresceína</i>	43
2.11. <i>Estadística</i>	44
2.12. <i>Reactivos</i>	44
3. RESULTADOS	46
3.1. COMPONENTES DE INTERÉS PRESENTES EN CÁSCARAS DE <i>P. MUELLERI</i> Y <i>L. SANTOLLA</i>	47
3.1.1. <i>Composición proximal</i>	47
3.1.2. <i>Contenido de FA</i>	48
3.1.3. <i>Colesterol</i>	50
3.1.4. <i>Carotenoides</i>	51
3.1.5. <i>Disponibilidad de biomasa</i>	53
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN CAROTENOIDES A PARTIR DE DESCARTES DE <i>P. MUELLERI</i>	57

3.2.1.	<i>Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura ...</i>	58
3.2.2.	<i>Variación del contenido en FA en distintas épocas de captura.....</i>	61
3.2.3.	<i>Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad</i>	66
3.2.4.	<i>Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento de cáscaras</i>	67
3.2.5.	<i>Comportamiento cromatográfico del extracto.....</i>	68
3.2.6.	<i>Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol 96 %</i>	72
3.2.7.	<i>Efectos de la temperatura y del tiempo en los carotenoides del extracto etanólico</i>	73
3.2.8.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de P. muelleri</i>	76
3.3.	PREPARACIÓN DE DIETAS ENRIQUECIDAS PARA SALMÓNIDOS ..	81
3.3.1.	<i>Caracterización de alimentos balanceados comerciales.....</i>	82
3.3.2.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales</i>	83
3.3.3.	<i>Elaboración y caracterización de alimento balanceado con extracto</i>	84
3.3.4.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto</i>	87
4.	DISCUSIÓN	89
4.1.	COMPONENTES DE INTERÉS PRESENTES EN DESCARTES DE P. MUELLERI Y L. SANTOLLA.....	90
4.1.1.	<i>Composición proximal.....</i>	90
4.1.2.	<i>Ácidos grasos</i>	92
4.1.3.	<i>Colesterol</i>	94
4.1.4.	<i>Carotenoides</i>	94
4.1.5.	<i>Disponibilidad de biomasa</i>	96
4.2.	CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN CAROTENOIDES A PARTIR DE DESCARTES DE P. MUELLERI	98
4.2.1.	<i>Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura ...</i>	98
4.2.2.	<i>Variación en contenido de FA en distintas épocas de captura.....</i>	99
4.2.3.	<i>Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad</i>	101
4.2.4.	<i>Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento del descarte.....</i>	101
4.2.5.	<i>Comportamiento cromatográfico del extracto.....</i>	102
4.2.6.	<i>Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol 96%</i>	103
4.2.7.	<i>Estabilidad de extracto carotenoides: Efectos de la temperatura y el tiempo</i>	104
4.2.8.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de P. muelleri</i>	105
4.3.	PREPARACIÓN DE DIETAS ENRIQUECIDAS PARA SALMÓNIDOS	106
4.3.1.	<i>Caracterización de alimentos balanceados comerciales.....</i>	106
4.3.2.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales</i>	106
4.3.3.	<i>Elaboración y caracterización de alimento balanceados con extracto</i>	107
4.3.4.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto.</i>	108
5.	CONCLUSIONES	109
6.	PERSPECTIVAS.....	113
7.	BIBLIOGRAFÍA	115

Resumen

Argentina es un país costero con un extenso litoral marítimo, que permite el desarrollo de la pesca marítima. Los crustáceos son uno de los principales productos de la pesca. Las especies que se capturan en mayor proporción son el langostino (*Pleoticus muelleri*) y la centolla (*Lithodes santolla*). El procesamiento de estas especies genera grandes cantidades de descartes y gran parte de estos descartes consisten en cáscaras y caparazones (exoesqueleto). Actualmente existe un creciente interés en el uso de subproductos de la pesca para la obtención de productos de uso en acuicultura. En Argentina, la acuicultura es de incipiente desarrollo y consiste principalmente en la cría de peces de agua dulce, trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) en la Patagonia y pacú (*Piaractus smesopotamicus*) en el norte del país. El principal inconveniente para aumentar la producción de salmónidos es el alto valor de los alimentos balanceados. Los alimentos balanceados tienen entre sus ingredientes aceites de distintos orígenes que aportan ácidos grasos (FA) con distintos grados de insaturación; estos son altamente susceptibles a oxidarse, lo cual causa deterioro del alimento y pérdida de la calidad. Para evitar la rancidez provocada por la oxidación de los FA se agregan diversos antioxidantes, como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) o antioxidantes naturales. Los alimentos balanceados contienen además pigmentos como la astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β - β caroteno). La mayor parte de la astaxantina utilizada es de origen sintético, aunque existen el agregado de astaxantina natural obtenida de *Haematococcus pluvialis* o *Phaffia rhodozyma* y descartes del langostino *Pandalus borealis*. La astaxantina es un pigmento carotenoide rojo y un potente antioxidante. Actualmente además de su eficiencia en la pigmentación de salmónidos, se recomienda el agregado de una mínima cantidad para asegurar el bienestar de los peces por su capacidad antioxidante. Al igual que otros carotenoides es susceptible a la oxidación en contacto con aire, sufre isomerizaciones por someterse a calentamiento, y es susceptible a la acción de la luz. El objetivo de este trabajo de Tesis fue aumentar la calidad nutricional de alimentos balanceados para acuicultura a partir de la extracción de materias primas presentes en los residuos de la industria pesquera. El material biológico fue provisto por empresas pesqueras de la localidad. El mismo consistió en cáscaras de cola y cabezas de langostino argentino (*P. muelleri*), caparazones y cáscara de

patas de centolla (*L. santolla*). Se estudió la composición química proximal, contenido y calidad de ácidos grasos, contenido en carotenoides totales a partir de material de descarte proveniente del procesamiento industrial de *L. santolla* y *P. muelleri*. En base a los resultados obtenidos y al análisis de disponibilidad de materia prima, se seleccionó el descarte de *P. muelleri* para continuar con las etapas posteriores de preparación de un extracto rico en astaxantina. Se estudió el rendimiento de extracción de astaxantina con cáscaras y cáscaras con restos de vísceras. Se evaluó el efecto del almacenamiento de las cáscaras a diferentes temperaturas y con diferentes grados de humedad previo al proceso de extracción. Se compararon rendimientos de extracción de astaxantina sobre cáscaras húmedas y secas. Se prepararon extractos de cáscaras de *P. muelleri* ricos en carotenoides y se estudió la estabilidad de los extractos bajo diferentes condiciones de almacenamiento, tanto desde el punto de vista de la preservación del contenido en astaxantina como de su capacidad antioxidante. Finalmente se obtuvo y caracterizó alimento balanceado suplementado con este extracto. Los descartes de ambos organismos presentaron componentes de valor como carotenoides, FA, quitina. Se observó que el mejor tratamiento del material de partida para obtener más rendimiento en astaxantina es procesar los descartes inmediatamente o bien almacenarlos secos a bajas temperaturas. Los carotenoides como los FA presentes en cáscaras y restos del procesamiento de *P. muelleri* varían según la época de captura y se obtiene un mayor rendimiento de extracción si se lo extrae de cáscaras húmedas. El análisis cromatográfico de los extractos de langostino mostró tres bandas características coloreadas, la banda I correspondiente a astaxantina libre y las bandas II y III compatibles con la presencia de astaxantina mono- y diesterificada respectivamente, siendo la banda II la más abundante. La banda III puede estar o no presente. Las tres bandas cromatográficas de astaxantina se ven afectadas por la temperatura, aunque la banda II es la más afectada. Cuando se determinó la capacidad antioxidante del extracto, el efecto observado fue mayor sobre la generación de radicales lipídicos que sobre aquellos presentes en fase acuosa como radicales hidroxilos y ascorbilo. El extracto de langostino adicionado al alimento balanceado aporta FA de calidad nutricional en cantidades adecuadas para el óptimo desarrollo de los peces y mantiene su capacidad antioxidante luego de su almacenamiento en frío durante al menos 60 días. De esta manera los descartes de *P. muelleri* dada su

riqueza en carotenoides y FA y la enorme cantidad generada por la industria procesadora en la región, se convierten en una buena fuente de extracto rico en carotenoides para incorporar a alimentos balanceados.

Palabras claves: Alimento balanceado, acuicultura, astaxantina, capacidad antioxidante

Summary

Argentina is a coastal country with an extensive maritime coastline, which allows the development of maritime fisheries. Crustaceans are one of the main products of fishing. Both the shrimp (*Pleoticus muelleri*) and the king crab (*Lithodes santolla*) are species being captured in greater proportion. The processing of these species generates large amounts of discards and many of these discards consist of shells, carapace (exoskeleton), and heads. Nowadays there is a growing interest in the use of fishery by-products to obtain products for use in aquaculture. In Argentina, aquaculture has an incipient development and consists mainly of freshwater fish, rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Patagonia and pacú (*Piaractus smesopotamicus*) in the north of the country. To increase the development of the salmonid culture, the main disadvantage is the value of the balanced feed diet. Balanced foods have among their ingredients oils of different sources that provide fatty acids (FA) with different degrees of unsaturation; which are highly susceptible to oxidation, which causes the deterioration of the feed and ends up leading to the loss of quality. In order to avoid the rancidity caused by the oxidation of FA, several antioxidants are added, such as BHT, BHA or natural antioxidants. Balanced foods also contain pigments such as astaxanthin. Most of the astaxanthin used is synthetic, although there is the addition of natural astaxanthin obtained from *Haematococcus pluvialis* or *Phaffia rhodozyma* and discards of the shrimp *Pandalus borealis*. Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-4,4'-diketo- β - β -carotene) is a red carotenoid pigment and a potent antioxidant. Currently, in addition to its efficiency in the pigmentation of salmonids, the addition of a minimum amount is recommended to ensure the wellness of the fish due to their antioxidant capacity. Like other carotenoids it is susceptible to oxidation in contact with air, undergoes isomerizations by undergoing heating, and is susceptible to the action of light. The proximal chemical composition, content and quality of fatty acids, total carotenoid content from waste material from industrial processing of king crab (*Lithoides santolla*) and Argentine shrimp (*Pleoticus muelleri*) was studied. The sample consisted of tail shells and heads of *P. muelleri*, shells and leg shell of *L. santolla*. The extraction performance of astaxanthin with the two most abundant types of discards (shells and shells with remains of viscera). The effect of the storage of the shells at different temperatures and with different degrees of

moisture prior to the extraction process was evaluated. Astaxanthin extraction yields were compared on wet and dry shells. Extracts rich in carotenoids were obtained from *P. muelleri* shells, and the stability of the extracts was studied under different storage conditions, both from the point of view of the preservation of the astaxanthin content and its antioxidant capacity. Finally, balanced feed supplemented with this extract was prepared and characterized. The material was provided by local fishing companies. Residues of both materials presented value-added components such as carotenoids, FA, chitin. It was observed that the best treatment of the starting material to obtain more performance in astaxanthin is to process the discards immediately or store it dry at low temperatures. Carotenoids such as FA present in shells and processing residues of *P. muelleri* vary according to the time of capture and a higher extraction yield is obtained if it is extracted from wet shells. In the extracts, different forms of astaxanthin were observed, free and monosterified, or free, monosterified and diesterified, being the monosterified the most abundant form. All forms of astaxanthin are affected by temperature, although the monoesterified form is the most affected. When the antioxidant capacity was determined, the observed effect was greater on the generation of lipid radicals than on those present in the aqueous phase as hydroxyl and ascorbyl radicals. The extract added to the balance provides FA of nutritional quality in adequate quantities for the optimal development of the fish and maintains its antioxidant capacity after its cold storage for 60 days. In this way the discarding of *P. muelleri* given its abundance, its richness in carotenoids and FA becomes a good source of extract rich in carotenoids to incorporate balanced foods. There are still remaining *in vivo* studies to evaluate the pigment capacity and antioxidant effect of the additive on salmonids. In addition, at a later stage, toxicological, microbiological and food stability studies will continue. of palatability and bioavailability.

Keywords: balanced feed, aquaculture, astaxanthin, antioxidant capacity.

Abreviaturas

A: Absorbancia

A[•]: Radical ascorbilo

AA: Ácido araquidonico

AAPH: Dihidrocloruro de 2,2'-Azobis (-amidinopropano)

AL: Ácido linoleico

ALA: Ácido α -linolénico

Ast: Astaxantina

Ast L: Astaxantina libre

Ast M: Astaxantina monoesterificada

Ast D: Astaxantina diesterificada

β -C: β -Caroteno

BHA: butilhidrodianisol

BHT: butilhidroxitolueno

Col: Colesterol

Car: Carotenoides

DHA: Ácido graso docosapentaenoico

DMPO: N-oxido de 5,5-Dimetil-1-pirrolin

DMSO: Dimetil sulfoxido

EPA: Ácido graso eicosapentaenoico

EFA: Ácido graso esencial

EPR: Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica

FA: Ácidos Grasos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

Fluoresceína: 3',6'-dihidroxi-2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

LA: Ácido linoleico

LR[•]: Radicales lipídicos

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

ORAC: Capacidad atrapadora de radicales del oxígeno

POBN: α -(N-óxido de 4-Piridil)-N-tert-butilnitrona

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

[•]OH: Radical hidroxilo

RF: Relación de frente

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SFA: Ácidos grasos saturados

TFA: Ácidos grasos totales

Trolox: ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromann-2-carboxílico

UV: Ultravioleta

1. Introducción

1.1. Recursos pesqueros

La Argentina es un país con un extenso litoral marítimo que permite el desarrollo de la pesca. Las principales especies objetivo de la pesca marina en Argentina se presentan en la Figura 1. Los crustáceos, en particular el langostino es uno de los principales productos de la pesca en el país. Los desembarques del langostino *Pleoticus muelleri* se encuentran en aumento en la última década y lo convierten en el principal recurso pesquero del país. Durante el 2017 la pesca alcanzó las 243.245 toneladas (t), de las cuales 183.291 t se exportaron a distintos países. Del volumen exportado de *P. muelleri* 119.770 t, se exportaron en la forma de langostino entero mientras que el resto aproximadamente 60.000 t fueron procesadas en planta para producir cola con cáscara o cola sin cáscara (Minagri 2018a, Minagri 2018b). En cuanto a la centolla *Lithodes santolla*, otro crustáceo que se captura en el país, el volumen de captura total fue de 2.288 t, el procesamiento de este volumen se exportó en forma de patas con carne 1.328 t (Minagri 2018a, Minagri 2018b).

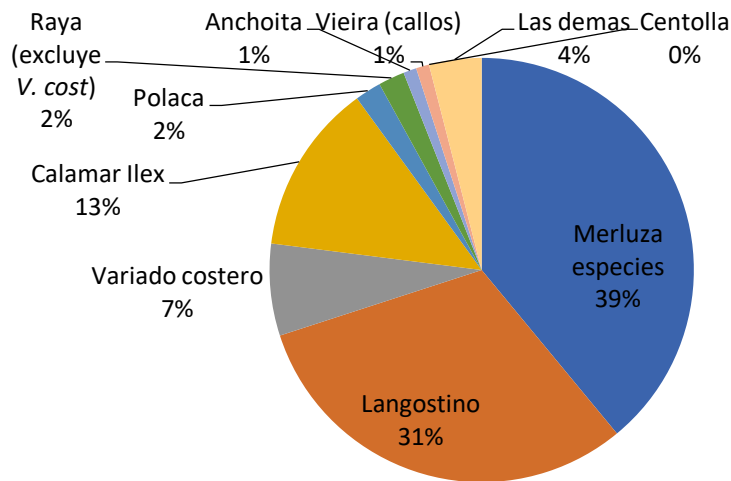


Figura 1: Principales especies de la pesca marina en Argentina (Minagri 2018b).

En Patagonia el langostino y la centolla (Figura 2) constituyen importantes recursos pesqueros. El procesamiento de estas especies genera grandes cantidades de descartes, que constituyen miles de toneladas anuales (LLadser y

col. 2014, Minagri 2018a, Minagri 2018b). Gran parte de estos descartes consisten en cáscaras y caparazones (exoesqueleto).

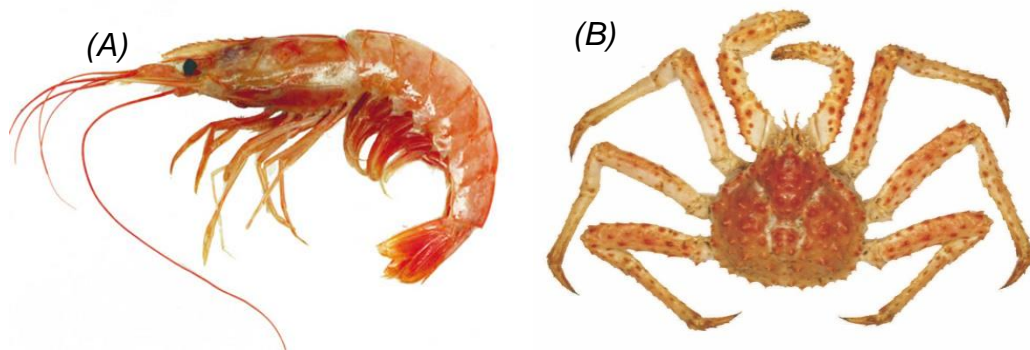


Figura 2. Crustáceos capturados en la región patagónica, *Pleoticus muelleri* (A), *Lithodes santolla* (B).

En las plantas procesadoras instaladas en las proximidades de los puertos patagónicos se procesan tanto *P. muelleri* como *L. santolla*. En el caso de *P. muelleri* se descartan dos tipos de residuos: el residuo completo y las cáscaras. El residuo completo consiste en cabezas (cefalopereion), cáscaras de cola (pleon), telson y uropodos (Figura 3). Las cáscaras incluyen cáscaras de cola, telson y urópodos. Se estima que como en otras especies de langostinos, el residuo completo constituye un 70% y que las cáscaras un 50% en peso del langostino (Sachindra y col 2006).

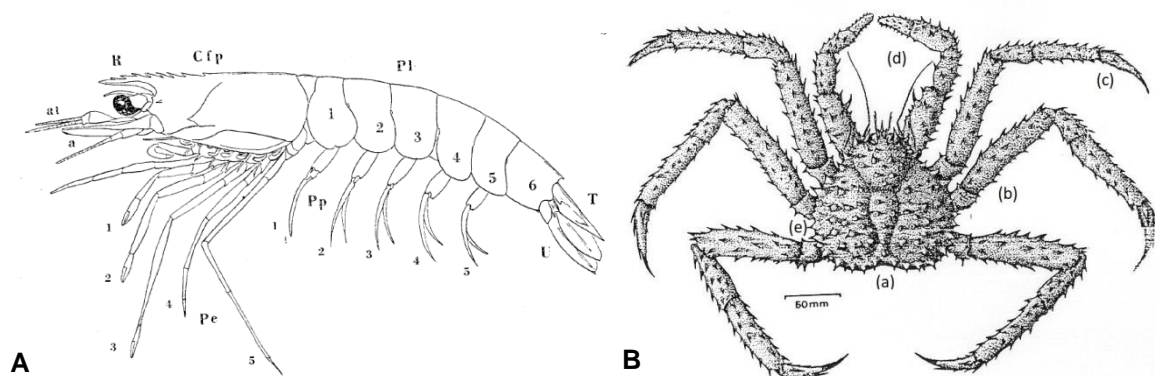


Figura 3. A Diagrama del cuerpo de *P. muelleri*. (Boschi, 1962). B. Diagrama del cuerpo de *L. santolla*. (<https://alchetron.com/Lithodes-santolla>). Cfp cefalopereion, Pl (pleon), T telson, U uropodos. (a) caparazón, (b) patas caminadoras (pereopodos), (c) puntas (dactilopodito), (d) pinzas, (e) hombros (coxas)

El porcentaje de descarte que se genera del procesamiento de *L. santolla* es muy variable, pues depende del grado de procesamiento del producto. El mismo oscila entre un 12-75% del peso (Wyangard y col. 2015, Boschi 2016). Sin embargo, actualmente el principal producto que se produce y exporta en el país, *clusters* cocidos, generan aproximadamente el 40% del peso del animal en descarte (Wyangard y col. 2015, Boschi 2016, Minagri 2018 (a), Minagri 2018(b))

Desde la década de 80-90 existe interés en reducir los descartes producidos por la industria pesquera, incrementando su uso para el consumo local y en la producción de alimentos para acuicultura (Garcia y Rosenberg 2010). Los descartes de crustáceos son ricos en componentes de valor agregado, en particular las cáscaras son fuente de pigmentos carotenoides de interés en acuicultura (Blanco y col. 2007).

1.2. Acuicultura

Las distintas actividades humanas como la pesca indiscriminada de diferentes especies de peces, o el uso de contaminantes, como los agroquímicos, que son vertidos en fuentes de agua dulce; los cambios de cursos de agua, entre otros, afectan los recursos acuáticos, y se reflejan en muchos casos en la disminución de las poblaciones de peces (Luchini y Panné Hiudobro 2008). Por otro lado, la población humana se encuentra en aumento según las tendencias y proyecciones a una tasa del 1,4% anual estimándose que la población mundial llegue a 8.039 millones de personas para el año 2025. Es necesario satisfacer las necesidades alimentarias de la población y se considera un desafío para el año 2050 donde se espera que la población mundial supere los 9.000 millones de personas (FAO 2016). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) presenta además en su informe “el estado mundial de la pesca y acuicultura” (SOFIA 2016), que los volúmenes de captura de pesca mundial se encuentran prácticamente estables desde el 2003 hasta el 2014. Por esta razón es que las actividades de producción acuícola deben, en muchos casos, iniciarse o mejorarse para garantizar la calidad del alimento (Luchini y Panné Hiudobro 2008, Godfray y col. 2010, FAO 2016). La acuicultura tiene un importante rol en la alimentación mundial, provee a cerca de 3 billones de personas de al menos 15% proteínas de origen animal (Godfray y col. 2010).

La acuicultura es una de las actividades de producción de alimentos humanos que más aumentó su desarrollo en los últimos años con un promedio de crecimiento anual de 8,7% desde 1970-2005. Según estudios realizados por la FAO más de un 50% del pescado que se consume globalmente proviene de criaderos, aunque existen diferencias significativas en el desarrollo de la actividad acuícola entre países. La producción mundial acuícola alcanzó en 2016, 80 millones de toneladas. Por otro lado el consumo de pescado *per cápita* se encuentra en aumento desde 1970 a nivel mundial (FAO 2018). La Figura 4 representa la información relacionada con el aumento de la población humana, la pesca por captura y producción acuícola con proyecciones hacia el futuro para cubrir las necesidades alimenticias.

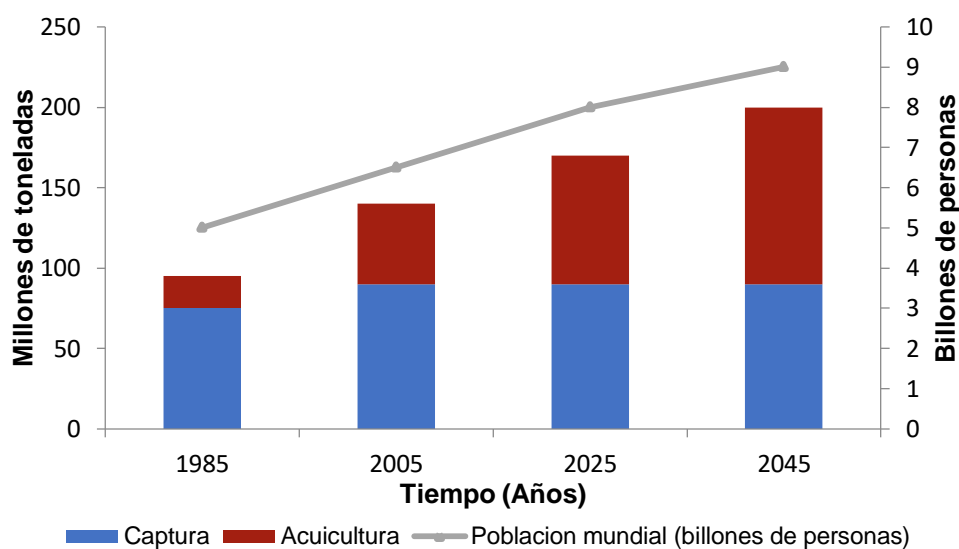


Figura 4. Estimación del consumo de pescado en base a la proyección del aumento de la población mundial. (Luchini y Panné Hiudobro 2008)

El crecimiento de la acuicultura se debe, entre otras cosas, a que el alimento balanceado tiene un factor de conversión bajo. Se considera que aproximadamente 1-1,4 kg de alimento balanceado produce 1kg de pez en salmones, pero para lograr estos valores es necesario contar con una dieta de calidad, con los requerimientos proteicos y lipídicos necesarios ajustados a cada etapa del crecimiento y especie del pez (Miller y col. 2008, FAO 2016). Existe un gran interés en maximizar la producción y minimizar los costos y esto puede lograrse mejorando la calidad de los alimentos (Jobling 1998).

En Argentina la acuicultura es una actividad de incipiente desarrollo y consiste principalmente en el cultivo de peces de agua dulce, trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) en la Patagonia y pacú (*Piaractus smesopotamicus*) en el norte del país (Figura 5). Durante el período 1992-2007 la acuicultura presentó un crecimiento promedio anual de un 16,6%. En el mismo periodo la producción total de la actividad acuícola fue variable. Para el año 2007 se obtuvieron 3014 t, mientras que en el 2015 fue de 3681 t. En cuanto a la producción de truchas arcoíris alcanzó en 2007 las 1800 t (Panne Huidobro 2015).

En general los cultivos de trucha se realizan en agua dulce, aunque en Patagonia se realizaron cultivos en agua salada en las localidades de Camarones, Puerto Madryn y Ushuaia. Para poder aumentar el desarrollo del cultivo de salmónidos, el principal inconveniente es el valor de los alimentos balanceados, que representan no menos del 60% del costo de la producción (Choubert y col. 1999, FAO 2014a, FAO 2014b). A esta causa se le atribuye las disminuciones registradas en la producción en años como el 2015 (Panne Huidobro 2015).

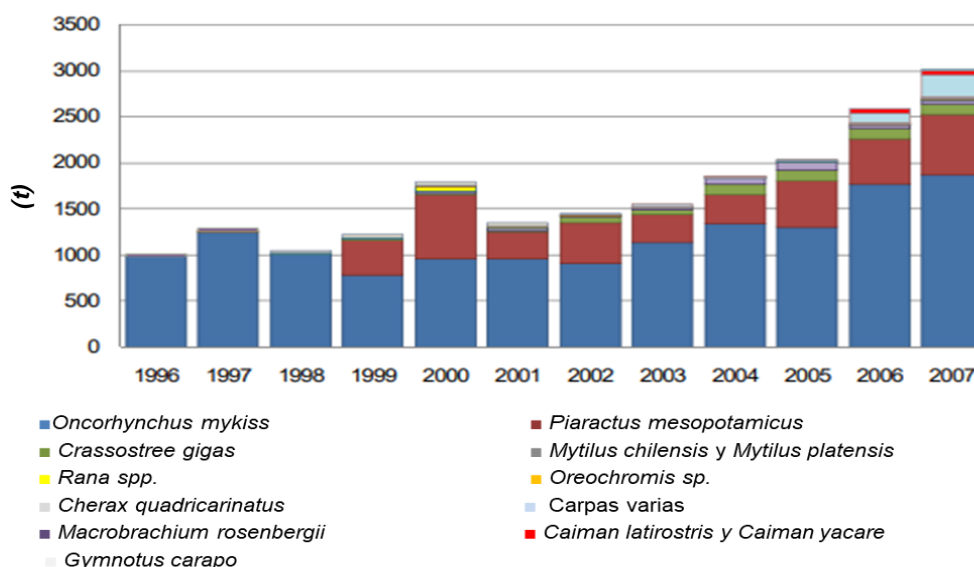


Figura 5. Principales especies cultivadas en Argentina. (Luchini y Panné Huidobro 2008)

Los salmónidos se caracterizan por el color rosado de sus carnes. Este color lo adquieren en la alimentación dado que no poseen capacidad de síntesis *de novo* de los pigmentos. Por esta razón es que los alimentos balanceados contienen pigmentos entre los que puede encontrarse el pigmento carotenoide

astaxantina o astaxantina en combinación con cantaxantina (Storebakken y col. 1987, Torrison 1989). Si bien los pigmentos carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, sólo la astaxantina y la cantaxantina son de importancia en acuicultura (Amaya y Nickell 2015). La adición de estos pigmentos representa un 15-20% del total de los costos de alimentación (Choubert y col. 1999, Bjerkeng 2000).

1.3. Características de los alimentos balanceados

Los alimentos balanceados se preparan para cubrir las necesidades nutricionales de los peces en las distintas etapas de crecimiento y desarrollo. Hay alimentos balanceados para alevinos (iniciador), juveniles (crecimiento), dietas de engorde y para reproductores. Estos alimentos varían en tamaño y el contenido de proteínas que disminuye a medida que aumenta el tamaño del pez (FAO 2014 b). Los alimentos balanceados tienen entre sus ingredientes aceites de diferentes fuentes, ricos en ácidos grasos (FA) con distintos grados de insaturación. Los FA son moléculas formadas por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxílico. En animales los FA contienen entre 14 a 22 carbonos y pueden presentar de 1 a 6 dobles enlaces (Christie 1990). De acuerdo al grado de insaturación que presentan, pueden clasificarse como ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) (Rubio-Rodríguez y col. 2010). Los MUFA en los tejidos animales presentan un largo de entre 10 a 30 carbonos, y en su estado natural, la insaturación que presentan es del tipo *cis*. Los PUFA, contienen de 2 a 6 insaturaciones. Tanto los MUFA como los PUFA pueden nombrarse en relación a la posición que se encuentra el doble enlace respecto al grupo carboxilo con las letras n u ω . Los más comunes son: n_9 , n_6 y n_3 (Christie 1990). En el caso del alimento balanceado con aceite de pescado, estos aceites aportan PUFA de cadena larga, que son altamente susceptibles a oxidarse, lo cual causa deterioro del alimento y pérdida de la calidad. Para evitar la rancidez provocada por la oxidación de los FA, se agregan diversos antioxidantes, como lo son el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA) o también se usan antioxidantes naturales como el α -tocoferol (Loftsson y col. 2016).

En la trucha arcoíris el contenido de proteínas requerido es en promedio de 38%. Por otro lado, se sabe que los lípidos dietarios son fuente de energía y de

ácidos grasos esenciales (EFA) necesarios para el normal desarrollo y crecimiento de los peces (Lall y Dumas 2015). Los lípidos son además necesarios para la correcta absorción de vitaminas y compuestos liposolubles entre los que se encuentran los carotenoides. Se sabe que incrementando la cantidad de lípidos se incrementa la pigmentación (Choubert 1999). Los peces no poseen capacidad de síntesis *de novo* de ácidos grasos poliinsaturados n3 (Figura 6) y n 6.

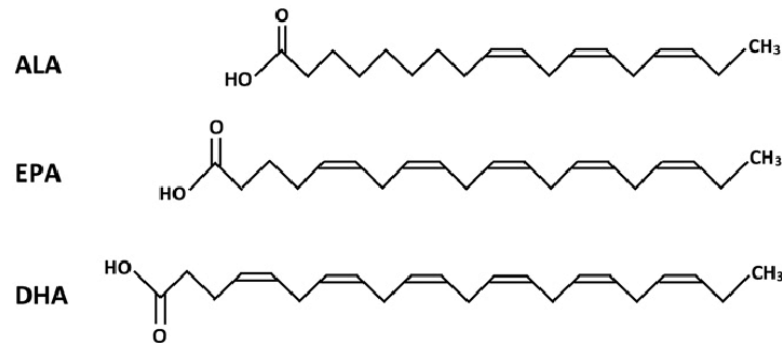


Figura 6. Estructura de ácidos grasos insaturados α - linolénico (ALA), eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA).

Los peces de agua dulce necesitan incorporar en la dieta ácido linoleico (AL) y ALA y a partir de estos pueden suplir sus requerimientos de EPA, ácido araquidónico (AA) y DHA (Figura 7). En trucha, estos requerimientos son LA 1,0%, ALA 0,7-1,0% y n 3-PUFA de cadena larga 0,4-0,5 % aportados por la dieta. Es importante la presencia de los EFA en la dieta por su estrecha relación con la respuesta inmune. La deficiencia de EFA en la dieta de los peces produce miocarditis, reduce el crecimiento, la eficiencia en la pigmentación y produce alta mortalidad; afecta también a la reproductibilidad (Lall y Dumas 2015).

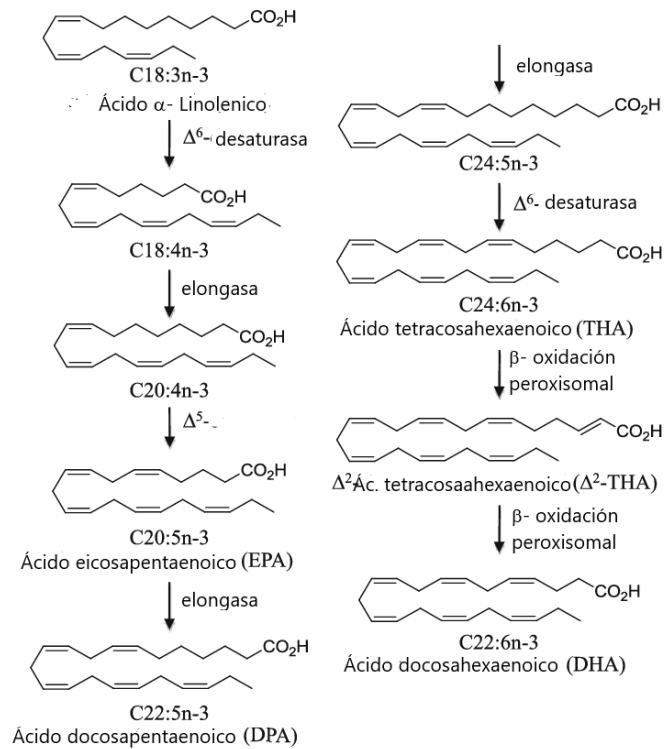


Figura 7. Rutas de bioconversión de ácidos grasos y prostaglandinas (Itoh y col. 2011).

Otro de los lípidos de interés en nutrición es el colesterol, que se encuentra dentro del grupo de los esteroides (Figura 8). El colesterol está formado por un sistema de 4 anillos, el ciclopentanoperhidrofenantreno. Se lo puede encontrar naturalmente en dos formas: la libre responsable de mantener la fluidez de la membrana plasmática, y formando ésteres (Christie 1990). En salmónidos, el nivel de colesterol normal en plasma es elevado en comparación a los mamíferos (Farrel y Munt 1983) y está directamente relacionado con la dieta. Se sabe que dietas suplementadas con hasta un 3% de colesterol no generan patologías (Farrel y col. 1986). Existe evidencia de que el colesterol juega un importante rol en el transporte plasmático de astaxantina (Chinsung y col. 2013).

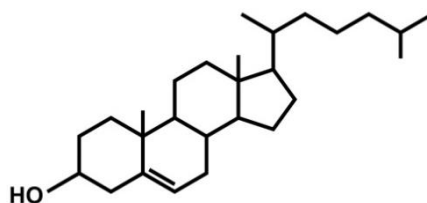


Figura 8. Estructura química del colesterol.

Dentro de los compuestos lipídicos, los pigmentos liposolubles cumplen una importante función en la dieta de los salmónidos. Los mismos son sintetizados por plantas, algas, microalgas, bacterias y levaduras, aunque se encuentran presentes en muchos animales que los incorporan a través de la dieta (Stahl y Sies 2003, García-Chavarría y Lara-Flores 2013). En este grupo se encuentran los carotenoides, ampliamente distribuidos en la naturaleza. El rango de colores que abarcan va desde amarillo hasta rojo oscuro, esto se debe a los diferentes grupos cromóforos unidos a la estructura base (Latscha 1989). Los carotenoides juegan un importante rol en el proceso de fotosíntesis y protegen a los organismos del daño por efecto de la luz y oxígeno (García-Chavarría y Lara-Flores 2013).

De acuerdo a su estructura química los carotenoides pueden clasificarse en dos grupos: carotenos los que están formados solamente por carbono e hidrógeno, y las xantofilas en las cuales se encuentra presente al menos 1 átomo de oxígeno (Stahl y Sies 2003, Ribeiro y col. 2018). La Figura 9 muestra la estructura de algunos carotenoides de importancia en distintas industrias.

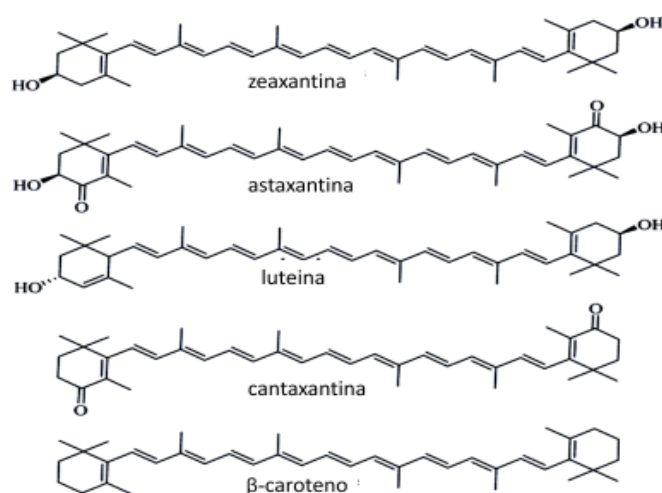


Figura 9. Estructura química de algunos carotenoides. (Agbozo y col. 2018)

Se sabe que los carotenoides son compuestos antioxidantes, que interactúan con los radicales libres de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza y estructura del carotenoide y del radical. Los carotenoides pueden actuar como antioxidantes: mediante la adición del radical a la cadena poliénica, donando un H al radical, o mediante la transferencia de un electrón como se muestra en las reacciones 1, 2 y 3 respectivamente (Focsan y col. 2017).



1.4. Astaxantina

Químicamente la astaxantina ((3S, 3'S) 3,3'- dihidroxi- β,β' caroteno- 4,4'-diona) es un pigmento carotenoide perteneciente a las xantofilas, dado que posee oxígeno en su estructura química (Figura 10 A). Al igual que el resto de los carotenoides posee una estructura polienica grande (40 átomos de carbono), formada por una cadena de 8 unidades de isopreno, por lo que es altamente susceptible a la oxidación, el calor y la acción de los rayos UV, efectos que provocan la isomerización de la molécula (Choubert 1999, Latscha 1989, Higuera-Ciapara 2004, Amaya y Nickell 2015). Cada doble enlace de la cadena poliénica puede existir en dos configuraciones, como isómeros geométricos *cis* o *trans*. Los isómeros *cis* son termodinámicamente menos estables que los isómeros *trans*. La mayoría de los carotenoides en la naturaleza son predominantemente *trans* (Britton y col. 1995). Además de formar isómeros geométricos, hay que considerar que cada molécula tiene dos centros quirales en C3 y C4, por lo que esto da lugar a la posibilidad de tres isómeros configuracionales: dos enantiómeros (3R, 3R y 3S, 3S) y una forma meso (3R, 3S). De todos esos isómeros, el 3S, 3S es el más abundante en la naturaleza (Parajo y col., 1996, Strati y col. 2012). Dependiendo de su origen la astaxantina puede hallarse en asociación con otros compuestos. También puede presentar esterificados uno o dos de sus grupos hidroxilos (OH) con diferentes ácidos grasos tales como palmítico, oleico, esteárico o linoleico, y también puede encontrarse en su estado libre, es decir, con sus grupos hidroxilo sin esterificar, o también formando complejos químicos con proteínas (carotenoproteínas) o lipoproteínas (carotenolipoproteínas). La astaxantina sintética no está esterificada mientras que la hallada en las algas está siempre esterificada. Los crustáceos por otro lado, presentan una mezcla de las tres formas de astaxantina (Maoka, 2011).

Es un pigmento rojo, y un potente antioxidante. Se ha reportado que su eficacia antioxidante es superior al α -tocoferol y β -caroteno (Higuera-Ciapara y col. 2006), incluso algunos autores sugieren que es el antioxidante natural más potente (Satoh 2016). Los grupos hidroxilos presentes en la molécula le permiten la esterificación con hasta dos ácidos grasos, dando lugar a las formas monoesterificadas y diesterificadas (Figura 10 B y C). La astaxantina también puede encontrarse unida a proteínas, forma en la que se encuentra en algunos crustáceos formando crustacianinas, las mismas son de color azul y son más frecuentes en otras especies de crustáceos como las langostas (vivas). Durante el proceso de cocción, la unión a proteínas se rompe quedando la astaxantina libre otorgando el color rojo de la langosta cocida (Amaya y Nickell 2015).

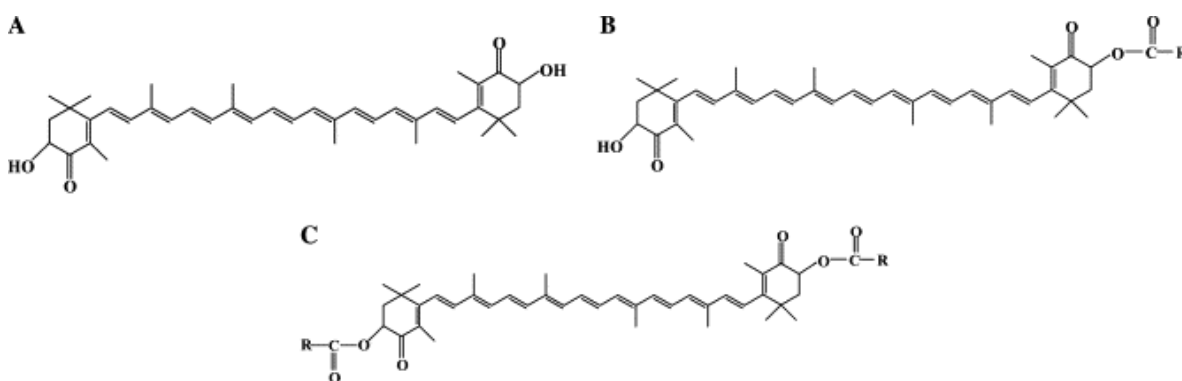


Figura 10. Estructura química de las distintas formas de astaxantina. A: libre; B: monoesterificada; C: diesterificada.

La astaxantina cumple variadas funciones en los peces. Contribuye al correcto desarrollo del embrión y a la reproducción, dado que protege a las células del daño oxidativo (Higuera-Ciapara y col. 2004, García-Chavarría y Lara-Flores 2013). La astaxantina es utilizada como protección ante los depredadores por algunos peces, les permite camuflarse, y también es importante en el reconocimiento, comunicación y comportamiento sexual (García-Chavarría y Lara-Flores 2013, Amaya y Nickell 2015). Durante el proceso de maduración sexual, el contenido de carotenoides disminuye en músculo y se concentra en la piel de los machos y en los ovarios de las hembras (Choubert 1999). También se ha demostrado su acción estimuladora del sistema inmune, incrementando la actividad de leucocitos y células fagocíticas (Moghaddam y col. 2015), y como precursor de la vitamina A (García-Chavarría y Lara-Flores 2013).

En los humanos se ha demostrado que la astaxantina tiene efecto anticancerígeno y ejerce protección contra enfermedades de tipo cardiovascular e hipertensivo. Si bien, a diferencia de otros carotenoides, no es precursor de la vitamina A, ejerce un efecto UV-fotoinhibitorio protegiendo a la piel de lesiones (Guerin y col. 2003). Debido a su capacidad antioxidante, se ha usado astaxantina para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y neurodegenerativas (Sato 2016). En humanos es utilizada como suplemento dietario por su capacidad antioxidante (Higuera-Ciapara 2004).

Debido a las características mencionadas anteriormente, como pigmento y antioxidante, la astaxantina tiene importancia en diferentes industrias, como nutracéutica y cosmética. Actualmente su principal uso y demanda es en acuicultura, dado que es el pigmento responsable de la coloración de la carne de los salmónidos (Higuera-Ciapara y col. 2006). Es considerada por varios autores como el carotenoide más eficiente en la pigmentación de salmónidos (Torrissen y col. 1989, Storebakken y No 1992, Bjerkeng 2000), además de que algunos autores recomiendan el agregado de una mínima cantidad para asegurar el bienestar de los peces y por su capacidad antioxidante (Bjerkeng 2000). La presencia de pigmentos en algunos alimentos es importante para el consumidor, esto se debe a que contribuye en la apariencia y aceptabilidad del producto (Amaya y Nickell 2015, Goswami y col. 2015). En el caso de los salmónidos la coloración de la carne es indicativa de calidad.

La mayor parte de la astaxantina utilizada en alimentos balanceados es de origen sintético y se encuentra en la forma libre en una mezcla de enantiómeros (3S, 3S), (3R, 3S), y (3R, 3R) en proporciones 1:2:1 respectivamente (Higuera – Ciapara 2006, Takeungwongtrakul y col. 2015, Kandra y col. 2017). En el comercio existe también astaxantina sintética diesterificada (dimetil-disuccinato de astaxantina) que se ha demostrado tiene eficacia similar a la astaxantina libre en cuanto a la pigmentación de la carne de los salmónidos, dado que es hidrolizada en el tracto gastrointestinal y luego absorbida en su forma libre (Choubert 1999, Amaya y Nickell 2015). Entre los productos comerciales se encuentra el Carophyllpink® de la empresa DMS nutritional products, que es la más utilizada en el país.

Existen reportes del agregado de astaxantina natural obtenida de distintas especies de plantas, que la sintetizan a partir del licopeno (Latscha 1989, Higuera-

Ciapara y col. 2006), microalgas como *Haematococcus pluvialis* o *Phaffia rhodozyma* y a partir de crustáceos como el langostino *Pandalus borealis*, y los cangrejos *Procambarus clarkii* y *Chionoecetes opilio* (Higuera-Ciapara y col. 2006, García-Chavarría y Lara-Flores 2013). La utilización de aceites de crustáceos en alimentos balanceados tiene el beneficio de que además de astaxantina poseen y aportan PUFA de cadena larga omega 3 (n-3)-PUFA (Miller y col. 2008).

En crustáceos, la astaxantina es el carotenoide más abundante (Amaya y Nickell 2015), esta se encuentra principalmente en el cefalotórax, epidermis abdominal y exoesqueleto abdominal (Seabra y Pedrosa, 2010). Es por esta razón que pueden considerarse como fuente de astaxantina natural los descartes del procesamiento de dichos organismos y como materia prima barata para la obtención de alimentos balanceados (Morales y Calvo 1987, Sindhu y Sherief 2011). La astaxantina obtenida de los residuos del langostino *P. borealis* constituye hoy en día una de las fuentes comerciales de astaxantina natural (Sindhu y Sherief 2011).

1.5. Uso de astaxantina como antioxidante

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los organismos vivos es consecuencia de las actividades metabólicas normales. Las reacciones aeróbicas exponen a los organismos a una variedad de compuestos prooxidantes capaces de dañar moléculas de importancia biológica como ADN, proteínas, hidratos de carbono y lípidos (Stahl y Sies 2003). Alrededor de un 5% del O₂ consumido por los organismos vivos llevan a la formación de ROS a través de la reducción parcial del O₂ con la adición univalente de un electrón. Esta reducción parcial del O₂ produce especies como el anión radical superóxido (O₂^{•-}), el radical hidroxilo (•OH) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estas especies son inestables y reaccionan rápidamente con otros grupos o sustancias en las células y tejidos dañándolos (Je y col. 2004, Halliwell 2006, Pospíšil 2009). Los organismos cuentan con un sistema de defensa antioxidante sin embargo, cuando una determinada condición provoca la interrupción de la señalización y control redox se produce lo que se denomina estrés oxidativo (Jones 2006). Esto ocurre por un aumento en la producción de ROS o por una disminución en la actividad antioxidante. Se ha postulado que el daño oxidativo causado a las macromoléculas tales como lípidos, proteínas y DNA, es iniciado por la adición del •OH, seguido por

las reacciones de propagación características de las reacciones radicalarias (Porter 1986). Particularmente, los procesos de peroxidación lipídica ocurren mediante un conjunto de reacciones en cadena (Figura 11). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son muy susceptibles a la oxidación producidas por ROS debido a la presencia de los dobles enlaces en las estructuras químicas. En la etapa de iniciación de la reacción en cadena, se produce el radical alquilo (LR^\bullet), que posteriormente reacciona en la etapa de propagación para dar el radical lipoperoxilo ($LROO^\bullet$). Seguidamente este intermediario puede reaccionar con otra molécula de ácido graso, obteniéndose el hidroperóxido lipídico ($LROOH$) y otro LR^\bullet .

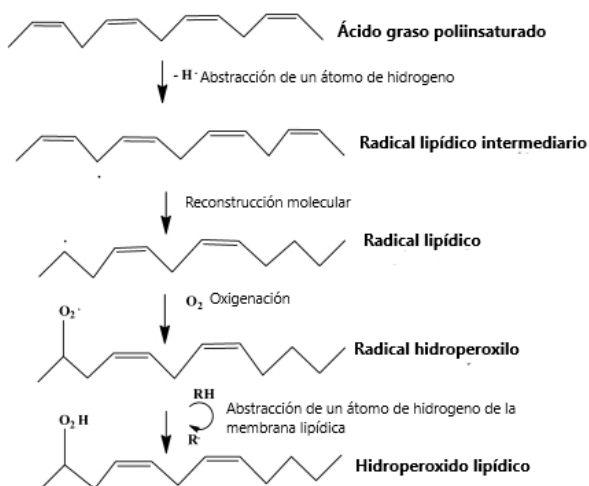


Figura 11. Reacciones de peroxidación de ácidos grasos. (Basu 2007).

La astaxantina posee un alto potencial de oxidación en comparación a otros carotenoides. La posición y la naturaleza polar de los carbonilos y los hidroxilos presentes en la molécula explican su capacidad antioxidante. Las características estructurales de la astaxantina les otorgan propiedades únicas respecto a otros carotenoides. La presencia de los grupos hidroxilos y carbonilos en las posiciones C3 (C3') y C4(C4') en los anillos ciclohexenicos le permiten formar complejos de coordinación con metales como Ca^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} (Figura 12). La formación de los complejos con Fe^{+2} inhibe la formación de ROS, producidos por la reacción de Fenton (Focsan y col. 2017).

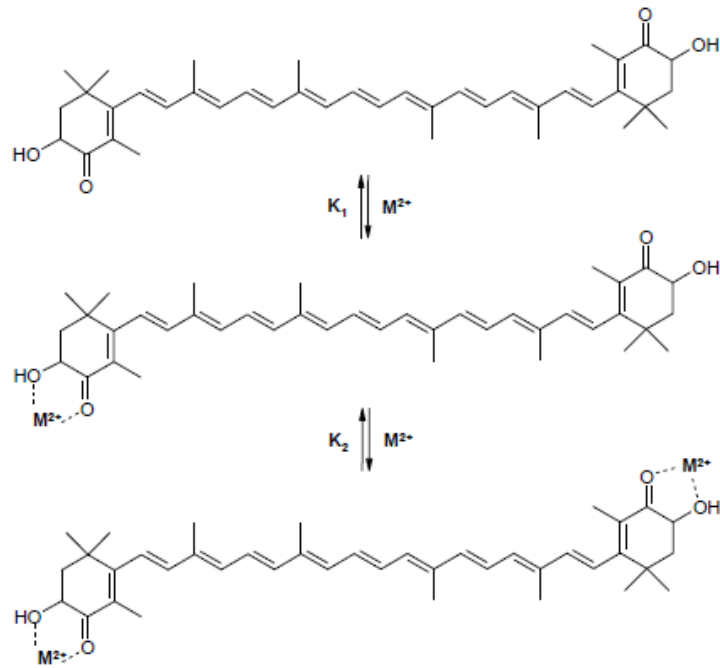


Figura 12. Complejos de astaxantina con metales divalentes (M²⁺). (Focsan y col. 2017).

En párrafos anteriores se mencionó la riqueza en ácidos grasos poliinsaturados de los peces, y la susceptibilidad de los mismos a la oxidación, que dan como consecuencia la rancidez del alimento, con la pérdida de las características organolépticas. De ahí la necesidad de adicionar antioxidantes en los procesos de producción, existen reportes de la adición de acetato de α -tocoferol para tal fin (Boggio y col. 1985). Es bien conocido el uso de carotenoides con función antioxidante agregado durante distintas etapas del proceso industrial tales como: el crecimiento en cultivos, procesamiento y almacenado tanto de peces y otras especies, como así también productos elaborados, (Krinsky 1993, Jensen y col. 2007, Han y col. 2018). Esto se debe a que los carotenoides en las condiciones naturales de los organismos son los antioxidantes que reaccionan de manera más eficiente con los radicales peroxilos, generados durante la peroxidación lipídica (Stahl y Sies 2003). Estos carotenoides agregados son de origen sintético en la mayoría de los casos (Steinbrenner y Sandmann 2006; Martín y col. 2008), y su uso en acuicultura está limitado según la especie (García-Chavarría y Lara-Flores 2013). En los últimos años ha aumentado la demanda por el uso de antioxidantes de origen natural no sólo por su capacidad pigmentadora

sino también para controlar la rancidez, limitar el deterioro y la pérdida de la calidad futura (Martín y col. 2008).

1.5.1. Determinación de la capacidad antioxidante

Los radicales libres son especies inestables, muy reactivas y se encuentran en baja concentración por lo que su análisis es difícil. La Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) es actualmente la técnica analítica que permite la identificación y cuantificación de radicales libres (Kispert y col. 2004, Malanga y col. 2012). La técnica de EPR es una herramienta sensible que permite medir concentraciones a partir de 10^{-13} moles de sustancias paramagnéticas (Eisenberg y Crothers 1979). Sin embargo, dada la inestabilidad de estas especies es necesario utilizar intermediarios que reaccionen con los radicales obteniéndose compuestos de vida media más larga. Estos intermediarios reciben el nombre de atrapadores y generalmente son especies reactivas que secuestran radicales libres en matrices no-reativas (Malanga y Puntarulo 2012). También se forman especies radicales estables adicionando moléculas-atrapadoras de espín exógenas que reaccionan primariamente con los radicales libres para dar aductos radicales con tiempos de vida media más largos y con espectros de EPR característicos. Estos atrapadores de espín generalmente son nitroxidos o nitrona-derivados que reaccionan con biomoléculas lábiles (Borbat y col. 2001). Para determinar $\bullet\text{OH}$ o $\text{LR}\bullet$, a temperatura ambiente, generalmente se emplean atrapadores de espín.

Otro método ampliamente utilizado para medir la capacidad antioxidante tanto de sustancias puras, extractos, productos naturales, alimentos, o drogas es la determinación de la Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC) (Huang y col. 2005, Dudonné y col. 2009, Zapata y col. 2014). Este método es un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peroxilo, relevante en la oxidación de lípidos en los alimentos; mediante un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno. En este ensayo, los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) generados por iniciadores de radicales libres, reaccionan con una sonda fluorescente para formar un producto oxidado no fluorescente; es decir, a medida que avanza la reacción la sonda fluorescente se consume y disminuye la fluorescencia. El antioxidante adicionado al medio compite con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia. Además, este método puede medir

la expresión antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos en una muestra. Es un método muy utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos y productos naturales (Huang y col. 2005, Dudonné y col. 2009, Zapata y col. 2014). El ORAC combina tanto el porcentaje de inhibición como el tiempo de inhibición de los radicales libres por la acción de un antioxidante. Se utiliza el área bajo la curva para realizar la cuantificación, los resultados se expresan como unidades ORAC o equivalentes de Trolox (Sánchez-Moreno 2002).

1.6. Metodologías para la extracción de carotenoides a partir de fuentes naturales

Los carotenoides son compuestos no polares o de baja polaridad en el caso de las xantofilas. Es por esta razón que una de las extracciones más utilizadas es con solventes orgánicos, en la cual se produce la solubilización de los carotenoides. A tales fines se ha probado una amplia variedad de solventes, de distintas polaridades (acetona, metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo, etilmetilcetona, éter de petróleo, hexano), estos solventes se utilizaron en forma de solvente único de extracción o en mezclas de solventes (Chunua y col. 2006, Sachindra y col. 2006, Nianmuy y col. 2008, Sánchez-Camargo y col. 2011, Parjikolaei y col. 2015). La utilización de mezclas de solventes en la extracción de carotenoides tiene como ventaja el rendimiento de extracción. Se ha realizado la extracción a partir de distintos organismos, como microalgas (Goto y col. 2015), levaduras (Chunua y col. 2006), crustáceos (Nianmuy y col. 2008) y sus restos (Sachindra 2006, Sánchez Camargo 2011, Parjikolaei y col. 2015). Sin embargo, este método que utiliza solventes orgánicos ha quedado restringido sólo para uso en laboratorio, debido al interés creciente en la utilización de métodos más “amigables” con el medio ambiente, y de menor toxicidad, siendo este aspecto de mayor relevancia si se trata de un producto alimenticio. También se ha realizado la extracción de astaxantina con diferentes aceites vegetales. Parjikolaei y col. (2015) utilizó aceite de girasol, y metilesteres del mismo; Pu y col. (2010) utilizó aceite de linaza pero obtuvo rendimientos menores a los obtenidos con solventes orgánicos. Otro método actualmente utilizado es la extracción por fluidos supercríticos. Al respecto, existen reportes de la extracción de distintos carotenoides a partir de algas, microalgas y otra especie de langostino (Sánchez-Camargo y col. 2011,

Goto y col. 2015). Como desventaja de esta extracción se puede mencionar que se requiere equipamiento especial y de alto costo.

Los diferentes tipos de extracciones mencionadas dan como resultado la obtención de un extracto, el cual además de carotenoides contiene otros compuestos de afinidad similar, como triglicéridos y colesterol, entre otros lípidos. Por lo que es necesario, si lo que se desea es obtener sólo carotenoides, realizar posteriores procedimientos para la separación del resto del material, como particiones líquido-líquido o utilizar métodos de cromatografía preparativa.

Se sabe que la degradación de la astaxantina sigue una cinética de primer orden (Niamnuy y col. 2008, Hernández- Becerra y col. 2014) y depende de las condiciones de almacenamiento (Vakarelova y col. 2017). Existen reportes sobre la estabilidad de la astaxantina obtenida a partir de descartes de crustáceos, principalmente de diferentes especies de langostinos (Guillou y col. 1995, Ahmed y col. 2015, Bustamante y col. 2016) y de la influencia en la estabilidad de los FA acompañantes (Gómez- Estaca y col. 2017).

Hipótesis y objetivos

Los descartes constituyen serios problemas ambientales y considerando que contienen compuestos de valor agregado pueden ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados (Kandra y col. 2012). Este trabajo se focaliza en extraer fracciones ricas en astaxantina, cuantificar la misma y evaluar su estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento

Hipótesis

Se podrá extraer una fracción rica en astaxantina a partir de residuos de la industria local procesadora de langostino y centolla.

Objetivo General

Aumentar la calidad nutricional de alimentos balanceados para acuicultura a partir de la extracción de materias primas presentes en los residuos de langostino y/o centolla. Esto contribuirá a disminuir la contaminación local originada por la eliminación de residuos de la industria procesadora de langostino y centolla.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudiar la composición química proximal, contenido y calidad de ácidos grasos, colesterol, contenido en carotenoides y astaxantina a partir de material de descarte proveniente del procesamiento industrial de langostino (*P. muelleri*) y centolla (*L. santolla*). Seleccionar la biomasa más adecuada en base a los resultados obtenidos.

Objetivo 2: Obtener un extracto rico en carotenoides; evaluar su estabilidad en diferentes matrices de conservación y estudiar la variación en contenido de carotenoides, astaxantina, ácidos grasos y capacidad antioxidante en diferentes épocas de captura y bajo distintas condiciones de almacenamiento.

Objetivo 3: Elaborar y caracterizar alimentos balanceados con y sin suplementación con extracto rico en astaxantina preparado en el objetivo 2. Evaluar en forma comparativa el contenido en carotenoides, perfil de ácidos grasos y capacidad antioxidante.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

Las muestras consistieron en cáscaras y residuo completo de *P. muelleri* y cáscaras de *L. santolla*. Las muestras de langostino fueron provistas por las empresas pesqueras “Mar del Chubut SRL” y el B/P “El Gauchito”. Las muestras de centolla fueron obtenidas de las capturas de los barcos centolleros “Tango 1” y “Tango 2”. En todos los casos el traslado de las muestras congeladas fue refrigerado. Se trabajó sobre tres tipos de descartes: cáscaras de *L. santolla*, cáscaras de *P. muelleri* y residuo completo de *P. muelleri*. Una vez en el laboratorio, el material (cáscaras) fue lavado bajo corriente de agua para quitar restos de carne. Se trabajó tanto con muestras secas como con húmedas. Las muestras secas fueron oreadas diez días a temperatura ambiente en lugar seco al abrigo de la luz. Previo al análisis el material fue molido en un molino marca Retch con tamiz de 1mm (polvo). Para las determinaciones sobre material húmedo, el material fue directamente homogeneizado con picadora de carne manual (pasta).

2.2. Composición centesimal

Se utilizaron las técnicas propuestas por la AOAC (1990) para humedad, cenizas y determinación del porcentaje de nitrógeno. La determinación de lípidos se realizó según Bligh y Dyer (1957). El contenido de quitina fue determinado de acuerdo a Fargani y col. (2016). Las determinaciones de composición centesimal realizadas a los descartes de *P. muelleri* y *L. santolla* corresponden a muestreos de marzo de 2014, marzo de 2015 y marzo de 2018. Todos los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar de tres (3) réplicas por muestra.

2.2.1. Humedad

Se pesaron 5 g de muestra homogénea en una balanza analítica de muestra homogénea en un crisol de porcelana, previamente tarado. Luego se colocó la muestra en estufa a 100-105°C hasta alcanzar peso constante. Se utilizaron una estufa de secado y cultivo (FAC, Argentina), y una balanza analítica marca Pionner. El porcentaje de humedad se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 - P_2) * 100}{(P_1 - P_0)}$$

En donde:

P₁= peso de crisol + muestra húmeda

P₂= peso de crisol + muestra seca

P₀= peso de crisol vacío

2.2.2. Cenizas

Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana previamente tarado. La muestra se carbonizó en la llama, luego se colocó en horno mufla (ORL, Argentina) a 550°C hasta obtención de cenizas blancas. Se pesó el contenido de cenizas y se realizó el cálculo de porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_1 - P_2) * 100}{g \text{ de muestra húmeda}}$$

donde:

P₁= peso del crisol + cenizas

P₂= peso del crisol vacío

2.2.3. Nitrógeno total y proteínas

Se pesó 1 g de muestra en un balón Kjeldahl para la determinación del nitrógeno total. Para la determinación de nitrógeno en quitina, se utilizó el material obtenido de la determinación de la misma. Al material pesado se le agregaron 10 ml de H₂SO₄ y 1 g de catalizador (SO₄Cu y Se), se realizó la digestión de la muestra utilizando un equipo de digestión Tecnodalvo (Argentina) hasta que la solución se tornó cristalina. Finalizada la digestión se agregaron 25 ml de agua destilada y 50 ml de NaOH 40% (p/v) y se realizó la destilación (destilador UDK 129 Velp Scietifica, Italia). El destilado fue recogido sobre 10 ml de ácido bórico 4% (p/v). El contenido de NH₄⁺ fue titulado con H₂SO₄ 0,1 N, utilizándose reactivo de Tashiro como indicador.

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{V * N * meq * 100}{g \text{ de muestra}}$$

donde:

V= ml de H₂SO₄ gastados en la titulación

N= normalidad del H₂SO₄

meq = miliequivalentes del Nitrógeno 0,014

g muestra= peso de muestra húmeda

El contenido de proteínas fue calculado utilizando el factor de conversión 6,25 y el %N correspondiente a proteínas. En el caso de las cáscaras tanto de *P. muelleri* y *L. santolla*, este porcentaje se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%N \text{ proteico} = \%N \text{ total} - \%N \text{ quitina}$$

2.2.4. Quitina

Para esta determinación se pesó 1 g de material y, se realizó la desmineralización con HCl 0,55 M a temperatura ambiente. Posteriormente el residuo fue lavado con agua destilada hasta neutralización y desproteínizado con NaOH 0,33 N. Finalmente se lavó con agua destilada hasta neutralizar nuevamente y se realizaron dos lavados con metanol.

2.2.5. Lípidos

Se realizó la extracción de lípidos a partir de 1,25 g de muestra, utilizando cloruro de metileno-metanol (1:2) como solvente. El solvente se evaporó mediante evaporador rotatorio (Heidolph) con bomba de vacío (Cole- Parmer, Corea).

2.2.6. Hidratos de carbono

El contenido de hidratos de carbono en los alimentos balanceados se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{Lípidos} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Cenizas} + \% \text{Humedad})$$

2.3. Ácidos grasos (FA)

La determinación de FA fue realizada en los residuos, el extracto, las fracciones ricas en astaxantina y las dietas de acuerdo a Lepage y Roy (1984), por

transmetilación directa. Se utilizó como estándar interno ácido heptadecanoico C17:0 (MP Biomedicals, LLC. Illkirch, France). El perfil de FA fue determinado por cromatografía gaseosa, se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 con detector de ionización de llama. La separación de los metilesteres de FA se realizó en una columna capilar Restek Rtx-2330 (30 m, 0.25 mm de diámetro interno, 20 μm ; Retek Corporation 110 Benner Circle Bellefonte, PA), con split 25/1 e hidrógeno, como gas carrier a flujo constante (100 kPa ml. min^{-1}). Se utilizó un programa de temperatura con 120°C de temperatura inicial, durante 1 min. La temperatura se incrementó 10°C. min^{-1} hasta alcanzar los 160°C, luego 3°C. min^{-1} hasta 200°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 240°C. La identificación de los FA se realizó frente a un patrón de ésteres metílicos de FA (Supelco Inc., Supelco Park, Bellefonte, USA).

2.4. Colesterol

El colesterol fue extraído de las muestras por saponificación directa del material con KOH 0,5 N en metanol durante 1h a 80°C en un baño termostático (Arcano). La fracción insaponificable fue extraída con una mezcla de hexano-éter de petróleo (1:1), la misma fue evaporada a sequedad bajo corriente de nitrógeno. La cuantificación fue realizada según Maraschiello y col. (1996), se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, con detector UV-Visible (Smartline 2500, D-14163, Knauer, Alemania), bomba binaria (Smartline 1000, D-14163, Knauer, Alemania). Se utilizó una columna RP-18 (LiChroCART® 125-4). La fracción insaponificable fue resuspendida en 1 ml de fase móvil, filtrada a través de un filtro de 0,22 μm (MILLEX-GV, Millipore, Francia), finalmente inyectada en un loop de 20 μl . La medición fue realizada a $\lambda = 210 \text{ nm}$, el cromatograma fue obtenido mediante el software Clarity Chrom 2.6.5.517. Como fase móvil se utilizó la mezcla acetonitrilo- Isopropanol (55:45) Como estándar externo y para la construcción de la curva de calibración se utilizó colesterol comercial (Fluka 99% pureza).

2.5. Preparación de los extractos

Se realizaron tres extracciones sucesivas, utilizando acetona-metanol (7:3) como solvente (Britton y col. 1995), con una relación muestra: solvente de 1:10. Para los extractos utilizados en las preparaciones de las dietas enriquecidas, el

solvente utilizado fue etanol 96°. Los extractos fueron secados bajo presión reducida en evaporador rotatorio y el rendimiento en el extracto fue obtenido por gravimetría.

2.6. Carotenoides

Extracción

Para la determinación de carotenoides totales, 3 g de muestra homogénea fueron extraídos a temperatura ambiente utilizando acetona-metanol (7:3) como solvente (Britton y col.1995). La cuantificación de carotenoides totales se realizó espectrofotométricamente con un espectrofotómetro (UV-1800 240V Shimadzu corporation, Japón, software UV-probe versión 2.43). Para ello, los extractos fueron resuspendidos en acetona, realizando las diluciones necesarias para lograr una correcta medición espectrofotométrica ($A < 1$). La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración, de patrón de astaxantina (Sigma Aldrich, 92% pureza, Alemania), utilizando un $\epsilon_{477nm} : 2177,4 \text{ 100 ml. g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Aquaresearch 1999).

Cromatografía en placa delgada

Para las separaciones cromatográficas en placa analítica y preparativas, realizadas al extracto de *P. muelleri*, se utilizaron cromatoplasmas de aluminio con silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt Alemania). Se utilizó acetato de etilo-hexano (25:75) como eluyente y estándares comerciales de colesterol, FA (heptadecanoico) y carotenoides (astaxantina y β -caroteno). El uso de acetato de etilo, fue una modificación a la técnica propuesta por Sánchez-Camargo y col. (2011) que se utilizó como referencia. Para la separación preparativa, aproximadamente 50 mg de extracto disueltos en cloruro de metileno fueron sembrados en línea. El análisis se realizó en la cara oscura para evitar el contacto de las fracciones coloreadas con la luz. Las bandas obtenidas fueron separadas de la fase estacionaria con ayuda de una espátula. La separación de los componentes de cada banda y la fase estacionaria fue realizada mediante la disolución de los mismos con acetona-hexano (1:1), luego por filtración se retiró la fase estacionaria y finalmente la eliminación del solvente por evaporación a presión reducida.

Análisis de FA

Las bandas coloreadas obtenidas de la cromatografía en placa delgada preparativa fueron saponificadas y posteriormente se extrajeron los FA de acuerdo a lo propuesto por Sachindra y col. (2005). Los ésteres metílicos obtenidos se separaron cromatográficamente tal como fue descrito en la sección FA.

2.6.1. Astaxantina

Para la determinación de astaxantina 0,02-0,3 g de extracto fueron disueltos en 25 ml de acetona, homogeneizados por sonicación. La cuantificación fue realizada utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución, con detector UV-Visible (Smartline 2500, D-14163, Knauer, Alemania), bomba binaria (Smartline 1000, D-14163, Knauer, Alemania). Se utilizó una columna RP-18 (LiChroCART® 125-4). El extracto redissuelto fue filtrado a través de un filtro de 0,22 μm (MILLEX-GV, Millipore, Francia), y luego fue inyectado en un *loop* de 20 μl . La medición fue realizada a $\lambda = 477 \text{ nm}$, el cromatograma fue obtenido mediante el software Clarity Chrom 2.6.5.517. Como fase móvil se utilizó la mezcla metanol-Isopropanol (67:33), flujo: 1 ml. min^{-1} , durante 10 min. Como estándar externo y para la construcción de la curva de calibración se utilizó astaxantina (Sigma – Aldrich, 92% pureza Alemania). Las condiciones utilizadas fueron optimizadas durante el desarrollo de este trabajo. En todos los casos que fueron necesarios se realizaron las diluciones correspondientes. La cuantificación de las distintas formas de astaxantina presentes en los extractos fue realizada teniendo en cuenta las consideraciones tomadas por Gómez Estaca (2017).

2.7. Disponibilidad de biomasa

La disponibilidad de biomasa de *P. muelleri* y *L. santolla* se calculó a partir de los datos de volúmenes de captura disponibles en el sitio web de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP) y el Ministerio de Agroindustria (Minagri), para los puertos patagónicos de Puerto Madryn, Rawson, Comodoro Rivadavia, Caleta Paula y Puerto Deseado cuyas ubicaciones geográficas se presentan en la Figura 13. Los cálculos de volumen de descartes de *P. muelleri* se llevaron a cabo teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por LLadser y col. (2014) quien considera que las cáscaras representan un 40% del peso del

langostino y que sólo el 20% de la captura hecha por los buques fresqueros es procesado en planta.

Para la estimación del volumen de descarte de *L. santolla*, se utilizaron sólo los volúmenes capturados por la flota costera que son los que llevan material para procesar en tierra (Boschi 2016). Dada la gran dependencia del descarte con el tipo de producto obtenido, y que los productos más comunes del procesamiento de la centolla generan entre el 40 y el 70% del descarte (Boschi y col. 2016), se tomó una posición conservadora considerando el 40% en peso del animal como material de descarte.

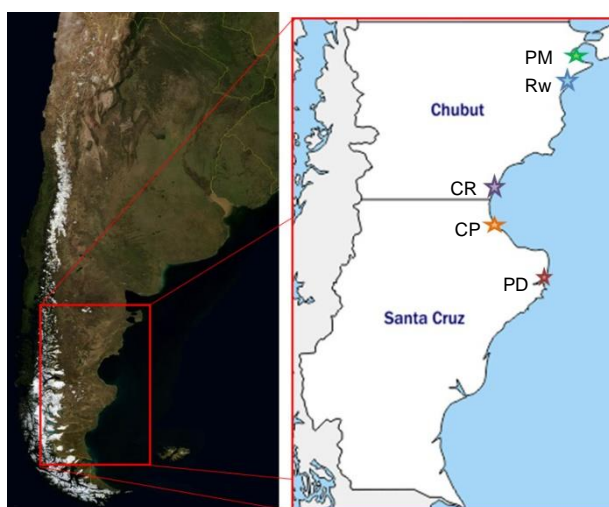


Figura 13. Mapa de la región considerada en el estudio de disponibilidad de biomasa.

PM= Puerto Madryn, Rw= Rawson, CR= Comodoro Rivadavia, CP= Caleta Paula, PD= Puerto Deseado

2.8. Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo

Carotenoides

En el caso de *P. muelleri*, para evaluar la influencia de temperatura y tiempo sobre el contenido de carotenoides, se separaron 9 porciones de aproximadamente 3 g de cáscaras de *P. muelleri* secas y húmedas. Las mismas se colocaron en sobres de papel aluminio, para evitar el contacto directo con la luz. Las muestras fueron separadas por triplicados y se conservaron a diferentes temperaturas (15 ± 2 , 5 ± 1 y -20 ± 1 °C) durante 80 días. Durante ese período se realizó la extracción y cuantificación de carotenoides de las distintas muestras según indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de almacenamiento de cáscaras, para el análisis del efecto de la temperatura en la conservación de carotenoides.

	Cáscara seca			Cáscara húmeda		
	0/15	0/5	0/-20	0/15	0/5	0/-20
Tiempo (días)/ temperatura (°C)	40/15	40/5	40/-20	40/15	40/5	40/-20
	80/15	80/5	80/-20	80/15	80/5	80/-20

Carotenoides en extracto

El efecto de la temperatura y tiempo se evaluó también sobre los distintos componentes carotenoides, presentes en el extracto etanólico de cáscaras de *P. muelleri*. Porciones de extracto de aproximadamente 0,3 g fueron guardadas en viales de vidrio, a diferentes temperaturas (15, 5 y -20°C) y al resguardo de la luz durante 60 días. Se realizó la cuantificación del contenido de carotenoides y bandas que lo conforman, los días 0, 30 y 60.

Capacidad antioxidante

Se evaluó el efecto de la temperatura y tiempo, en la capacidad antioxidante del extracto etanólico de cáscaras de *P. muelleri*. Porciones de extracto de aproximadamente 0,3 g se guardaron en viales de vidrio, a diferentes temperaturas (15, 5 y -20°C) y al resguardo de la luz durante 60 días. Se determinó la inhibición de generación de radicales RL[•], A[•], •OH, los días 0, 30 y 60.

2.9. Preparación de dietas

Se trabajó con alimento balanceado comercial “trucha crumble 3”, marca Ganave Industria Argentina. La composición centesimal del mismo se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición centesimal del alimento balanceado base utilizado en la preparación de las dietas.

	g·100g⁻¹
Proteína cruda	47,0 mín
Extracto etéreo	13,0 mín
Fibra cruda	2,0 máx
Humedad	10,0 máx
Minerales totales	18,0 máx
Calcio	4,0 – 5,0 mín – máx
Fosforo	1,7 - 2,7 mín – máx

Mín: contenido mínimo; máx: contenido máximo

El alimento fue molido con molino y al polvo se le agregó gelatina al 2% (p/p) disuelta en agua (3% p/v). Con este material se prepararon las 4 dietas. La Tabla 3 presenta las composiciones de cada una.

Tabla 3. Ingredientes utilizados en la preparación de alimentos balanceados.

Ingredientes (g)	ABB	ABE	ABCP	ABCR
Alimento crumble 3	1000	1000	1000	1000
Gelatina	20	20	20	20
Carophyll pink	-	-	0,5	-
Carophyll red	-	-	-	0,5
Extracto de <i>P. muelleri</i>	-	12	-	-

ABB= Alimento Balanceado Base; ABE= Alimento Balanceado Enriquecido con Extracto; ABCP= Alimento Balanceado con Carophyll Pink; ABCR= Alimento Balanceado con Carophyll Red

2.10. Capacidad antioxidante

2.10.1. Espectroscopia de resonancia paramagnética

La capacidad antioxidante se determinó por EPR en un Espectrómetro Bruker ECS 106. Se realizó la cuantificación de la inhibición de generación de radicales lipídicos, hidroxilos y ascorbato, en extracto y en las dietas. Para ello se realizaron diluciones del aditivo y de alimento balanceado en distintos solventes según el radical a determinar.

2.10.1.1. Generación de radicales lipídicos

Los RL^{\bullet} fueron generados por dihidrocloruro de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH), la estructura química del reactivo se presenta en la Figura 14 A. La mezcla de reacción se preparó con α -(N-Oxido de 4-Piridil)-N-tertilnitrona (POBN) 10 mM (Figura 14 B), AAPH 10 mM y distintas concentraciones del extracto. Esta mezcla se incubó durante 30 min a 37°C y luego se transfirió a una pipeta Pasteur. Se efectuó la medida en un Espectrómetro Bruker ECS 106 (Je y col. 2004). Los espectros fueron obtenidos bajo las siguientes condiciones: operando a 9,75 Ghz con 50 Khz de frecuencia modulada. El equipo de EPR se ajustó para el experimento de spin *trapping* con los siguientes parámetros: poder 20 mW; amplitud de modulación 1,232 G, constante de tiempo 81,92 ms, ganancia 2×10^4 (Jurkiewicz y Buettner 1994). La cuantificación del aducto de spin fue realizada usando una solución acuosa de 2, 2, 5, 5-tetrametil piridina 1-oxyl (TEMPOL), su estructura química se representa en la Figura 14 C. El espectro de EPR fue registrado para muestras y soluciones de TEMPOL, empleando las mismas variables de ajuste del equipo y se calculó la segunda derivada del espectro EPR según Kotake y col. (1996).

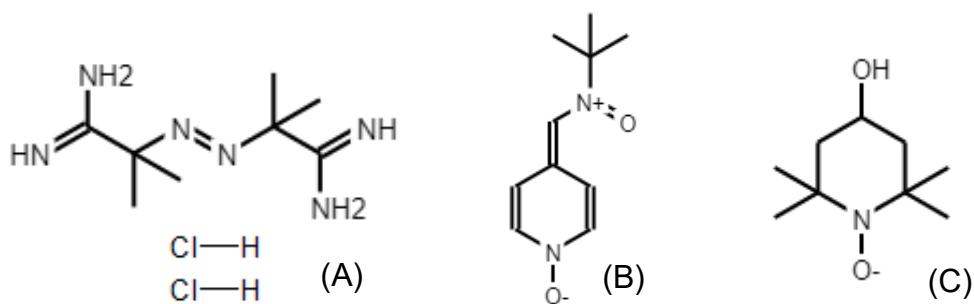


Figura 14. Estructura químicas de reactivos utilizados en la producción de RL^{\bullet} . (A) AAPH, (B) POBN, (C) TEMPOL.

2.10.1.2. Producción de radical hidroxilo

El N-oxido de 5,5-Dimetil-1-pirrolin (DMPO) (Figura 15) fue purificado siguiendo el método de Green y Hill (1984) para remover los contaminantes que contribuyen a modificar la señal de blanco del EPR, previo a su uso. En este procedimiento 10 ml de DMPO 1 mM en agua bidestilada fueron mezclados con

1,25 g de carbón activado por 1 min, luego dejando la reacción 1 h se procede a filtrar. El procedimiento de purificación fue repetido dos veces. El sistema básico de reacción consistió en una solución constituida por DMPO 100 mM, H₂O₂ 10 mM, Fe⁺² 10 mM y solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4). La solución fue incubada durante 3 min a temperatura ambiente y fue transferido a una pipeta Pasteur para la observación directa de la reacción en un Espectrómetro Bruker ECS 106 EPR a temperatura ambiente (Je y col. 2004). El equipo de EPR fue ajustado con los siguientes parámetros: poder 20 mW, amplitud de modulación 0,490 G, constante de tiempo 655,36 ms, campo magnético 100G, tiempo de scan 167.772 ms y frecuencia de modulación 50 Khz.

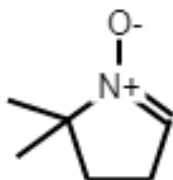


Figura 15. Estructura química del reactivo DMPO utilizado en la generación de radicales [•]OH.

2.10.1.3. Detección de radical ascorbilo

Un espectrómetro Bruker ECS 106 fue usado para la medida de A[•]. Ácido ascórbico (60 mM) fue suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO). La Figura 16 representa su estructura química. El espectro fue inmediatamente medido en las siguientes condiciones: modulación 50 Khz, temperatura ambiente, frecuencia 10 mW, amplitud de modulación 1 G, constante de tiempo 655 ms, ganancia 1 x 10⁵, frecuencia 9,81 Ghz, velocidad de scaneo 0,18 G/s (Giulivi y Cadenas 1993). La cuantificación fue realizada según Kotake y col. (1996).

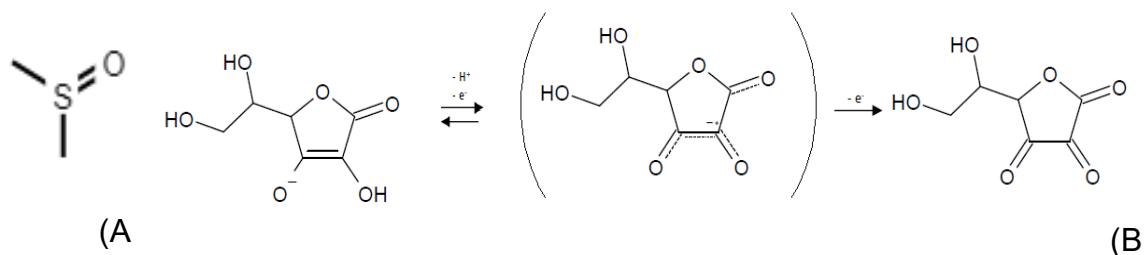


Figura 16. Estructuras químicas del reactivo utilizado en la generación de radicales A^\bullet . (A) DMSO, (B) reacción de formación del radical ascorbilo.

2.10.2. Ensayo de la inhibición de la oxidación de fluoresceína

Para realizar el análisis de la capacidad de absorber radicales del oxígeno en alimentos balanceados y en el extracto, se prepararon las siguientes soluciones: solución reguladora de fosfato de potasio 75 mM pH 7,0, Fluoresceína 10 μ M, ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- carboxílico (Trolox) 200 μ M, AAPH 275 mM, y diluciones de los alimentos balanceados según (Cao y Prior 1999, Ou y col. 2001). Las estructuras de la fluoresceína y trolox se muestran en la Figura 17 A y B respectivamente. En una microplaca de 96 pocillos, se prepararon las soluciones. Se realizó la medición de la fluorescencia emitida cada 60 s hasta que la misma se haya reducido un 5% del valor inicial ($\lambda_{\text{Excitación}} = 493 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emisión}} = 515 \text{ nm}$).

Los resultados se calcularon según la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{(ABC - b)}{m} * \frac{d}{vol}$$

donde:

ABC: Área bajo la curva

b: ordenada al origen de la curva de calibración de Trolox

m: pendiente de la curva de calibración de Trolox

d: factor de dilución

vol: volumen de muestra

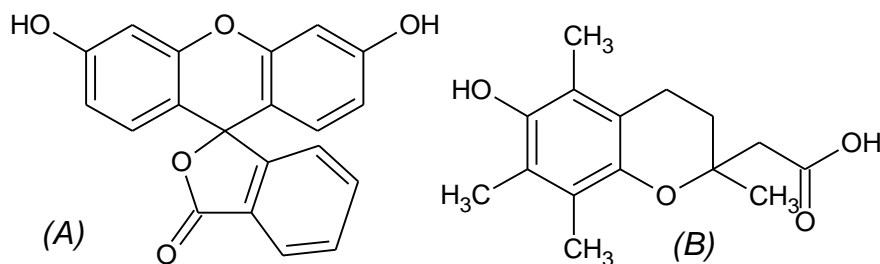


Figura 17. Estructura química de los reactivos fluoresceína (A) y trolox (B), utilizados en el ensayo de inhibición de la oxidación de fluoresceína.

2.11. Estadística

Todos los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar de tres (3) réplicas por muestra. Se utilizó un software libre para realizar los análisis estadísticos. En los experimentos de composición centesimal de cáscaras y determinación de FA de *P. muelleri* y *L. santolla*, evaluación del rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad y comparación de solventes de extracción, se realizó el análisis de Test de Student ($\alpha= 0,05$). En los experimentos de variación del contenido de carotenoides, variación del contenido de FA, composición centesimal de alimentos balanceados y determinación de la capacidad antioxidante en las diferentes muestras, se realizaron los correspondientes ANOVA, seguido de la prueba a *posteriori* (Test de Tukey, $\alpha= 0,05$). En la evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento de cáscaras se realizó un ANOVA multifactorial, $\alpha= 0,05$.

2.12. Reactivos

Para la realización de las distintas experiencias se utilizaron los siguientes solventes de calidad pro-análisis (A.C.S.): acetona (Sintorgan), metanol (Sintorgan), acetato de etilo (Sintorgan), ácido sulfúrico (Sintorgan), ácido clorhídrico (Sintorgan), Éter de petróleo (Biopack). Se utilizó también Cloroformo (Sintorgan) grado plaguicida, y hexano (Sintorgan) calidad espectrofotometría.

El etanol utilizado, fue etanol 96° (Porta) de venta libre. Los solventes utilizados en las separaciones cromatográficas fueron calidad HPLC, Metanol (Sintorgan), isopropanol (Sintorgan), acetonitrilo (Sintorgan).

Además, se utilizaron reactivos como: NaOH (Cicarelli), sulfato de cobre (Biopack). Carophyll pink y Carophyll red, (DSM) donación del Sr Carlo Capella de la empresa Patagonia Pura. Los reactivos que se indican a continuación fueron adquiridos en SIGMA-Aldrich: POBN, DMSO, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 , Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), ácido ascórbico y TEMPOL.

Para realizar cuantificaciones e identificaciones se utilizaron los siguientes patrones comerciales: ácido heptadecanoico C17:0 (MP Biomedicals, LLC. Illkirch, France, Cat n° 195216), patrón de metilesteres de ácidos grasos (Supelco Inc., Supelco Park, Bellfonte, USA, Cat n°18919), colesterol (Fluka, Cat n°26732), astaxantina (Sigma – Aldrich, 92% pureza, Alemania, Cat n° A9335),

3. Resultados

3.1. Componentes de interés presentes en cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*

En este capítulo se presentan los resultados correspondientes al desarrollo del objetivo específico 1. El mismo incluye el estudio de la composición proximal, perfil y cuantificación de FA, contenido de colesterol y carotenoides totales del material de descarte proveniente del procesamiento industrial de langostino (*P. muelleri*) y centolla (*L. santolla*) y, el análisis de la disponibilidad de los descartes de ambas especies.

3.1.1. Composición proximal

La Tabla 4 presenta la composición de cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*. Las cáscaras de *L. santolla* mostraron un contenido significativamente mayor de humedad, y cenizas. Las cáscaras de *P. muelleri* presentaron un porcentaje significativamente mayor de lípidos y de N total. El porcentaje de lípidos en *P. muelleri* fue ocho veces mayor al obtenido en cáscaras de *L. santolla*.

Tabla 4. Composición proximal de cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

	<i>P. muelleri</i>	<i>L. santolla</i>
Humedad (%)	50,4 ± 0,1	56,8 ± 0,5*
CC BS (g·100g⁻¹)		
Lípidos	4,0 ± 1,9	0,5 ± 0,2*
%N total	5,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1*
Cenizas	47,6 ± 1,3	54,6 ± 0,8*
Quitina	19,5 ± 0,2	19,9 ± 3,5
%N Quitina	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2
Proteínas	20,0 ± 0,1	18,1 ± 0,2

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3). (g .100 g⁻¹ de cáscara, base seca).

CC BS: composición centesimal en base seca.

*Significativamente diferente respecto del rendimiento obtenido en *P. muelleri* T student (p<0,05).

3.1.2. Contenido de FA

El contenido de FA en cáscaras de ambas especies se presenta en las Tablas 5, 6 y 7. Existen diferencias significativas en el contenido de FA entre ambas especies. El mayor rendimiento en FA se obtuvo de las cáscaras de *P. muelleri*, este fue diez veces superior al de las cáscaras de *L. santolla*. Las cáscaras de *P. muelleri*, mostraron una mayor riqueza en FA insaturados (MUFA y PUFA), aproximadamente 15 veces mayor que las cáscaras de *L. santolla*.

Tabla 5. Perfil de FA identificados en cáscaras de *P. muelleri*.

FA	% relativo	Concentración
SFA		
C14:0	0,65 ± 0,20	13,65 ± 4,43
C15:0	1,26 ± 0,88	26,00 ± 15,31
C16:0	21,30 ± 3,29	451,21 ± 140,95
C17:0	1,67 ± 0,26	35,38 ± 11,05
C18:0	8,03 ± 1,21	167,15 ± 37,33
ΣSFA	32,92 ± 3,63	693,41 ± 147,09
MUFA		
C16:1	3,71 ± 0,92	77,53 ± 22,78
C18:1n9	15,02 ± 1,47	316,00 ± 83,29
C20:1n9	1,81 ± 0,59	41,27 ± 27,64
C24:1n9	0,41 ± 0,14	8,86 ± 4,03
ΣMUFA	20,95 ± 1,84	443,66 ± 90,76
PUFA		
C18:2n6	1,22 ± 0,12	26,53 ± 11,74
C20:2	1,13 ± 0,27	25,32 ± 14,34
C20:3n6	4,83 ± 0,39	110,36 ± 36,62
C20:5n3	18,01 ± 0,66	387,74 ± 146,26
C22:6n3	22,05 ± 2,01	477,97 ± 198,27
ΣPUFA	47,24 ± 2,17	1027,92 ± 249,78

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. N.D.: no detectado.

Concentración: mg· 100g⁻¹ en base seca.

% relativo: porcentaje relativo del total de FA identificados.

Los PUFA son los FA que se obtuvieron en mayor proporción en las cáscaras de *P. muelleri*. Los mismos, representan alrededor de un 50% del contenido de los FA. Los componentes mayoritarios fueron el C20:5n3 (EPA) y el C22:6n3 (DHA), La suma de ambos representó un 40% del total de los FA. El C16:0 y el C18:1n9 fueron los SFA y MUFA más abundantes, respectivamente.

Tabla 6. Perfil de FA identificados en cáscaras de *L. santolla*.

	% relativa	Concentración
SFA		
C14:0	2,37 ± 1,33	5,51 ± 4,01
C16:0	33,38 ± 7,23	70,14 ± 30,68
C18:0	10,36 ± 4,13	20,27 ± 6,18
C22:0	2,87 ± 3,03	5,61 ± 5,23
ΣSFA	48,98 ± 8,96	101,53 ± 31,98
MUFA		
C16:1	4,46 ± 1,37	9,49 ± 4,94
C18:1n9	8,92 ± 2,43	18,86 ± 9,30
ΣMUFA	13,39 ± 2,79	28,35 ± 10,53
PUFA		
C20:3n6	5,16 ± 0,82	11,18 ± 0,57
C20:5n3	20,47 ± 6,38	39,93 ± 5,40
C22:6n3	14,41 ± 3,86	28,32 ± 2,50
ΣPUFA	40,05 ± 7,51	79,43 ± 5,98

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Concentración: mg·100g⁻¹ en base seca.

Porcentaje relativo de los FA identificados.

Las cáscaras de *L. santolla* presentaron mayor riqueza en SFA. El C16:0 es el FA que se encontró en mayor porcentaje, representando un tercio de la totalidad de los FA. De la misma forma que en *P. muelleri* C18:1n9, C20:5n3 y C22:6n3 fueron los ácidos grasos insaturados más abundantes.

Los indicadores de calidad nutricional como la relación n6/n3 y la relación PUFA/SFA se presentan en la Tabla 7. La razón n6/n3 fue idéntica en ambas

especies, a pesar de las diferencias en el perfil de FA. Respecto al cociente PUFA/SFA *P. muelleri* dobla al valor obtenido en *L. santolla*.

Tabla 7. TFA e indicadores de calidad de FA, en cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

	<i>P. muelleri</i>	<i>L. santolla</i>
TFA	2164,99 ± 303,74	209,31 ± 34,20*
ΣPUFA n-3	865,71 ± 246,38	68,25 ± 5,95
ΣPUFA n-6	136,89 ± 38,46	11,18 ± 0,57
ΣPUFA/ ΣSFA	1,48 ± 0,48	0,78 ± 0,25
ΣPUFAn-6/ ΣPUFAn-3	0,16 ± 0,06	0,16 ± 0,02

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Concentración: mg·100g⁻¹ en base seca.

* Significativamente diferente respecto del rendimiento obtenido en *P. muelleri* T student (p<0,05).

3.1.3. Colesterol

La Figura 18 muestra los cromatogramas obtenidos para el patrón del colesterol y las muestras de *P. muelleri* y *L. santolla*. El colesterol presentó un tiempo de retención de 4,95 ± 0,2 min. Existen diferencias significativas en el contenido del colesterol entre ambas especies. Las cáscaras de *P. muelleri* son aproximadamente 6 veces más ricas en colesterol que las cáscaras de *L. santolla*. El rendimiento de colesterol fue de 334,6 mg·100 g⁻¹ de cáscaras para *P. muelleri*, mientras que en *L. santolla*, fue de 50,5 mg·100g⁻¹.

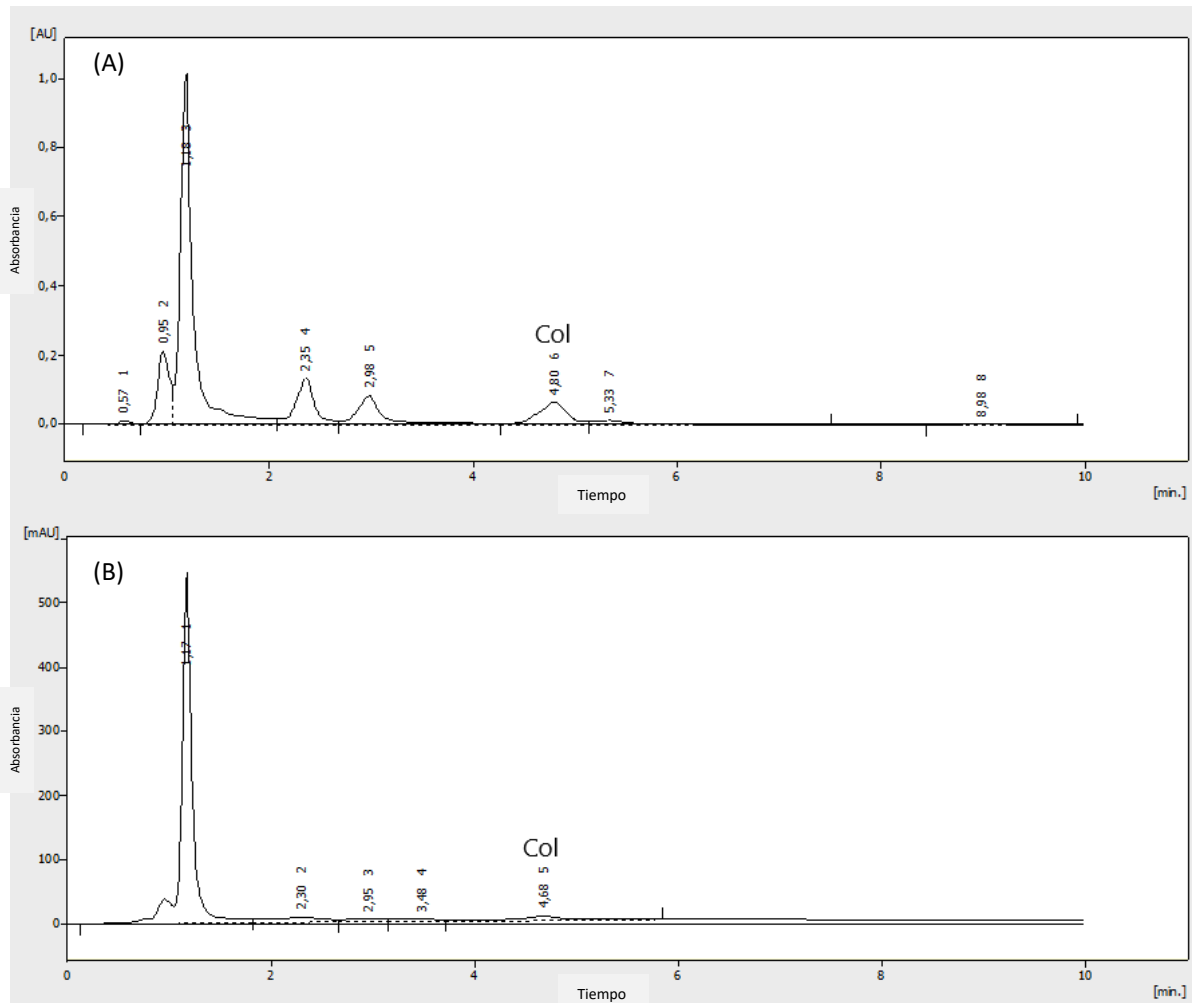


Figura 18. Espectros cromatográficos de HPLC correspondiente al colesterol. (A) En cáscaras de *P. muelleri*, (B) en de cáscaras de *L. santolla*. Col: colesterol.

3.1.4. Carotenoides

El rendimiento de carotenoides presentó diferencias significativas entre ambas especies (T student, $p < 0,05$). *P. muelleri* alcanzó valores de aproximadamente el doble que *L. santolla* (Figura 19).

(B)

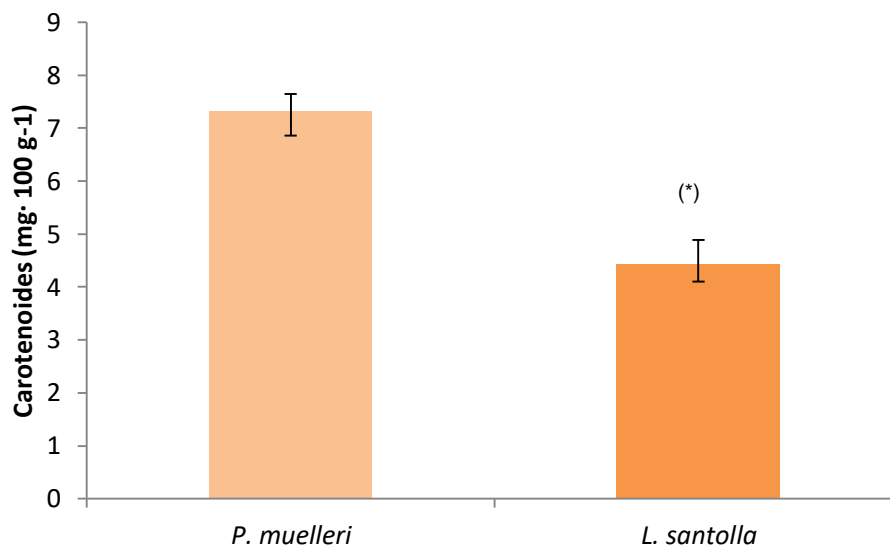


Figura 19. Contenido de carotenoides en cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

* Significativamente diferente respecto del rendimiento obtenido en *P. muelleri* T student ($p < 0,05$).

La Tabla 8 muestra las proporciones que representan cada lípido determinado, en el total de lípidos. En *P. muelleri* los distintos lípidos cuantificados representaron el 63% aproximadamente del contenido total de lípidos. Mientras que, en *L. santolla*, se identificó y cuantificó aproximadamente el 53% de los lípidos. La fracción más abundante fue en ambos casos los FA. La proporción de colesterol fue muy similar en ambas especies. Los carotenoides, fueron la fracción que representó el menor porcentaje, inferior al 1,0 % en ambas especies. En *L. santolla* este porcentaje de carotenoides triplicó al de *P. muelleri*.

Tabla 8. Caracterización de los lípidos totales de cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

	<i>P. muelleri</i>	<i>L. santolla</i>
	(%)	(%)
Lípidos totales	4,0 ± 1,9	0,5 ± 0,2
Lípidos no identificados	37,25 ± 28,59	46,00 ± 18,89
FA	54,13 ± 26,81	41,86 ± 18,09
Colesterol	8,37 ± 5,03	10,10 ± 6,06
Carotenoides	0,28 ± 0,13	0,89 ± 0,36

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

%; porcentaje relativo respecto del total de lípidos.

3.1.5. Disponibilidad de biomasa

Las Tablas 9 y 10 presentan los resultados de la estimación del volumen de descartes anual que surgen del procesamiento de *P. muelleri* y *L. santolla* en la región patagónica para el periodo comprendido entre los años 2008 al 2018. Los volúmenes de captura son muy diferentes entre las especies, siendo la captura de *P. muelleri* entre 17 a 165 veces superior al total de la captura de *L. santolla*. Como se observa las capturas de *P. muelleri* se encuentran en aumento sostenido en los últimos 10 años. Por otro lado, los volúmenes de captura de *L. santolla* presentaron altibajos (años 2014, 2016 y 2017), y no superaron los volúmenes de *P. muelleri* en el periodo analizado. Es importante, remarcar también, la contribución de los puertos de la región patagónica en las capturas de estas especies. Para *P. muelleri* los puertos patagónicos capturaron aproximadamente 84%, de la captura nacional. Mientras que, para *L. santolla*, en la región se capturó alrededor del 97% del total.

Así como difieren los volúmenes de captura entre estas especies, también difieren los volúmenes de descartes. En la tabla 9 se muestran los descartes de cáscaras que se producen del procesamiento de *P. muelleri* tanto a nivel nacional, como en la Patagonia, se observándose que la mayor parte se produce en esta región.

Tabla 9. Disponibilidad de cáscara de *P. muelleri*, a partir de datos de captura anual nacional y regional.

Año	Total De captura (t)	Captura Fresqueros (t)	Procesado para colas peladas (t)	Cáscaras generadas país fresqueros (t)	Estimación captura en Patagonia (t)	Captura Fresqueros en Patagonia (t)	Procesado para colas en Patagonia (t)	Cáscaras generadas (t)
2008	47406	5943	1189	476	45790	5737	1147	459
2009	53693	6267	1253	501	51732	6039	1208	483
2010	72938	19149	3829	1532	69037	18125	3625	1450
2011	82921	23114	4622	1849	80869	22542	4508	1803
2012	79926	16357	3271	1308	73874	15119	3024	1209
2013	100670	28589	5717	2287	92778	26348	5270	2108
2014	127249	48914	9782	3913	116067	44616	8923	3569
2015	143127	53757	10751	4301	126616	47556	9511	3804
2016	172843	75060	15012	6005	140231	60898	12180	4872
2017	241513	131970	26394	10558	203269	111072	22214	8886
2018	253255	133478	26696	10678	213213	113003	22601	9040

Los resultados se expresan en toneladas, en base húmeda.

En la tabla 10 se observan las estimaciones de descartes realizadas para la centolla, en este caso fue necesario separar los descartes producidos por los distintos buques, dado que algunos de ellos comienzan el procesamiento a bordo, por lo que existe “perdida” de descartes.

Se observó que los descartes de centolla producidos por los buques costeros presentaron variaciones año a año. Si se considera que estos buques (a diferencia de los buques de altura) desembarcan el 100% de su captura podría estimarse que el procesamiento de *P. muelleri* en el año 2018, produjo un volumen de descartes cerca de 100 veces superior al que se produjo por el procesamiento de *L. santolla*. En las columnas siguientes se muestran los descartes producidos por los buques de altura, y la sumatoria de todos los descartes si los producidos a bordo desembarcaran. El volumen aumentaría pero de todas formas, los descartes de *P. muelleri* hubieran superado al menos 7 veces su cantidad. Se detalla en la tabla el volumen procesado y exportado que en el periodo analizado supero el 50% de la captura.

A partir de los resultados obtenidos de la determinación de carotenoides, FA, quitina, se puede estimar que para el año 2018 al desechar las cáscaras de *P. muelleri*, se desecharon 328 kg de carotenoides, 892 t de quitina y 97 t de FA. Mientras que a partir de cáscaras de *L. santolla* 2,3 kg de carotenoides, 9,7 t de quitina y 0,1 t de FA.

La riqueza en carotenoides y FA, y la gran disponibilidad de biomasa que se produce anualmente por el procesamiento de *P. muelleri*, permitieron seleccionar a los descartes del langostino como material de partida más adecuado para la obtención de extractos ricos en carotenoides, pensando en un posible uso industrial.

Tabla 10. Disponibilidad de cáscaras de *L. santolla*, a partir de datos de captura anual nacional y regional.

Año	Captura	Captura Cos+ F+ Cen	Captura en Patagonia	Exportación	Descarte de Cos (t)	Descarte buque de altura	Cáscaras generadas (Total, t)
2008	769	712	739	461	67	218	285
2009	325	282	313	289	27	102	129
2010	734	721	699	388	8	285	293
2011	3112	2875	3108	1878	60	1138	1198
2012	4522	4341	4501	2452	47	1727	1774
2013	4077	3968	3984	2204	139	1467	1606
2014	3448	3439	3219	2529	106	1270	1376
2015	4133	4134	3902	2196	1	1653	1654
2016	2521	2521	2521	1899	18	991	1009
2017	2281	2281	1899	1328	46	867	913
2018	2336	2336	1702	1355	110	825	935

Cos: Costeros, F: Fresqueros, Cen: Centolleros.

Los resultados se expresan en toneladas, en base húmeda.

3.2. Caracterización del extracto rico en carotenoides a partir de descartes de *P. muelleri*

El extracto de *P. muelleri* es un producto natural, y como tal el contenido en componentes de interés para la nutrición de salmónidos puede presentar variaciones ligadas a efectos externos tales como alimentación, temperatura del agua y ciclo de vida del langostino, entre otros. Es por ello que un aspecto relevante para estos estudios es evaluar las variaciones en contenido de carotenoides y ácidos grasos en diferentes períodos de captura.

El lavado y pelado industrial de *P. muelleri* genera distintos tipos de descartes húmedos de acuerdo al producto que se esté preparando. Los descartes no sólo consisten en cáscaras de cola, sino que algunos poseen partes blandas del cefalopereion. Por ello también es importante determinar el contenido en carotenoides en los diferentes tipos de descartes (cáscaras y residuo completo), como también determinar el perfil cromatográfico de los carotenoides que conforman el extracto. Asimismo, es importante evaluar el tratamiento previo de los descartes en el laboratorio hasta el momento de su utilización para obtener el mejor rendimiento posible en los componentes de interés.

3.2.1. Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura

La Tabla 11 presenta la variación mensual del contenido de carotenoides en los dos tipos de descartes de *P. muelleri* (cáscaras y residuo completo). El rendimiento en carotenoides fue variable en los distintos meses analizados, presentándose diferencias significativas, en los dos tipos de descartes estudiados. Los meses de abril, junio y julio registraron una mayor concentración de carotenoides en las cáscaras. Sin embargo llegando a la primavera y avanzado el verano (en los meses de noviembre, diciembre y febrero), el contenido fue superior en el residuo completo.

Tabla 11. Variación mensual de carotenoides en cáscaras y residuos completos de *P. muelleri*.

Mes	Cáscara	Residuos completos
Mar-16	10,66 ± 4,50 ^{ay}	1,94 ± 0,63 ^{rz}
Abr-16	26,50 ± 7,72 ^{bcy}	13,97 ± 2,09 ^{ry}
May-16	9,60 ± 3,79 ^{ay}	N.A.
Jun-16	3,80 ± 0,49 ^{by}	2,07 ± 0,73 ^{ry}
Jul-16	21,56 ± 2,76 ^{bdy}	N.A.
Ago-16	4,33 ± 0,20 ^{ay}	N.A.
Sep-16	12,15 ± 3,12 ^{ady}	13,62 ± 2,44 ^{ry}
Oct-16	7,72 ± 1,77 ^{ay}	N.A.
Nov-16	10,84 ± 0,51 ^{ady}	15,17 ± 1,83 ^{rz}
Dic-16	9,76 ± 2,50 ^{ay}	10,09 ± 1,10 ^{ry}
Ene-17	18,87 ± 4,67 ^{acdy}	N.A.
Feb-17	10,37 ± 1,93 ^{ay}	15,88 ± 3,33 ^{ry}
Jun-17	23,17 ± 2,17 ^{bdy}	18,81 ± 3,80 ^{ry}
Sep-17	5,25 ± 3,90 ^{ay}	3,90 ± 0,31 ^{ry}
Promedio mensual	13,3 ± 13,9^y	10,6 ± 6,5^y

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3), mg·100g⁻¹ en base húmeda.

N.A. = no analizado.

Letras distintas a lo largo de las columnas (a, b, c, d- cáscaras- y r, s- residuo completo-) y a lo largo de las filas (y, z) indican diferencias significativas, P < 0,05, ANOVA, seguido de prueba a *posteriori* Test de Tukey.

Se observó que en la mayoría de las oportunidades en las que se realizó la determinación de carotenoides en ambos descartes, las cáscaras presentaron un mayor rendimiento. Sin embargo, la mediana de la concentración de carotenoides en el residuo completo es ligeramente superior 13,62 mg·100g⁻¹ que en cáscaras es 10,52 mg 100g⁻¹. Se determinó también que no existen diferencias significativas en el rendimiento promedio obtenido, entre cáscaras y residuo completo.

Tanto el rendimiento de extracto como el porcentaje de carotenoides contenido en él presentaron variaciones significativas entre ambos tipos descartes y en las diferentes épocas de captura. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12, los valores máximos se colorearon con verde y los

mínimos con celeste. Los rendimientos máximos en extracto como así también el porcentaje de carotenoides en los mismos, se presentaron en meses distintos. Sin embargo el porcentaje mínimo de carotenoides en extracto coincidió en ambos descartes, el mes de junio de 2016. El porcentaje de carotenoides en el extracto fue, en todos los casos mayor en el extracto de cáscaras que en el de residuo completo, con excepción del mes de febrero. Si bien el promedio mensual de los carotenoides en ambos extractos es diferente, sus medianas no presentan una amplia diferencia (0,18 y 0,14 % de carotenoides para cáscaras y residuos respectivamente). A pesar de que el máximo porcentaje de carotenoides alcanzado en extracto de cáscaras es dos veces superior al máximo obtenido en extractos de residuos completos, sus promedios no presentan diferencias significativas.

Tabla 12. Variación en el rendimiento de extracto y porcentaje de carotenoides en extracto de cáscara y residuos completos de *P. muelleri*.

Mes	Cáscara		Residuos completos	
	% Extracto	% Carotenoides	% Extracto	% Carotenoides
Mar- 16	2,65 ± 0,31 ^{ay}	0,41 ± 0,06 ^{dgr}	5,96 ± 1,98 ^{az}	0,04 ± 0,02 ^r
Abr- 16	3,54 ± 0,42 ^{ady}	0,76 ± 0,28 ^{fr}	5,83 ± 0,32 ^{az}	0,24 ± 0,04 ^{js}
May- 16	3,08 ± 0,12 ^{ad}	0,31 ± 0,11 ^{dge}	N.A.	N.A.
Jun- 16	8,06 ± 1,28 ^{cdy}	0,05 ± 0,01 ^{er}	13,99 ± 2,80 ^{bdz}	0,01 ± 0,00 ^{js}
Jul- 16	3,93 ± 0,21 ^{ad}	0,22 ± 0,02 ^{dg}	N.A.	N.A.
Ago- 16	4,52 ± 0,20 ^{ad}	0,10 ± 0,01 ^e	N.A.	N.A.
Sep- 16	9,17 ± 4,48 ^{bcy}	0,14 ± 0,03 ^{dr}	11,77 ± 3,34 ^{adz}	0,12 ± 0,02 ^{jr}
Oct- 16	6,35 ± 1,52 ^{ac}	0,14 ± 0,03 ^d	N.A.	N.A.
Nov- 16	8,82 ± 0,67 ^{bcy}	0,18 ± 0,05 ^{dr}	11,04 ± 2,14 ^{adz}	0,14 ± 0,01 ^{jr}
Dic- 16	12,41 ± 2,52 ^{bcy}	0,08 ± 0,03 ^{er}	25,43 ± 1,45 ^{cz}	0,04 ± 0,01 ^{jr}
Ene- 17	6,42 ± 1,14 ^{ac}	0,30 ± 0,10 ^{dg}	N.A.	N.A.
Feb- 17	12,87 ± 2,81 ^{bcy}	0,08 ± 0,01 ^{er}	14,77 ± 5,33 ^{bdz}	0,10 ± 0,01 ^{js}
Jun- 17	3,75 ± 0,07 ^{acy}	0,49 ± 0,11 ^{gr}	7,29 ± 1,54 ^{ady}	0,33 ± 0,06 ^{js}

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

Las diferencias significativas se indican con las letras: **a,b,c, d,e,f,g, j**, a lo largo de una columna para los distintos meses. Con las letras: **y,z** y **r,s**, a lo largo de una fila para % extracto y % carotenoides, respectivamente, P < 0,05, ANOVA, seguido de prueba a *posteriori* Test de Tukey.

El residuo completo presentó mayor rendimiento en extracto que las cáscaras en todas las épocas de captura. En promedio el rendimiento de extracto obtenido a partir de residuo completo es aproximadamente el doble

que, el obtenido de cáscaras (12,0 y 5,9% respectivamente), siendo estas diferencias significativas.

Los residuos completos representan un gran porcentaje del peso del animal. Teniendo en cuenta los volúmenes de captura de *P. muelleri* mencionados en el capítulo anterior se estima que en el año 2018, se podrían haber obtenido 15820 t. A partir de los promedios obtenidos de cada tipo de descartes de *P. muelleri* se estima que deshecharon 1,6 toneladas de carotenoides a partir de residuos completos o 1,2 toneladas a partir de las cáscaras.

3.2.2. Variación del contenido en FA en distintas épocas de captura

La variación del porcentaje relativo y del contenido en FA en diferentes épocas de captura para ambos tipos de descarte se presenta en las Tablas 13 y 15. Los PUFA fueron los FA más abundantes en todas las épocas analizadas, se observaron diferencias significativas tanto en PUFA como en MUFA

Los componentes mayoritarios se colorearon en verde en las Tablas 13 y 15. Los FA que se presentaron en mayor proporción fueron los mismos en todos los meses analizados, con la excepción del mes de septiembre en que el C16:1 superó en proporción al C18:1n9.

Tabla 13. Perfil de FA identificados en residuo completo de *P. muelleri*.

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
	% Rel.	% Rel.	% Rel.	% Rel.	% Rel.
SFA					
C14:0	3,23 ± 0,11	5,13 ± 1,35	2,82 ± 0,28	3,82 ± 0,75	2,17 ± 0,14
C15:0	1,30 ± 0,06	0,77 ± 0,14	11,14 ± 0,16	1,33 ± 0,42	0,96 ± 0,19
C16:0	19,81 ± 3,14	23,01 ± 2,53	14,63 ± 3,58	23,45 ± 5,08	17,52 ± 1,16
C17:0	1,63 ± 0,21	1,06 ± 0,13	3,04 ± 0,49	1,02 ± 0,27	0,86 ± 0,27
C18:0	5,62 ± 0,20	2,96 ± 0,08	3,79 ± 0,04	3,72 ± 0,85	3,61 ± 0,06
ΣSFA	31,58 ± 3,15 ^a	32,94 ± 2,96 ^a	35,43 ± 3,63 ^a	33,35 ± 5,23 ^a	25,12 ± 1,22 ^a
MUFA					
C16:1	6,30 ± 0,66	10,67 ± 0,04	4,35 ± 0,58	9,11 ± 2,04	12,05 ± 1,80
C18:1n9	15,56 ± 1,61	18,18 ± 2,41	11,60 ± 1,99	19,09 ± 4,88	6,77 ± 2,96
C24:1n9	2,67 ± 0,97	N.D.	3,20 ± 0,91	N.D.	0,78 ± 0,18
ΣMUFA	25,53 ± 1,99 ^a	28,85 ± 2,41 ^b	19,14 ± 2,26 ^c	28,20 ± 5,29 ^d	19,60 ± 3,47 ^c
PUFA					
C18:2c	1,56 ± 0,12	1,14 ± 0,68	2,10 ± 0,32	2,20 ± 0,53	1,36 ± 0,19
C18:3n3	0,77 ± 0,15	0,98 ± 0,13	0,69 ± 0,17	1,95 ± 0,45	N.D.
C20:2n6	N.D.	1,38 ± 0,16	1,88 ± 0,28	0,64 ± 0,10	1,65 ± 0,22
C20:3n3	4,66 ± 0,61	4,74 ± 0,63	7,91 ± 1,42	2,58 ± 0,65	N.D.
C20:3n6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6,84 ± 0,12
C20:5n3	14,87 ± 1,93	12,62 ± 1,59	15,24 ± 2,46	13,97 ± 3,63	20,59 ± 0,26
C22:6n3	22,04 ± 2,16	17,36 ± 2,68	17,61 ± 2,05	17,10 ± 5,41	25,47 ± 0,64
ΣPUFA	43,89 ± 2,97 ^{abc}	38,21 ± 3,26 ^a	45,43 ± 3,53 ^b	38,45 ± 6,59 ^{ab}	55,90 ± 0,76 ^c

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; res= residuo; cásc= cáscara. N.D.: no detectado

%; porcentaje relativo de todos los FA identificado. TFA: mg· 100g⁻¹

Las diferentes letras (a,b,c) dentro de una misma fila indican diferencias significativas, test de Tukey <0,05.

La tabla 14 presenta los resultados obtenidos de la cuantificación de FA totales, de EPA y DHA de importancia nutricional como así también la proporción de FA n3 y n6 y sus índices. En todas las determinaciones se observaron variaciones durante el año. En el mes de septiembre se obtuvieron valores superiores para todas las cuantificaciones realizadas. La cuantificación de FA máxima fue los meses de febrero y septiembre, siendo la de este último significativamente mayor al resto de las determinaciones. El cociente n6/n3 presentó ligeras variaciones alcanzando su valor máximo en septiembre. El bajo cociente reflejó el gran contenido en FA n3 que exceptuando el mes de septiembre en todos los casos fue al menos diez veces superior al obtenido en n6. El contenido de EPA y DHA obtenido en las diferentes épocas de captura

también fue variable. El valor máximo y significativamente diferente se cuantificó en septiembre, en donde registró concentración 8 veces superior a la mínima registrada en noviembre.

Tabla 14. Total de FA e indicadores de calidad de ácidos grasos en residuo completo de *P. muelleri*

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
TFA	971,56 ± 46,29 ^a	2354,39 ± 68,75 ^a	850,53 ± 48,24 ^a	2741,87 ± 654,45 ^{ab}	4703,85 ± 791,86 ^b
Σn3	411,27 ± 28,79	645,25 ± 57,47	360,87 ± 30,48	947,64 ± 174,76	2103,94 ± 801,11
Σn6	15,18 ± 1,20	45,42 ± 12,64	34,65 ± 3,66	75,81 ± 14,26	434,18 ± 134,40
n6/n3	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,21 ± 0,10
PUFA/SFA	1,49 ± 0,23	0,76 ± 0,46	1,37 ± 0,28	1,14 ± 0,26	2,13 ± 0,74
EPA+DHA	341,55 ± 28,14 ^a	541,92 ± 56,29 ^a	285,99 ± 27,83 ^a	827,03 ± 173,48 ^a	2273,94 ± 879,83 ^b

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3). TFA: mg· 100g⁻¹
 SFA: ácidos grasos saturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; Σn3: sumatoria de ácidos grasos n-3; Σn6: sumatoria de ácidos grasos n-6; EPA+ DHA: sumatoria ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico.
 Las diferentes letras (a,b,c) dentro de una misma fila indican diferencias significativas, test de Tukey <0,05.

El porcentaje relativo de FA obtenido de las cáscaras de *P. muelleri* fue variable, el mismo se muestra en la Tabla 15. Todos los FA presentan ligeras variaciones en el porcentaje en las distintas épocas de captura. Los componentes principales (coloreados en verde) fueron los mismos en todos los meses. Los PUFA fueron los más abundantes excepto en septiembre donde su concentración fue la menor.

Los componentes mayoritarios fueron los mismos para los dos tipos de descartes: EPA (C20:5n3), DHA (22:6n3), ácido oleico (C18:1n9) y ácido palmítico (C16:0). El contenido en C20:5n3 y C22:6n3 fue superior en cáscaras con excepción del mes de septiembre.

Tabla 15. Perfil de FA identificados en cáscaras de *P. muelleri*

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
	% Rel.	% Rel.	% Rel.	% Rel.	% Rel.
SFA					
C14:0	2,46 ± 0,37	1,30 ± 0,09	2,63 ± 0,29	5,32 ± 1,89	1,84 ± 0,26
C15:0	N.D.	3,32 ± 1,47	14,43 ± 2,04	1,36 ± 0,27	N.D.
C16:0	15,21 ± 0,90	19,33 ± 3,99	13,53 ± 1,86	23,63 ± 3,48	28,76 ± 1,74
C17:0	1,69 ± 0,20	1,76 ± 0,47	4,93 ± 1,52	1,62 ± 0,43	3,76 ± 0,23
C18:0	5,28 ± 0,36	6,31 ± 3,28	1,44 ± 1,36	3,22 ± 0,05	9,29 ± 4,13
C22:0					2,55 ± 0,11
ΣSFA	24,64 ± 1,05 ^a	32,02 ± 5,42 ^a	36,89 ± 3,48 ^a	35,15 ± 3,99 ^a	46,19 ± 4,96 ^b
MUFA					
C16:1	5,02 ± 1,16	3,73 ± 0,81	2,93 ± 0,61	10,28 ± 2,50	7,74 ± 0,63
C18:1n9	15,77 ± 3,41	12,75 ± 2,93	8,24 ± 1,59	17,44 ± 2,30	16,69 ± 0,12
C24:1n9	2,57 ± 0,96	1,31 ± 0,26	0,37 ± 0,19	1,13 ± 0,10	3,32 ± 0,07
ΣMUFA	23,36 ± 3,73 ^{abc}	17,79 ± 3,05 ^{ac}	11,54 ± 1,72 ^c	28,85 ± 3,40 ^b	27,75 ± 0,74 ^{ab}
PUFA					
C18:2n6	1,71 ± 0,58	1,07 ± 0,17	1,66 ± 0,11	2,51 ± 0,44	N.D.
C18:3n3	0,88 ± 0,27	0,46 ± 0,22	0,50 ± 0,19	2,16 ± 0,51	N.D.
C20:2	N.D.	1,32 ± 0,22	2,35 ± 0,63	N.D.	1,12 ± 0,31
C20:3n3	5,68 ± 0,29	6,23 ± 1,37	8,75 ± 1,95	2,64 ± 0,65	N.D.
C20:5n3	21,47 ± 2,56	18,42 ± 4,93	18,44 ± 5,69	14,06 ± 3,71	11,08 ± 0,08
C22:6n3	22,26 ± 2,43	22,69 ± 4,30	19,87 ± 7,11	14,63 ± 2,92	13,87 ± 0,23
ΣPUFA	52,00 ± 3,60 ^{ab}	50,19 ± 6,69 ^a	51,57 ± 9,33 ^a	36,00 ± 4,82 ^b	26,06 ± 0,40 ^c

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; N.D.: no detectado

% rel: porcentaje relativo de todos los FA identificados.

Las diferentes letras (a,b,c) dentro de una misma fila indican diferencias significativas, P < 0,05, ANOVA, seguido de prueba a *posteriori* Test de Tukey. .

El contenido de FA fue variable, aunque dentro de un rango menor al que se presentó en residuos (Tabla 16). Febrero fue el mes en el que el contenido de FA fue significativamente diferente al resto. El contenido en n3 fue variable siendo el máximo el alcanzado en septiembre, cuya concentración fue 20 veces superior al mínimo. El cociente n6/n3 presentó valores menores a 0,1 en todos los meses. En cuanto a la cantidad de EPA + DHA, la misma no presentó variaciones significativas.

Tabla 16. Total de FA e indicadores de calidad de FA en cáscaras de *P. muelleri*

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
TFA	695,78 ± 36,81 ^a	879,90 ± 80,40 ^a	748,69 ± 75,66 ^a	1867,44 ± 132,94 ^b	1629,03 ± 410,26 ^{ab}
Σn3	349,90 ± 24,71	420,62 ± 58,82	356,08 ± 69,71	625,37 ± 89,62	404,89 ± 184,4
Σn6	11,90 ± 4,04	20,98 ± 2,48	30,01 ± 4,79	46,83 ± 8,26	19,66 ± 16,50
n6/n3	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,05
PUFA/SFA	2,11 ± 0,167	1,57 ± 0,34	1,40 ± 0,28	1,02 ± 0,18	0,57 ± 0,34
EPA+DHA	304,27 ± 24,55 ^a	361,72 ± 57,54 ^a	286,83 ± 68,15 ^a	535,72 ± 88,28 ^a	404,89 ± 184,4 ^a

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

SFA: ácidos grasos saturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

TFA: mg· 100g⁻¹

Letras distintas a lo largo de una fila indica resultados significativamente diferentes. P < 0,05, ANOVA, seguido de prueba a *posteriori* Test de Tukey

A diferencia de lo observado en carotenoides, el contenido de FA es significativamente superior en los residuos completos.

El porcentaje de FA en los extractos de ambos descartes fue variable, aunque en residuos esta variación fue mayor (Figura 20). En el extracto obtenido de cáscara los FA, representan entre un 8,5% a un 26%. En el extracto de residuo este porcentaje tomó valores desde 7,5-39%. En cuanto al porcentaje que representan EPA y DHA, los extractos obtenidos de cáscara presentaron menor variación y en general fueron más ricos que los extractos de residuo completo.

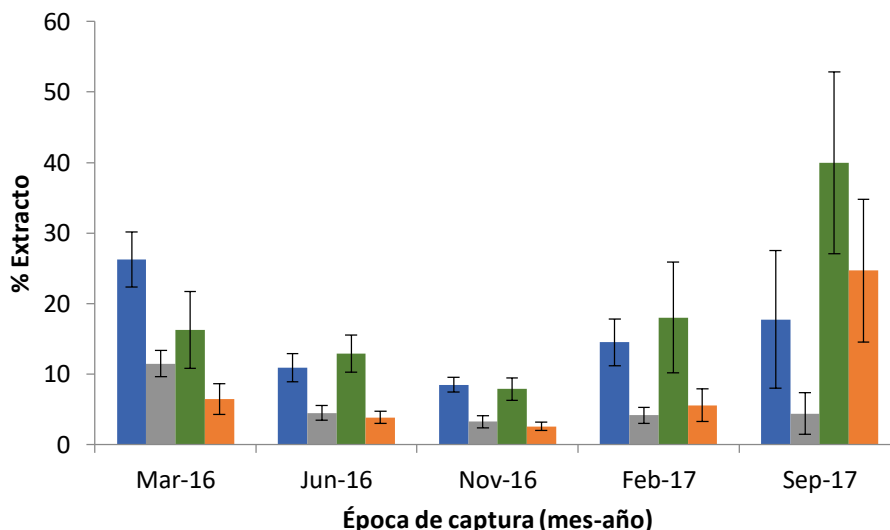


Figura 20. Proporción de FA y EPA+ DHA en extractos.

(■) %FA en extracto de cáscara, (■) %EPA + DHA en extracto de cáscara, (■) % FA en extracto de residuo, (■) %EPA + DHA en extracto de residuo.

Dado que no existen diferencias significativas entre cáscaras y residuo completo de langostino en lo que respecta a la riqueza de carotenoides y FA, se decidió continuar los restantes experimentos con cáscaras debido a la mayor y continua disponibilidad por parte de la planta procesadora.

3.2.3. Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad

El rendimiento en carotenoides varía significativamente según se realice la extracción con muestra seca o húmeda. Se obtuvo un mayor rendimiento cuando se trabajó con cáscaras húmedas. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Rendimiento de carotenoides en cáscaras de *P. muelleri* con diferente contenido de humedad.

	Humedad	Carotenoides totales	Carotenoides totales BS
CH	57,2 ± 1,4	10,7 ± 0,4	22,3 ± 0,8
CS	7,2 ± 0,1	8,1 ± 1,3 *	8,8 ± 1,4 *

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

Humedad expresada como $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ de biomasa; carotenoides totales $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de biomasa.

CH: cáscara húmeda; CS: Cáscara seca; BS: base seca

* Significativamente diferente respecto del rendimiento obtenido a partir de cáscaras húmedas
T student ($p < 0,05$)

3.2.4. Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento de cáscaras

Con el fin de determinar el correcto almacenamiento de la muestra hasta el momento de procesado, se determinó el rendimiento en el contenido de carotenoides en muestras que recibieron distintos tratamientos (oreados y húmedos). Estas muestras se conservaron durante un período de tiempo de 80 días a diferentes temperaturas. Para evaluar su rendimiento se compararon los resultados de contenido de carotenoides con el que presentó un extracto obtenido a partir del material fresco. Este extracto recibió el mismo tratamiento de temperatura y tiempo que las cáscaras. La Tabla 18 presenta los resultados del ensayo.

Tabla 18. Acondicionamiento de muestra: concentración y porcentaje de conservación de carotenoides

	Día 0	Día 40	Día 80
CH 15	10,66 ± 0,36(100)	1,78 ± 0,05(17)	1,54 ± 0,21 (14)
CH 5		2,95 ± 0,23 (28)	4,17 ± 0,28 (39)
CH -20		5,52 ± 0,21 (52)	4,83 ± 0,16(45)
CS 15	8,15 ± 1,28(100)	2,74 ± 0,15 (34)	3,08 ± 0,14 (38)
CS 5		3,94 ± 0,30 (48)	3,52 ± 0,15 (43)
CS -20		6,14 ± 0,45 (75)	7,78 ± 0,66 (96)
E 15	10,66 ± 0,36 (100)	6,82 ± 0,56 (64)	8,20 ± 1,07 (77)
E 5		7,25 ± 0,91 (68)	7,04 ± 1,86 (66)
E -20		8,20 ± 0,61 (77)	9,49 ± 0,28 (89)

Los resultados expresados son promedios de mg· 100 g de cáscara⁻¹ (%porcentaje de conservación). CH 15: cáscara húmeda 15°C; CH 5: Cáscara húmeda 5°C; CH -20: Cáscara húmeda -20°C; CS 15: Cáscara seca 15°C; CS 5: Cáscara seca 5°C CS -20: Cáscara seca -20°C; E 15: Extracto 15°C; E 5: Extracto 5°C; E -20: Extracto -20°C.

El contenido de carotenoides disminuyó en todas las muestras analizadas. Se observó que se conservó un mayor porcentaje cuando se almacenó en forma de extracto (>60%, día 80). La preservación de alrededor de 90% se alcanza cuando el extracto se conserva en freezer a -20°C. Sin embargo, se obtuvieron mejores rendimientos cuando se almacenaron las cáscaras secas a -20°C, dado que se conservó el 96% del contenido en carotenoides en el día 80.

El análisis multifactorial ANOVA, indicó que existe interacción entre la temperatura, el periodo de tiempo almacenado y el tratamiento que recibió la muestra previo a su extracción ($p < 0,05$). Estos resultados indicaron que la preservación de carotenoides no sólo se vio afectada por efectos de la temperatura, sino que también fue afectada por el tratamiento de muestra y tiempo de almacenamiento.

3.2.5. Comportamiento cromatográfico del extracto

Los resultados de la cromatografía en placa se muestran en la Figura 21. Los extractos de cáscaras y de residuo completo, fueron separados en sus distintos componentes. En ambos extractos se observa la separación de 3 bandas coloreadas (naranja-rojo). La primera de estas bandas con Rf 0,13,

coincide con el Rf de la astaxantina patrón, mientras que las otras dos bandas presentan el comportamiento cromatográfico compatible con astaxantina monoesterificada (Rf 0,3) y diesterificada (Rf 0,61) (Sánchez- Camargo y col. 2011). Además el revelado con vainillina, mostró una banda de Rf 0,38 coincidente con el patrón de colesterol.

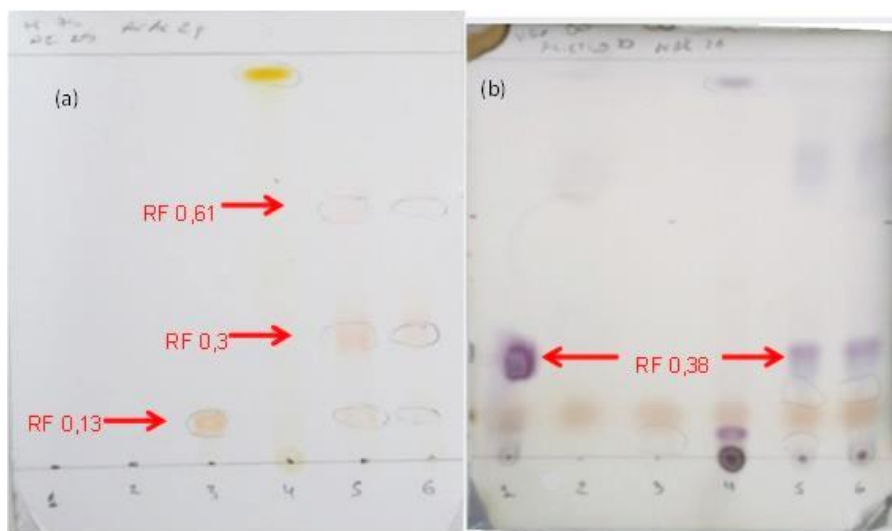


Figura 21. Cromatografía en placa del extracto obtenido de residuos completos y cáscaras de *P. muelleri*. (a) sin revelar; (b) posterior al revelado con vainillina.

1: colesterol; 2: C17:0; 3: astaxantina; 4: β -caroteno; 5: extracto de residuo completo; 6: extracto de cáscara de langostino.

La cromatografía en placa delgada no mostró, presencia de β - caroteno u otro carotenoide. A partir de la evidencia de las 3 bandas coloreadas se realizó la cromatografía en placa preparativa, donde se separó cada banda y se la eluyó para su inyección por HPLC. Además, considerando las referencias que indican que las bandas 2 y 3 podrían corresponder a las astaxantina mono y diesterificadas, se analizó la presencia de FA en las mismas.

La Figura 22 presenta los cromatogramas de las bandas obtenidas de la cromatografía en placa delgada. La banda 1 (Rf 0,13) presentó un tiempo de retención de 2,05 min, la banda 2 (Rf 0,3) de 3,50 min y, la 3 (Rf 0,61) de 6,30 min. La separación cromatográfica del extracto obtenido de cáscaras (Figura 22 D) mostró la presencia de las 3 bandas, encontrándose en mayor proporción la correspondiente a la banda 2, la coincidente con astaxantina en su forma monoesterificada.

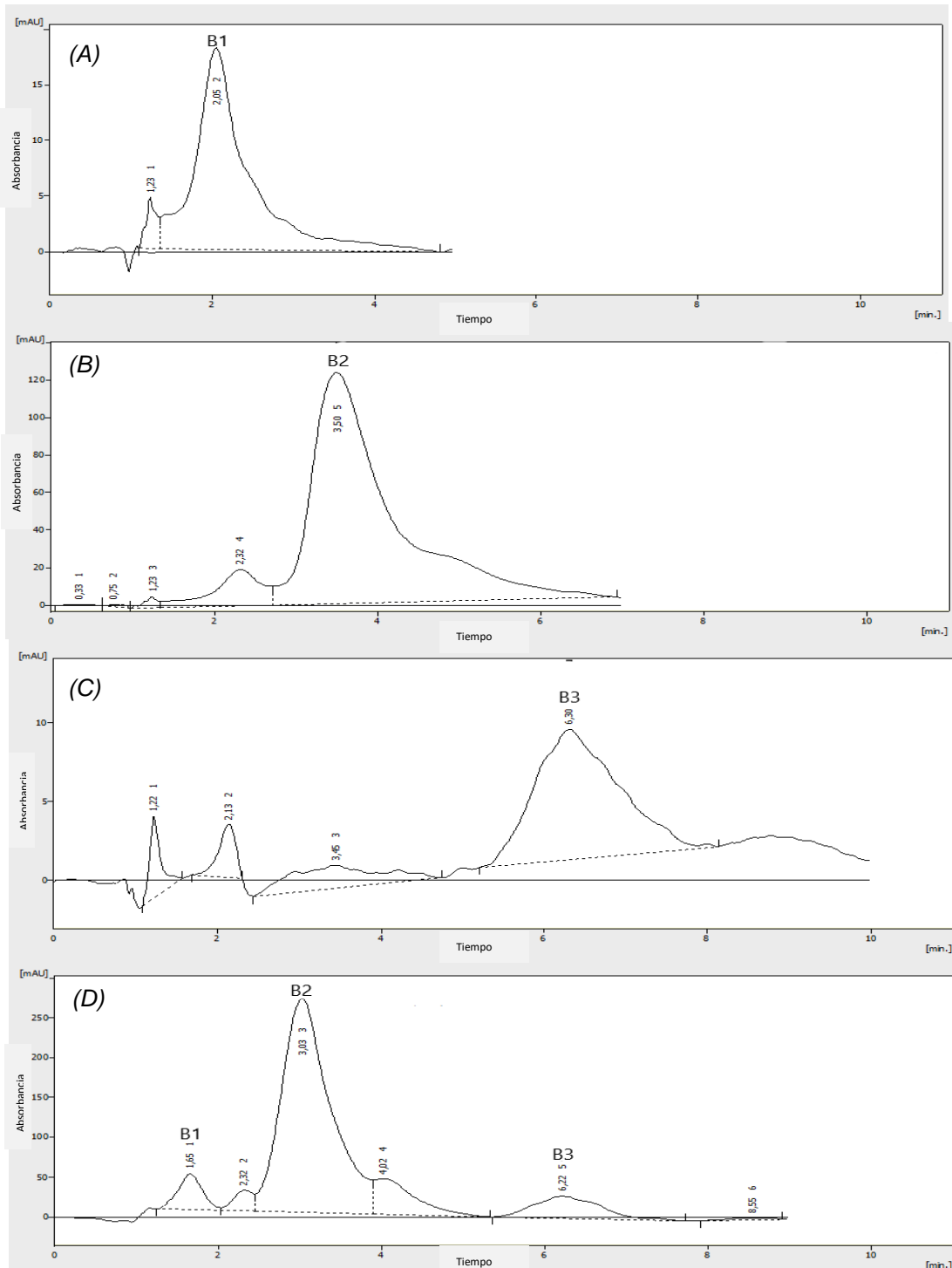


Figura 22. Perfil cromatográfico HPLC de las diferentes bandas identificadas por cromatografía en placa delgada. Banda 1 Rf 0,13 (A), banda 2 Rf 0,3 (B), banda 3 RF 0,61(C), perfil cromatográfico extracto de cáscaras de *P. muelleri*. (D). B1: Banda 1, B2: Banda 2, B3: Banda 3.

El análisis del contenido relativo de las distintas formas de astaxantina indicó que: la banda 2 se encontró en 80,76 %, mientras que la banda 3 en un

11,61 % y la forma libre, banda 1, en menor proporción 7,63 %. Estas proporciones se presentaron tanto en extracto de cáscaras como de residuo completo.

Los resultados del análisis de FA a las bandas se presentan en las Tablas 19 y 20. En la banda 2 los ácidos grasos más abundantes fueron los PUFA, el C22:6n3 en un 31%, el C20:5n3 en un 27% aproximadamente. El tercer lugar correspondió al 16:0 representando el 22% del total.

Tabla 19. Perfil de FA identificados, presentes en la banda 2 (Rf 0,3).

FA	% Rel.
SFA	
C14:0	1,05
C16:0	21,67
C17:0	0,84
C18:0	6,71
MUFA	
C16:1	1,14
C18:1n9t	0,26
C18:1n9c	2,95
C20:1n9	0,58
PUFA	
C18:2N6	0,31
C20:3n3/C20:2	6,67
C20:5n3	26,80
C22:6n3	31,04

% Rel= porcentaje relativo expresado en porcentaje del total de los FA identificados

En la banda 3 los FA que se encuentran en mayor proporción son los SFA. El FA mayoritario fue el 16:0 en un porcentaje de 41%, seguido por el 18:0 en 26%. El tercer lugar correspondió al MUFA 18:1n9 con un 16%.

Tabla 20. Perfil de FA identificados, presentes en la banda 3 (Rf 0,61)

FA	% Rel
SFA	
C14:0	1,87
C15:0	0,69
C16:0	41,47
C17:0	1,32
C18:0	26,06
C22:0	1,33
MUFA	
C14:1	1,97
C16:1	3,78
C17:1	0,57
C18:1n9c	15,89
C20:1n9	0,25
PUFA	
C18:2n6	1,48
C20:5n3	2,07
C22:6n3	1,25

% Rel= porcentaje relativo expresado en porcentaje del total de los FA identificados

3.2.6. Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol 96 %

Teniendo en cuenta la posibilidad de un futuro escalamiento del proceso se comparó el rendimiento de extracción de astaxantina en extracto de cáscaras de *P. muelleri* con acetona /metanol con el de un extracto obtenido con etanol 96%. El etanol es considerado un solvente verde y económico, aceptado para utilizar a gran escala (Quan y Turner 2009). La Tabla 21 muestra los resultados obtenidos en la extracción de carotenoides utilizando etanol como solvente frente a la extracción con los solventes recomendados por la literatura. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en el rendimiento en carotenoides ($p>0,05$), ni en las concentraciones de cada una de las bandas coloreadas ($p>0,05$) entre los extractos analizados.

Tabla 21. Rendimientos de carotenoides con diferentes solventes de extracción

	CT (mg· g ⁻¹)	B1 (µg· g ⁻¹)	B2 (µg· g ⁻¹)	B3 (µg· g ⁻¹)
Etanol	1,35 ± 0,19	405,88 ± 56,80	899,86 ± 31,73	49,18 ± 3,34
A -M	1,13 ± 0,01	316,60 ± 29,09	755,15 ± 16,40	54,76 ± 0,69

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3), los carotenoides en mg· g⁻¹ de extracto, y las bandas en µg· g⁻¹ de extracto.

CT: Carotenoides totales; B1: banda 1; B2: banda 2; B3: banda 3.

* Significativamente diferente T student (p<0,05).

3.2.7. Efectos de la temperatura y del tiempo en los carotenoides presentes en el extracto etanólico

Se analizó el efecto de la temperatura y del tiempo en el contenido de carotenoides totales y en las diferentes bandas pigmentadas que conforman el extracto etanólico de *P. muelleri*. Los resultados del análisis de carotenoides totales se presentan en la Figura 23. La concentración de carotenoides disminuye significativamente a lo largo del tiempo en todas las temperaturas analizadas. Existe una mayor preservación de los carotenoides cuando se conservan los extractos a -20°C, en donde al día 60 se preservó el 75%.

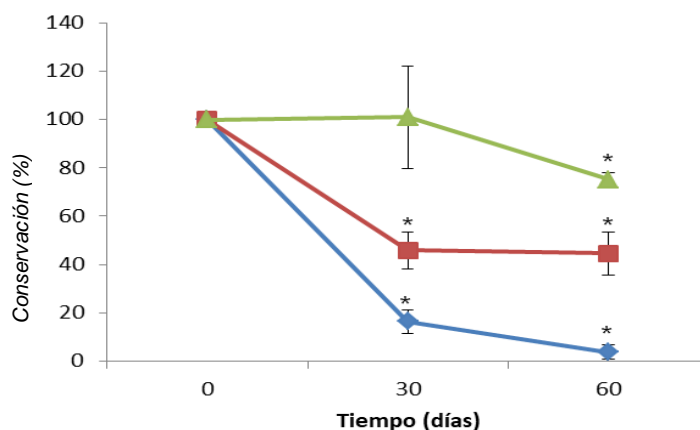


Figura 23. Estabilidad de extracto conservado a diferentes temperaturas durante 60 días.

(■): 15°C, (■): 5°C, (■): -20°C

* Significativamente diferente respecto del rendimiento obtenido el día 0. T Student (p<0,05).

Las separaciones cromatográficas que se presentan en la Figura 24, mostraron que en este extracto no se detectó la presencia de la banda 3. Se

observó que el área de las bandas coloreadas, disminuyen en el tiempo y en relación directa al aumento de temperatura. A las 3 temperaturas evaluadas, existe un mayor deterioro de la astaxantina libre. A los 15°C se pierde prácticamente la totalidad de las bandas coloreadas. En (A) el trazado azul muestra el cromatograma obtenido el día 0 al comienzo del experimento. El trazado verde en el cromatograma obtenido el día 30 y el magenta el obtenido el día 60 de extracto conservado a 15°C. Ambas bandas disminuyen su concentración drásticamente, alcanzando al día 60 con valores que son del 2% para la astaxantina y el 5% para la banda 2 respecto de la concentración inicial (Tabla 21). Por lo que podría decirse a que a temperatura ambiente las pérdidas son totales.

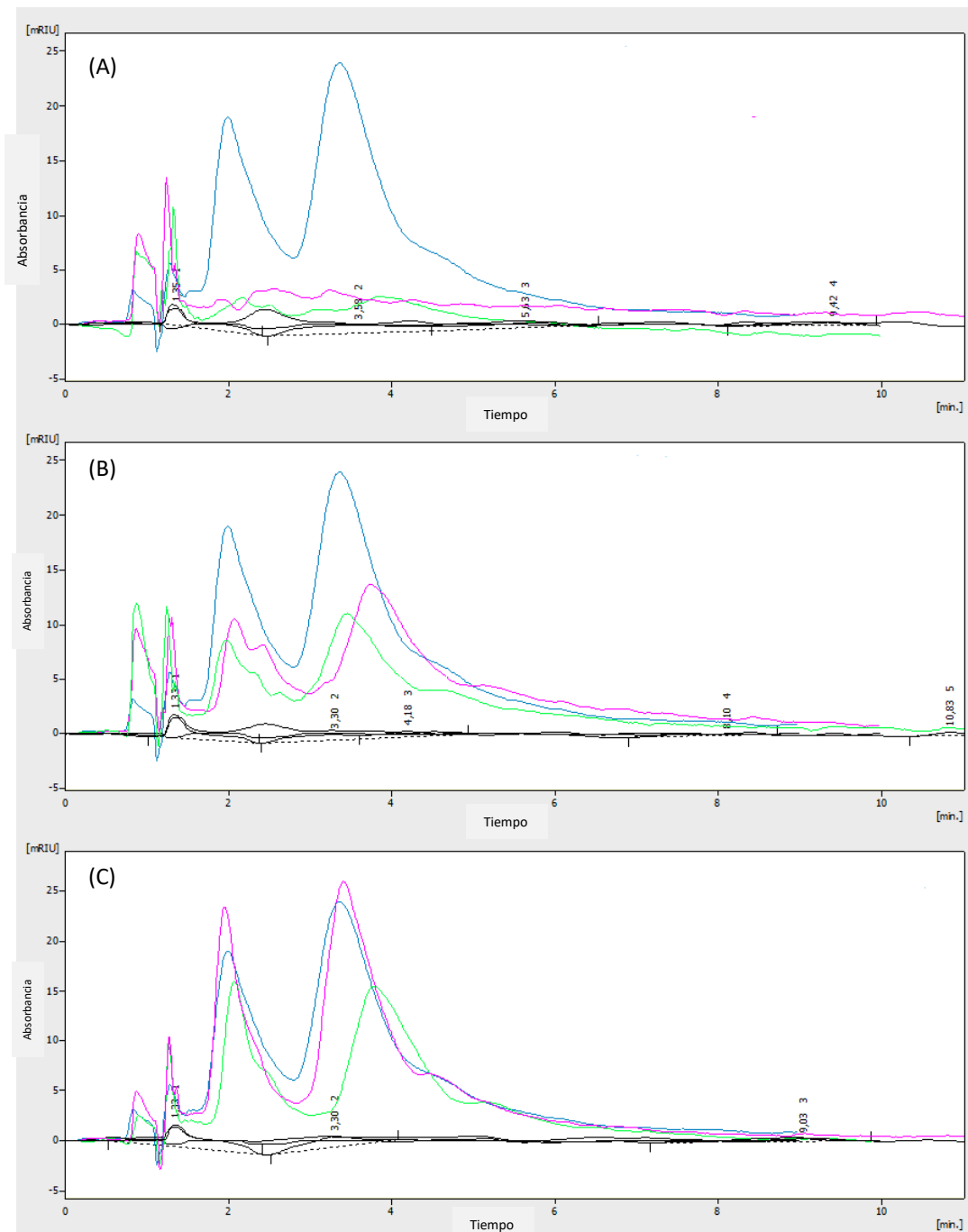


Figura 24. Perfil cromatográfico (HPLC) de extractos conservados a diferentes temperaturas. Efecto de la temperatura en la estabilidad del extracto. (A) Extracto conservado a temperatura a 15°C, (B) extracto conservado a 5°C, (C) extracto conservado a -20°C

(■): cromatograma día 0, (■): cromatograma día 30, (■): cromatograma día 60

En el extracto conservado a 5°C (B), se observó una disminución en la intensidad de la señal a los 30 días (señal verde) y a los 60 días (señal magenta). La disminución de la concentración de carotenoides en las bandas a

esta temperatura fue gradual. La concentración preservada al día 60 fue del 25 y 53 % de la concentración inicial para la astaxantina libre y la banda 2 respectivamente. La intensidad de las señales en (C), disminuyen en menor proporción que a 5°C y 15°C, es decir que existe una mayor conservación de los pigmentos en las distintas bandas, en el extracto a -20°C. El día 60 se conservó el 71 y 77% de astaxantina libre y de la banda 2 respectivamente (Tabla 22).

Tabla 22. Porcentaje de conservación de carotenoides presentes en las bandas pigmentadas, de un extracto de cáscaras de *P. muelleri* conservado a diferentes temperaturas.

	Día 0		Día 30		Día 60	
	Banda 1	Banda 2	Banda 1	Banda 2	Banda 1	Banda 2
15°C	100	100	11	19	2	5
5°C	100	100	34	51	25	53
-20°C	100	100	98	102	71	77

Los resultados se expresan en porcentaje (%) respecto a la concentración inicial.

3.2.8. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *P. muelleri*

Para determinar la capacidad antioxidante se realizaron diluciones del extracto según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 25 -27. En la Figura 25 (A) se observan los espectros obtenidos correspondientes a la inhibición de los radicales $\bullet\text{OH}$ y (B) presenta gráficamente el efecto inhibitorio del extracto en la producción de los radicales $\bullet\text{OH}$. Se observó que medida que aumenta la concentración del extracto se produce la disminución de la intensidad de los radicales.

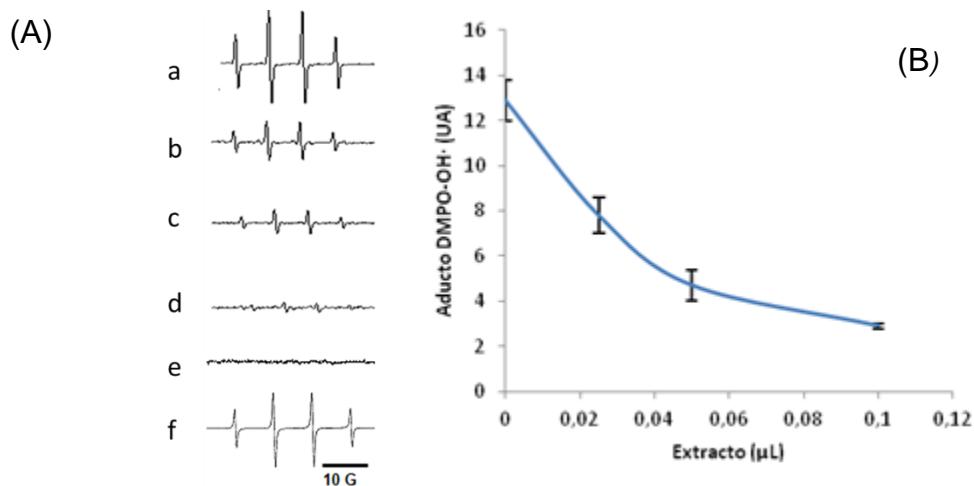


Figura 25. Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina contra radical $\cdot\text{OH}$. **A.** Espectro EPR del aducto DMPO-OH \cdot : (a) sistema basal (en ausencia de extracto), (b) espectro del aducto DMPO-OH \cdot generado en presencia de 0,025 ul de extracto, (c) espectro del aducto DMPO-OH \cdot generado en presencia de 0,050 ul de extracto, (d) espectro del aducto DMPO-OH \cdot generado en presencia de 0,1 ul de extracto, (e) espectro del POBN solo, (f) espectro simulado empleando los siguientes parámetros $a_N=15$ G y $a_H= 15$ G. **B.** Efecto de la adición de extracto sobre la generación de radical $\cdot\text{OH}$.

La Figura 26 (A) presenta los espectros obtenidos de la inhibición de la generación de los radicales LR \cdot , en los mismos se evidencia la disminución de la intensidad de la señal a medida que aumenta la concentración del extracto. La Figura 26 B muestra el efecto de la adición de extracto sobre la generación de los radicales LR \cdot .

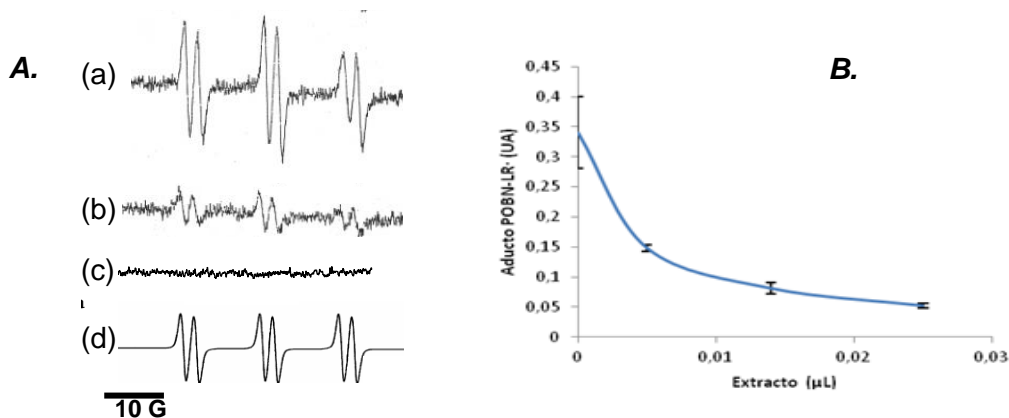


Figura 26. Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina contra RL^\bullet . **A.** Espectro EPR del aducto POBN- RL^\bullet : (a) sistema basal (en ausencia de extracto), (b) espectro del aducto POBN- RL^\bullet en presencia de 0,015 μ l de extracto, (c) espectro del POBN solo, (d) espectro simulado empleando los siguientes parámetros $a_N = 15,8$ G y $a_H = 2,6$ G y $g = 2,005$. **(B)** Efecto de la adición de extracto sobre la generación de RL^\bullet .

El efecto antioxidante del extracto sobre la generación de radicales A^\bullet se muestra en la Figura 27. En (A) se ve la disminución de la intensidad producida por los radicales a medida que aumenta la concentración del extracto. La Figura (B) muestra la representación gráfica de la disminución de la concentración de A^\bullet a medida que se aumentó la concentración del extracto.

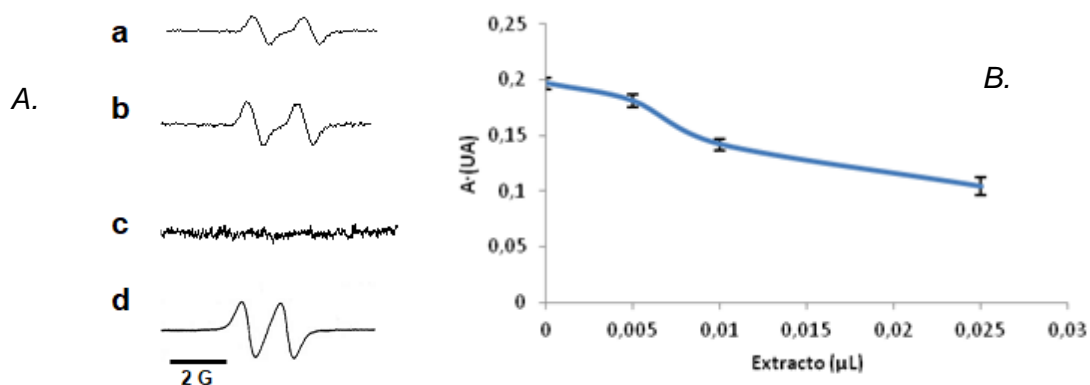


Figura 27. Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina. **A.** Espectro EPR de A^\bullet : (a) espectro de A^\bullet en presencia de 0,025 μL de extracto (b) espectro de A^\bullet en presencia de 0,010 μL de extracto, (c) espectro del DMSO solo y (d) espectro simulado empleando los siguientes parámetros $aN= 15,8 \text{ G}$ y $g=2,005$. **B.** Efecto de la adición de extracto sobre el contenido de A^\bullet .

De la misma manera en que se determinó el efecto de la temperatura y tiempo en la concentración de carotenoides, se determinó el efecto sobre la capacidad antioxidante. La Tabla 23 presenta los porcentajes de inhibición de generación de radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{LR}\cdot$ y A^\bullet , obtenidos a partir del agregado del extracto de *P. muelleri* conservado a diferentes temperaturas durante 60 días. Se observó que, existe una mayor inhibición de generación de todos los radicales en el extracto conservado a -20°C . Se evidenció la influencia de la temperatura y el tiempo en la inhibición de generación de los radicales. El efecto en la inhibición de los $\text{LR}\cdot$ resultó menos afectada.

Tabla 23. Porcentaje de inhibición de generación de radicales $\cdot\text{OH}$, LR^\bullet , A^\bullet producido por extractos ricos en astaxantina (dilución 1:40), bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

	T(d)	T(°C)	Inh $\cdot\text{OH}$ (%)	Inh LR^\bullet (%)	Inh A^\bullet (%)
Extractos	0		95	98	75
	30	-20	81	96,4	77
		4	77,8	93,8	62
		15	74,1	91	65
		-20	76	88	74
	60	4	62	82	63
		15	62	80	65

Inh $\cdot\text{OH}$: inhibición radicales hidroxilos; Inh LR^\bullet : inhibición de radicales lipídicos, A^\bullet :
 Los resultados se expresan en porcentaje (%).
 T (°C): Temperatura en grados centígrados.
 T(d): tiempo (días).

3.3. Preparación de dietas enriquecidas para salmónidos

En la última parte de este trabajo, se presentan los resultados de caracterización de distintos alimentos balanceados utilizados en acuicultura. Asimismo, se preparó alimento balanceado comercial enriquecido con extracto de *P. muelleri* y se lo caracterizó, determinándose su composición centesimal, el perfil de ácidos grasos y la capacidad antioxidante.

3.3.1. Caracterización de alimentos balanceados comerciales

En acuicultura de salmónidos se utilizan distintos tipos de alimentos balanceados según la etapa de crecimiento del pez. Una de las diferencias tiene que ver con el agregado o no de astaxantina. La Tabla 24 presenta los resultados de la composición proximal del alimento balanceado utilizado en un cultivo de trucha arcoiris con y sin astaxantina. La composición centesimal de los mismos mostró que existen diferencias significativas entre el contenido de cenizas y humedad ($p < 0,05$).

Tabla 24. Composición centesimal alimentos balanceados comerciales, con y sin astaxantina.

	Alimento sin astaxantina	Alimento con astaxantina
Hidratos de carbono	36,09 ± 1,61	40,45 ± 1,00
Proteínas	37,06 ± 0,35	36,22 ± 1,73
Lípidos	12,93 ± 1,62	8,92 ± 2,47
Cenizas	9,10 ± 0,05	8,09 ± 0,19*
Humedad	4,82 ± 0,19	6,31 ± 0,02 *

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar ($n=3$), en $g \cdot 100 g^{-1}$ de alimento

* Significativamente diferente, t de Student ($p < 0,05$).

El perfil de FA de los alimentos balanceados se presenta en la Tabla 25. Se observó que existen diferencias en el contenido de FA en los alimentos balanceados comerciales con y sin astaxantina. La concentración de FA totales en el alimento con el pigmento fue, aproximadamente el triple que en el alimento sin pigmento. En cuanto a las proporciones relativas de las diferentes clases de FA, el alimento con astaxantina fue más rico en PUFA que el alimento sin el pigmento. Mientras que el alimento sin astaxantina resultó más

rico en SFA, con un porcentaje cercano al doble al que presento el alimento con astaxantina 24,68 y 41,60% respectivamente.

Tabla 25. Perfil de FA alimento sin y con astaxantina.

	Alimento sin astaxantina	Alimento con astaxantina
C14:0	286,68 ± 180,03	141,73 ± 23,51
C15:0	33,19 ± 2,49	22,31 ± 5,71
C16:0	2631,60 ± 980,20	3732,55 ± 684,78
C18:0	1426,15 ± 140,63	1242,82 ± 223,85
ΣSFA	4377,63 ± 1006,47	5139,41 ± 720,85
C14:1c	40,48 ± 8,23	29,85 ± 5,22
C16:1	354,57 ± 130,94	691,08 ± 112,93
C18:1n9	3335,52 ± 164,87	6416,98 ± 1084,38
C20:1n9	60,99 ± 12,73	136,78 ± 19,72
C22:1n9	N.D.	20,14 ± 2,42
ΣMUFA	3791,56 ± 211,09	7294,83 ± 1090,44
C18:2n6	2003,47 ± 119,77	7207,65 ± 1330,59
C18:3n6	3,59 ± 0,25	39,07 ± 12,69
c18:3n3	204,27 ± 14,63	811,34 ± 151,97
c20:2	11,77 ± 0,07	10,65 ± 3,52
C20:5n3	38,80 ± 5,15	106,67 ± 21,43
c22:5n3	13,15 ± 1,91	31,72 ± 3,45
C22:6n3	78,95 ± 9,79	185,35 ± 24,67
ΣPUFA	2354,00 ± 121,18	8392,45 ± 1339,71

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3), en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

N.D.: no detectado.

3.3.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales

La Figura 28 muestra los resultados (de un experimento tipo) obtenidos del análisis por EPR de la inhibición de generación de radicales (A^\bullet (A) y LR^\bullet (B)) en los alimentos balanceados comerciales, con y sin agregado de astaxantina. Se practicaron diluciones de una solución de alimento balanceado, y se determinó la inhibición de generación de los radicales A^\bullet , OH^\bullet y LR^\bullet . El análisis del alimento balanceado con astaxantina mostró en los 3 casos que a medida que aumenta la concentración de la solución de alimento balanceado con astaxantina disminuye el área generada por el radical. Por otro lado el alimento sin astaxantina no mostró esta tendencia en el análisis de la inhibición de generación de radicales A^\bullet y LR^\bullet . Para el caso de la inhibición de generación

de radicales OH^{\bullet} , no se observan diferencias significativas en la producción del aducto.

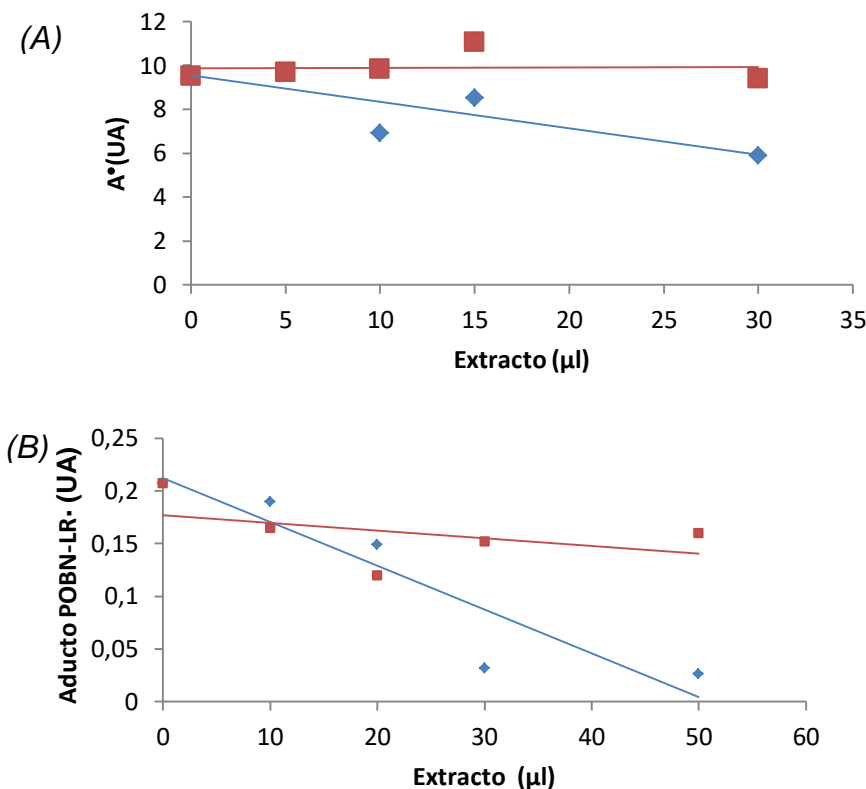


Figura 28. Análisis de la capacidad inhibitoria de generación de radicales libres de alimentos balanceados. (A) A^{\bullet} , y (B) LR^{\bullet} .

(◆): Alimento con astaxantina, (■): alimento sin astaxantina

3.3.3. Elaboración y caracterización de alimento balanceado con extracto

Se trabajó con un alimento base sin carotenoides con la composición centesimal adecuada para juveniles de trucha arcoiris. Para enriquecer al alimento con una concentración de 50 mg de astaxantina.kg⁻¹ y considerando que la concentración de carotenoides en el extracto obtenido fue de 4,2mg g⁻¹, fue necesario incorporar 12 g de extracto por cada 1 kg de balanceado. Los 12 g de extracto aportaron también alrededor de 2370 mg de FA y 214,51 mg de colesterol. Se elaboraron además dos alimentos balanceados con el agregado de pigmento comercial. La Tabla 26 presenta la composición proximal de los cuatro alimentos preparados: alimento base, alimento base con extracto natural

de langostino, alimento base con el agregado de Cariophyl Pink (astaxantina sintética) y alimento base con el agregado de Cariophyl red (cantaxantina sintética). Los cuatro alimentos balanceados no presentaron diferencias significativas en el contenido de lípidos.

Tabla 26. Composición proximal alimentos balanceados preparados.

	ABB	ABE	ABAS	ABCS
Humedad	6,11 ± 0,10 ^a	1,87 ± 0,07 ^b	5,87 ± 0,05 ^a	8,48 ± 0,60 ^c
Hidratos de carbono	20,53 ± 0,34 ^a	25,59 ± 1,11 ^b	22,75 ± 0,39 ^c	19,66 ± 1,09 ^a
Proteínas	48,13 ± 0,24 ^a	46,75 ± 0,99 ^{ab}	46,53 ± 0,13 ^b	46,71 ± 0,58 ^{ab}
Lípidos	6,97 ± 0,21 ^a	7,53 ± 0,23 ^a	6,79 ± 0,34 ^a	6,59 ± 0,56 ^a
Cenizas	18,26 ± 0,07 ^a	18,26 ± 0,44 ^a	18,06 ± 0,12 ^a	16,86 ± 0,42 ^b

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

g. 100g⁻¹ de balanceado

Letras distintas a lo largo de la fila indican diferencias significativas (p<0,05, ANOVA seguido de prueba a *posteriori* Tukey)

ABB= Alimento Balanceado Base; ABE= Alimento Balanceado enriquecido con Extracto; ABAS= Alimento Balanceado con Astaxantina Sintética; ABCS= Alimento Balanceado con Cantaxantina Sintética.

El contenido de los FA de todos los alimentos elaborados se presenta en la Tabla 27. En el perfil de FA del alimento balanceado preparado con extracto, se identificaron los FA propios del extracto, principalmente del grupo de los PUFA ausentes en el alimento balanceado base. Los ácidos grasos más abundantes en todos los alimentos balanceados preparados fueron el palmítico 31,95% y el oleico 29,63%.

Tabla 27. Perfil y cuantificación de FA en alimentos balanceados preparados.

FA	ABB	ABE	ABCS	ABAS
C14:0	315,37 ± 158,49	181,90 ± 54,41	134,50 ± 15,30	367,02 ± 104,36
C15:0	N.D.	21,49 ± 6,01	N.D.	N.D.
C16:0	2528,37 ± 663,93	1519,81 ± 508,21	1352,10 ± 692,82	2596,49 ± 633,52
C17:0	N.D.	52,68 ± 17,62	N.D.	N.D.
C18:0	452,27 ± 43,71	352,15 ± 159,57	324,79 ± 26,56	525,87 ± 102,67
C20:0	N.D.	19,99 ± 20,03	N.D.	N.D.
ΣSFA	3296,01 ± 683,98	2148,03 ± 536,14	1811,42 ± 693,50	3489,38 ± 650,22
C16:1	602,39 ± 230,91	321,24 ± 106,93	285,57 ± 28,14	629,50 ± 131,34
C17:1	N.D.	23,58 ± 13,49	N.D.	N.D.
C18:1n9	1976,15 ± 322,84	1393,92 ± 365,38	1157,00 ± 251,98	2023,20 ± 287,55
C20:1n9	N.D.	80,47 ± 37,53	29,40 ± 17,27	34,15 ± 12,42
C22:1n9/20:4n6	N.D.	33,99 ± 37,74	N.D.	N.D.
C24:1n9	N.D.	26,89 ± 9,39	N.D.	N.D.
ΣMUFA	2578,54 ± 396,92	1880,08 ± 384,76	1471,95 ± 254,13	2686,85 ± 316,37
C18:2n6	1024,03 ± 267,18	554,17 ± 165,56	527,03 ± 8,96	1033,86 ± 160,22
C18:3n6	N.D.	24,67 ± 7,10	N.D.	N.D.
C20:3n6	N.D.	11,21 ± 5,33	N.D.	N.D.
C20:5n3	N.D.	38,34 ± 9,58	N.D.	14,69 ± 9,46
C22:6n3	40,97 ± 36,43	60,71 ± 13,20	22,08 ± 14,77	43,59 ± 21,17
ΣPUFA	1065,01 ± 269,65	689,10 ± 166,60	549,12 ± 17,28	1092,15 ± 161,89
TFA	6939,55 ± 835,51	4717,21 ± 680,62	3832,49 ± 738,80	7268,38 ± 741,00

Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

N.D.: No detectado.

ABB= Alimento Balanceado Base; ABE= Alimento Balanceado enriquecido con Extracto; ABAS= Alimento Balanceado con Astaxantina Sintética; ABCS= Alimento Balanceado con Cantaxantina Sintética.

En los alimentos balanceados con el agregado de los pigmentos sintéticos (ABAS y ABCS), se identificaron los mismos FA que en el alimento balanceado base. Sin embargo el contenido de TFA fue superior en el alimento balanceado con astaxantina sintética.

El agregado de extracto al alimento balanceado incrementó el número de señales que aparecen en el cromatograma (Figura 29). Las nuevas señales que aparecieron en el alimento con agregado de extracto se encuentran hacia el final de la corrida coincidiendo con los tiempos de retención de los ácidos grasos poliinsaturados, EPA y DHA. Los componentes que se encuentran en mayor proporción como se mencionó en el anterior párrafo son los mismos en todos los alimentos, esto se debe al alto contenido en el que se encuentran en el alimento balanceado base.

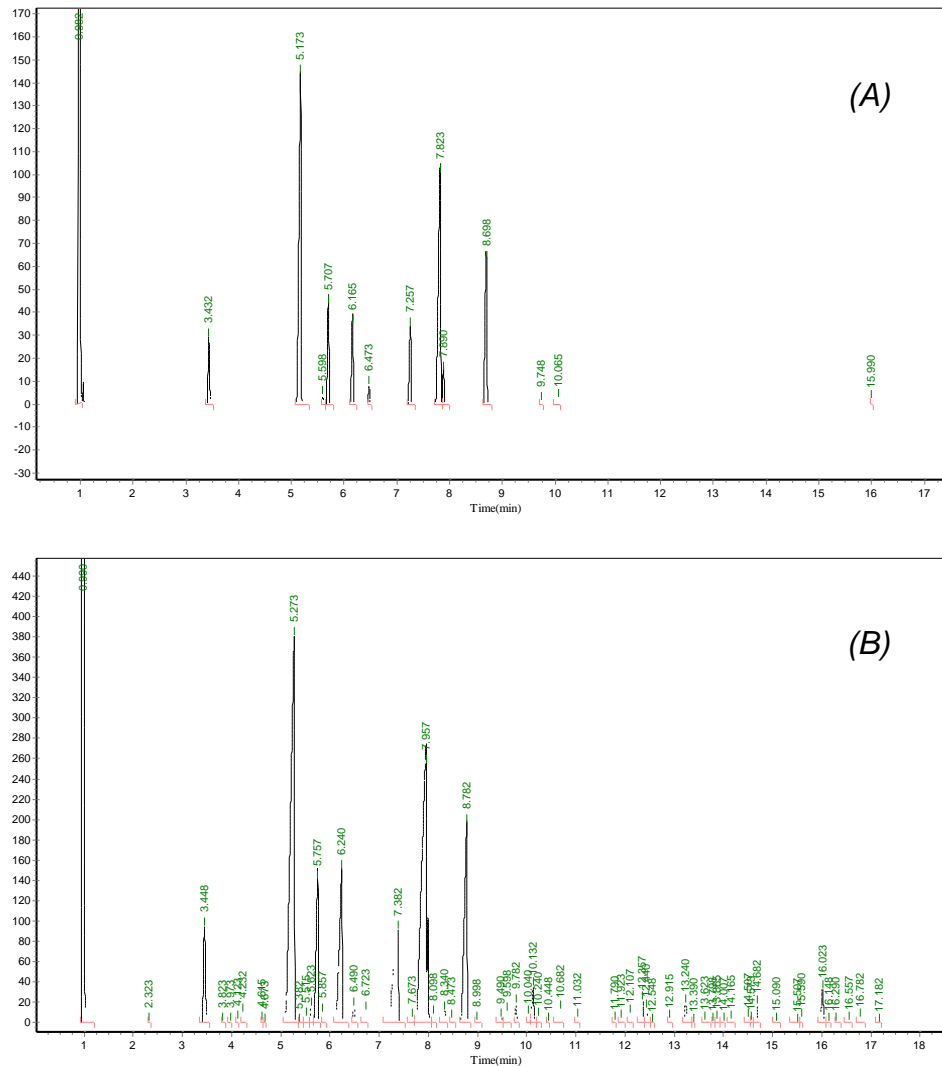


Figura 29. Perfil cromatográfico (CGL) de FA identificados en el alimento balanceado base (A) y (B) del alimento con extracto.

3.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto

La Tabla 28 presenta los resultados del análisis de la capacidad antioxidante en los distintos alimentos balanceados preparados. El alimento con agregado de extracto presentó los mismos resultados que el alimento que fue adicionado con cantaxantina sintética, como pigmento. Mientras que el alimento con astaxantina sintética presentó un resultado ligeramente superior. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre los alimentos con agregado de carotenoide (natural y sintético) y el alimento base.

Tabla 28. Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos balanceados preparados

Muestra	ORAC ($\mu\text{mol eqTrolox}/100\text{ g alimento}$)
ABB	$3,9 \pm 0,2^a$
ABAS	10 ± 2^b
ABCS	9 ± 1^b
ABE	9 ± 1^b

ABB= Alimento Balanceado Base; ABE= Alimento Balanceado enriquecido con Extracto; ABCP= Alimento Balanceado con Carophyll pink; ABCR= Alimento Balanceado con Carophyll red.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA, seguido de prueba a *posteriori* Test de Tukey)

4. Discusión

4.1. Componentes de interés presentes en descartes de *P. muelleri* y *L. santolla*

4.1.1. Composición proximal

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se observa que los descartes de *P. muelleri* presentan en general un mayor contenido en componentes de interés nutricional que los de *L. santolla*. Respecto de las cenizas, los valores para *L. santolla* son significativamente superiores. Esto puede observarse al manipular las cáscaras, que son más rígidas y gruesas. A pesar de estas diferencias que se presentan a simple vista, ambas especies presentan un alto contenido de minerales. Este resultado es importante dado que dificultaría su utilización directa, en la preparación de alimento balanceado. El uso de las cáscaras provocaría un desequilibrio electrolítico en los peces, por la gran cantidad que debería utilizarse, para conseguir adicionar los carotenoides necesarios en los alimentos balanceados.

Las cáscaras de las dos especies analizadas presentan contenidos similares de %N de quitina. La quitina es un componente común en todas las cáscaras de crustáceos. El porcentaje de quitina es ligeramente superior en *L. santolla* y el %N de quitina ligeramente inferior al de *P. muelleri*, esto puede deberse a que presente un menor grado de acetilación. Se sabe que el grado de acetilación de quitina es cercano a 0,9 aunque, puede alcanzar valores de hasta 0,4 (Wu y Zivanovic 2008, Pillai y col. 2009, Rodriguez-Pedroso y col. 2009). La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza (Ávila y col. 2007, Kandra y col. 2012). Existen estudios que demuestran que posee actividad antimicrobiana, propiedades antitumorales, y es efectivo reduciendo los niveles de LDL en hígado y sangre. Además puede ser usado como componente de distintos productos de higiene personal y como ingrediente en lentes de contacto (Blanco y col. 2007). El nitrógeno total, está conformado principalmente por el nitrógeno presente en proteínas y el que forma parte de quitina. Para realizar una correcta estimación de la riqueza proteica del material, se restó al %N total el %N de quitina, es así que esta diferencia resulta mayor para las cáscaras de *P. muelleri*, por lo que puede estimarse que sean más ricas en proteínas que las de *L. santolla*.

Existe un reporte previo que presenta la composición proximal de cáscaras de *P. muelleri*, el mismo se enfocó en el estudio de variación estacional de la composición bioquímica y lípidos, en músculo y cáscaras de este langostino (Jeckel y col. 1991). En comparación a dicho reporte, los resultados en el contenido de minerales obtenidos en esta tesis son superiores, mientras que el contenido de lípidos, y N total no presentó grandes variaciones en la misma época de captura. El contenido de quitina en *P. muelleri* es menor cerca de un 5% a los resultados encontrados en la literatura (Avila y col. 2007), aunque estas diferencias pueden deberse a la metodología aplicada o a variaciones en la época de captura. Existen reportes de composición proximal de descartes de otros géneros de langostinos y camarones, tanto de aguas frías como de aguas cálidas. Se compararon los resultados reportados con los obtenidos en la presente tesis. No se observaron diferencias entre las especies de aguas frías respecto a las de aguas cálidas. Los cáscaras de *P. muelleri* presentan un mayor porcentaje de cenizas que los reportados para cáscaras de los langostinos *Aristeus alcocki*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Penaeus spp.* y *Pandalus borealis* (Shahidi y Synowiecki 1991, Ibrahim y col. 1999, Sánchez-Camargo y col. 2011, Sindhu y Sherief 2011). En cuanto a la riqueza en lípidos, *P. muelleri* presenta el doble que el langostino de aguas frías *P. borealis*. Mientras que, presenta valores intermedios a especies de aguas cálidas *F. paulensis* y *A. alcocki* (Shahidi y Synowiecki 1991, Sánchez-Camargo y col. 2011, Sindhu y Sherief 2011) y un valor muy similar al reportado por Ibrahim y col. (1999) para las especies del género *Penaeus*. Respecto a la quitina, *P. muelleri* presenta un mayor rendimiento que *P. borealis* (Shahidi, y Synowiecki 1991, Fargani y col. 2016) El porcentaje de proteínas de las cáscaras de *P. muelleri* es menor al reportado para cáscaras de *P. borealis*, *Penaeus spp* y *F. paulensis* (Shahidi, y Synowiecki 1991, Ibrahim y col. 1999, Sánchez-Camargo y col. 2011).

En cuanto a *L. santolla*, la quitina es el componente de interés más destacable. El resultado obtenido en el presente trabajo es alrededor de un 10-15% menor, al reportado para la misma especie por Avila y col. (2007), quien estimó un 30-35% de quitina en base seca.

Respecto a la composición proximal de cáscaras de otras especies de centollas, existen reportes de composición proximal de cáscaras distintas

especies de cangrejos. No se encontraron, hasta el momento, reportes de descartes de otras especies de centolla. Los resultados obtenidos para la centolla: *L. santolla*, se compararon entonces con los resultados de la literatura para el cangrejo de río y el cangrejo de las nieves *Chionoecetes opilio*. En cuanto a los porcentajes de proteínas y cenizas de cáscaras de *L. santolla*, estos son ligeramente menores a los reportados para el cangrejo de río. Los lípidos y quitina en *L. santolla*, se encuentran en proporciones similares a las que se presentan en las cáscaras de cangrejo de río (No y col. 1989). El análisis que se practicó en la centolla patagónica *L. santolla*, se realizó a partir de una muestra homogénea de todo el exoesqueleto como se mencionó en la sección materiales y métodos. En la literatura se presenta la composición proximal de las distintas partes del exoesqueleto de *C. opilio* (Sahidi y Synowiecki 1991). El contenido de quitina de *L. santolla* se encuentra dentro del rango que definen las distintas partes de *C. opilio*, específicamente el valor más cercano es el del caparazón.

4.1.2. Ácidos grasos

Las cáscaras de las dos especies analizadas son ricas en FA de importancia nutricional, tanto para peces como para humanos.

Las cáscaras de *P. muelleri* son más ricas en FA que las cáscaras de *L. santolla*. El FA EPA se encuentra en concentraciones que son aproximadamente 10 veces superior y, DHA alrededor de 17 veces respecto al valor obtenido para *L. santolla*. La riqueza de ambos descartes en FA n3 que se evidencia a través de la relación n6/n3, los convierte en una buena fuente de aceite para uso en acuicultura, en especial para peces de agua salada, dado que estos peces presentan expresión reducida de la desaturasa necesaria para la obtención de EPA y DHA. Los FA EPA y DHA cumplen un importante papel como precursores de moléculas biológicamente activas, que intervienen en la respuesta inmune y antiinflamatoria (Oliva- Teles 2012). Existen reportes de la relación entre los EFA n3 y la respuesta inmune en trucha arcoíris. En dietas deficientes en estos FA, existe una producción de anticuerpos baja (Kiron y col. 1995). El material lipídico obtenido de las cáscaras de langostino y centolla contribuiría a la producción de anticuerpos en él pez, contribuyendo en su

salud. Esto es de gran importancia teniendo en cuenta que se espera que sean peces destinados al consumo humano.

La relación n6/n3 permite comparar la calidad de distintos aceites. El resultado obtenido en *P. muelleri* y *L. santolla* supera al obtenido para descartes de merluza, otra especie de captura abundante en la región (Cretton y col. 2016). El cociente n6/n3 en ambas especies de crustáceos indica que son muy ricos en FA n3. Esta característica es de importancia dado que los FA n3 previenen de enfermedades cardiovasculares y antitrombóticas en el humano. Se sabe que las ingestas adecuadas de FA deben tener un cociente n6/n3 entre 1-2/1 y que actualmente las dietas occidentales se encuentran desbalanceadas con cocientes que pueden llegar a 17/1 (Simopoulos 2002)

Un reporte previo realizado por Jeckel y col. (1990) en cáscaras de *P. muelleri*, presentó que los FA constituían la fracción más abundante de los lípidos totales. Esta fracción representó aproximadamente un 91%, valor superior al obtenido en la presente tesis. En cuanto a la calidad de los mismos, los FA más abundantes coinciden con los reportados con anterioridad por Jeckel y col. (1990). La diferencia se presenta principalmente en el porcentaje de PUFA, dado que tanto EPA como DHA se encuentran en mayor proporción que los reportados por Jeckel y col. (1990).

No se han encontrado reportes de contenido de FA provenientes de cáscaras de otras especies de langostinos, solo datos de porcentajes relativos. Si bien en *P. muelleri*, los FA representan el mayor componente lipídico identificado, no es posible generalizar que lo sean para los extractos de otras especies de langostinos. En cuanto al contenido de SFA, las cáscaras de *P. muelleri* presentan la misma proporción y componentes principales que los reportados para cáscaras de especies de aguas cálidas como el *F. paulensis* (Sánchez- Camargo y col. 2011). El contenido de MUFA es un 5% menor en cáscaras de *P. muelleri*, los FA C18:1, C16:1, C20:1 se encuentran en mayor proporción en las cáscaras del langostino de aguas cálidas. El contenido de PUFA es superior en las cáscaras de *P. muelleri*, con una diferencia amplia (mayor a 8% en cada uno) en el contenido de C20:5n3 y C22:6n3. Respecto al perfil presentado para cáscaras de *Penaeus spp*, *P. muelleri* presenta menor concentración en SFA y mayor de MUFA, diferenciándose en los componentes principales. En cuanto a PUFA, las cáscaras del langostino argentino presentan

el mismo porcentaje que el reportado por Ibrahim y col. (1999) para cáscaras *Penaeus spp.* Sin embargo, *P. muelleri* es rico en FA de cadenas mayores a 18 carbonos, como EPA y DHA, que no fueron identificados en *Penaeus spp.*

El perfil de FA de cáscaras de *L. santolla*, presentó un contenido en PUFA similar al reportado para cáscaras de la especie *Chionoecetes opilio* (Lage-Yusty y col. 2011). Se ha encontrado una menor cantidad de reportes de análisis de descartes de distintas especies de centollas. Respecto a otras especies de crustáceos (cangrejos), la *L. santolla*, presenta un mayor contenido de SFA y PUFA respecto a cáscaras de *Charybdis cruciata* (Sachindra y col. 2005 b). Las diferencias en el contenido en PUFA puede deberse al hecho de que la *L. santolla* es una especie de aguas frías por lo que tiene un gran contenido de esta clase de FA, mientras que *C. cruciata* es una especie de aguas cálidas (Sachindra y col. 2005).

El contenido de FA de cáscaras de *P. muelleri* es interesante considerando la posibilidad de agregar un extracto de cáscaras rico en carotenoides obtenido de *P. muelleri* a un alimento balanceado. El extracto aportaría FA, EPA y DHA de alta importancia nutricional, que generalmente no están presentes en cantidad suficiente en los alimentos balanceados dado que los aportes de FA en éstos están dados fundamentalmente por el agregado de aceites vegetales y en menor medida aceites de pescado.

4.1.3. Colesterol

El contenido en colesterol en cáscaras de *P. muelleri* es superior al que se encuentra en cáscaras de *L. santolla*. El porcentaje que este representa en los lípidos totales de *P. muelleri*, es ampliamente superior al reportado por Jeckel y col. (1990). No se encontraron reportes acerca de colesterol en cáscaras de otras especies de crustáceos.

4.1.4. Carotenoides

Los carotenoides son unos de los componentes de mayor interés presentes en descartes del procesamiento de distintos crustáceos (langostinos, camarones, langostas, centollas y cangrejos), tanto de agua salada como de agua dulce (Sachindra y col. 2005, Sachindra y col. 2005 b, Rodde y col. 2008,

Lage-Yusty y col. 2011, Sinduh y Sherief 2011). Los crustáceos patagónicos estudiados en la presente tesis presentaron valores muy diferentes entre sí. *P. muelleri* presentó un mayor rendimiento en carotenoides respecto a *L. santolla*, aunque el extracto de centolla patagónica presentó un mayor porcentaje de carotenoides en el total de lípidos.

Los rendimientos en carotenoides reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo para las cáscaras de distintas especies de crustáceos se muestran en la Tabla 29. El extracto de cáscaras de *P. muelleri* presenta rendimientos mayores que, las cáscaras de *A. alcocki*, especie de agua cálida, y que la especie de agua fría *P. borealis*. Una observación que se puede realizar a partir de la lectura de los artículos disponibles es que, en la mayoría de las determinaciones, la extracción se realiza sobre el material húmedo. En todos los casos en los que se trabajó con cáscaras húmedas, el rendimiento fue mayor al obtenido para *P. muelleri*. Por lo tanto, la variación en el rendimiento de extracción comparando con otras especies puede deberse no sólo a la diferencia que existe entre ellas, sino también a la diferencia en la preparación del material.

El rendimiento de carotenoides de cáscaras de *L. santolla*, es dos veces mayor que el reportado para otras especies de cangrejos como *C. cruciata* y *P. potamon* (Sachindra y col. 2005 b). Cabe destacar que luego de tres extracciones sucesivas las cáscaras presentaron una disminución en el color, pero no se logró un blanqueamiento total. Podría considerarse que la extracción puede mejorarse y aumentar los rendimientos en carotenoides.

Tabla 29. Contenido de carotenoides reportado en cáscaras de crustáceos.

Crustáceo	Especie	Carotenoides (mg· 100g⁻¹)	Autor
Langostino/ camarón	<i>A. alcocki</i>	2,66*	Sindhu y Sherief (2011)
	<i>P. monodon</i>	8,66	Sachindra y col. 2005
	<i>P. indicus</i>	5,98	Sachindra y col. 2005
	<i>M. dobsonii</i>	8,33	Sachindra y col. 2005
	<i>P. stylifera</i>	10,47	Sachindra y col. 2005
	<i>P. borealis</i>	14,77*	Shahidi y Synowiecki 1991
	<i>P. borealis</i>	1,4-3,9	Rodde y col. 2008
	<i>P. muelleri</i>	7,31*	Presente tesis
Cangrejo	<i>C- cruciata</i>	1,1	Sachindra y col. 2005 b
	<i>Potamon potamon</i>	0,69	Sachindra y col. 2005 b
	<i>Crawfish</i>	10,8*	No y col. 1989
	<i>C. opilio</i>	7,17*	Lage-Yusty y col. 2011
	<i>L. santolla</i>	4,44*	Presente tesis

(*) Base seca

Los carotenoides, en especial la astaxantina, son compuestos muy demandados por la industria de la acuicultura. Se adicionan a alimento balanceados de distintas especies, tanto de salmónidos como de crustáceos (Niu y col. 2014). El principal interés es el de pigmentar las carnes, pero existen reportes que demuestran la importancia fisiológica de estos compuestos en los peces. Dentro de las funciones fisiológicas se encuentran: ser precursores de la vitamina A, mejoramiento del rendimiento en la reproducción, mejoramiento del sistema inmune y efecto antioxidante, es por esto que algunos autores sugieren la incorporación de los carotenoides a las dietas (Garcia-Chavarria y Lara-Flores 2013).

4.1.5. Disponibilidad de biomasa

El análisis de la disponibilidad de biomasa muestra que los volúmenes de captura tanto a nivel nacional, como regional son superiores para la especie *P. muelleri* respecto a *L. santolla*. La captura de *P. muelleri* se encuentra en aumento en la última década, hecho que se destaca en el boletín “Estado de la pesca y acuicultura” de la FAO (2018). Mientras que, la captura de *L. santolla*,

presentó altibajos año a año. Si bien el porcentaje de la captura, que se exporta como producto sin procesar es grande (langostino entero), el volumen de descartes del procesamiento de *P. muelleri* es ampliamente superior al de los volúmenes de descartes de *L. santolla*. Los informes anuales de exportación e importación pesquera del MINAGRI (2008-2018), muestran que para *L. santolla* un gran porcentaje del volumen capturado es procesado y exportado. El procesamiento del producto a exportar se produce en los buques de altura, y el principal producto preparado son *clusters*, que producen alrededor de un 40-70 % del peso en descarte. Los buques costeros, embarcaciones pequeñas, desembarcan la totalidad de su captura, que principalmente abastece el mercado interno (Boschi 2016) y es la productora de los descartes existentes. Es debido a esto las diferencias existentes en los volúmenes de descartes. La apertura reciente de una nueva empresa procesadora de *L. santolla* en la región (Empresa King Crab en la localidad de Camarones), indica que podrían aumentar los volúmenes de descartes a futuro.

El uso de los descartes del procesamiento de crustáceos es un tema de interés internacional. Existen numerosos reportes en donde se resumen los posibles usos de estos descartes (Blanco y col. 2007, Rubio- Rodriguez y col. 2010, Kandra y col. 2011, Kandra y col. 2017, Mao y col. 2017, Nguyen y col. 2017). A pesar de que el procesamiento de langostino y centolla producen importantes volúmenes de descartes, no se han encontrado estudios previos de caracterización, y potenciales usos de productos que puedan obtenerse para la industria de la acuicultura, o de la química fina, para el aprovechamiento de los componentes individuales. Los volúmenes de captura del *P. muelleri* del año 2018 son similares a los volúmenes de captura de *P. borealis*, que es una de las especies más estudiadas por el potencial aprovechamiento de sus descartes. Además los volúmenes de captura de *P. muelleri* superan ampliamente (100 veces en 2016) los volúmenes de *Penaeus indicus* (FAO 2019), especie de la cual también existen reportes del análisis de sus descartes. En cuanto a los volúmenes de la centolla *L. santolla*, estos son menores a los volúmenes de captura de *C. opilio* especie de la cual se han estudiado sus descartes (FAO 2019).

4.2. Caracterización del extracto rico en carotenoides a partir de descartes de *P. muelleri*

4.2.1. Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura

El contenido de carotenoides presente en los descartes de *P. muelleri* en las distintas épocas de captura resultó variable. Estos resultados están en concordancia con lo enunciado por Jeckel y col. (1991), que relacionó las variaciones del contenido de carotenoides presentes en cáscaras de *P. muelleri* con los diferentes estadios de muda. En los meses en los que se registró un aumento en el contenido de carotenoides en los residuos completos (septiembre, noviembre y diciembre) los animales tienden a encontrarse en un estadio premuda (Díaz y col. 2003). De acuerdo a investigaciones realizadas por Jeckel y col. (1990) existe un aumento en la concentración de astaxantina en la glándula digestiva presente en los residuos completos antes de la ecdisis (estadio premuda). Por esta razón podría considerarse que el aumento registrado en los residuos completos, respecto de lo hallado en cáscaras, se deba a la acumulación de carotenoides en el hepatopáncreas previo a la muda. Otra posibilidad de la variación en el contenido de carotenoides mes a mes o la variación de carotenoides que se observó entre cáscaras y residuo completo puede deberse a la alimentación. El langostino *P. muelleri* tiene una dieta variada (omnívoro), compuesta por distintas especies de animales entre los que se encuentran camarones (Albertó y col. 1993, Roux y col. 2009). Algunas de las especies que forman parte de la dieta, se alimentan de los productores primarios de astaxantina, las microalgas verdes-azules que son las que sintetizan la astaxantina (Amaya y Nickell 2015), por lo que una variación en el ciclo estacional de las algas podría provocar también la variación en el contenido en las diferentes épocas de captura.

Las variaciones obtenidas, determinan un amplio rango de concentración de carotenoides, el resultado obtenido por Jeckel previamente se encuentra dentro del rango. Como se hizo mención en secciones previas, existen reportes del análisis de este tipo de descarte pero de otras especies. Sachindra y col. (2005) reportaron para distintos langostinos indios (*Penaeus monodon*,

Penaeus indicus, *Metapenaeus dobsonii* y *Parapenaeopsis stylifera*) que el contenido de carotenoides en cabezas fue de 35,8-153,1 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de cabeza y en cáscara 59,8-104,7 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de cáscara. Los máximos alcanzados por estas especies, son menores a los obtenidos en el presente trabajo 19 – 188 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de residuos, y 38 – 265 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de cáscara presentando mayor riqueza de carotenoides las cáscaras sobre el residuo. La concentración de carotenoides por kg de residuo de *P. muelleri* supera también a la reportada por Sánchez-Camargo y col. (2011), para la especie *Farfantepenaeus paulensis* (langostino rojo de Brasil) 34-53 mg de astaxantina. kg^{-1} de residuo en base seca, mientras que *P. muelleri* presenta 77,-525,4 mg. kg^{-1} de residuos en base seca. *P. muelleri* langostino de aguas frías presentó mayor concentración de carotenoide que especies de langostinos de aguas cálidas.

El rendimiento en extracto obtenido de ambos descartes, así como el porcentaje de carotenoides en él, fue variable en las distintas épocas de captura. El hecho de que no existan diferencias significativas entre los descartes, al independizar de la época de captura, es favorable a la utilización del residuo completo en un posible escalamiento. Teniendo en cuenta la estimación de carotenoides obtenidos a partir de la biomasa disponible y, que los requerimientos de carotenoides en alimentos balanceados rondan en 50-100 mg. kg^{-1} , se podrían producir al menos 12000 toneladas de alimento. De acuerdo a los datos de producción nacional de salmónidos, y al factor de conversión que estos tienen, la producción sería suficiente para satisfacer la demanda nacional.

4.2.2. Variación en contenido de FA en distintas épocas de captura

Los FA presentes en ambos materiales, presentaron variaciones significativas entre los descartes y en las distintas épocas de captura. A diferencia de los carotenoides los residuos en todos los meses analizados fueron más ricos. Es interesante notar que en ambos descartes el porcentaje de FA insaturados supera el 34%, valor medio observado en descartes de otros crustáceos (Kandra y col. 2012).

Existe un reporte previo del análisis del perfil de FA en cáscaras de *P. muelleri*. Jeckel y col. (1991) presentaron para esta especie valores ligeramente diferentes para cáscaras. El contenido de ácido oleico fue superior 19-22 % al obtenido en el presente trabajo, sin embargo, el contenido de DHA reportado fue inferior al registrado en la presente tesis. Dentro de los FA más abundantes en ambos descartes es relevante la contribución de los ácidos palmítico y oleico. El ácido palmítico y el ácido oleico son utilizados por peces como fuente de energía en la producción de huevos y el desove. Esto es un dato importante a tener en cuenta debido a que convierte a los descartes no sólo en una fuente de carotenoides, EFA y de calidad nutricional, sino que también son fuente de ácidos grasos de uso energético.

El perfil de FA, en los extractos obtenidos de los descartes del *P. muelleri* presentan un mayor contenido de PUFA respecto a los reportados para otras especies. Sachindra y col. (2005) presentaron un contenido de MUFA + PUFA de 28,7-45,1 % en cabezas, y 15,2-65,2 % en cáscaras, además de que en estas especies no se identificaron EPA y DHA. El elevado contenido en PUFA en los extractos es común en langostinos de aguas frías (Sachindra y col. 2005), y podría estar relacionado al aumento registrado en la concentración de carotenoides respecto también al que presentan especies de aguas tropicales. El residuo completo de *P. muelleri* presentan porcentajes más elevados de los FA, palmítico, oleico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico que los descartes de la especie *Farfantepenaeus paulensis* presentados por Sánchez-Camargo y col. (2011). Si bien el índice PUFA/SFA presentado por Sánchez- Camargo es mayor (1,90) al obtenido en el presente trabajo, *P. muelleri* tiene una relación n3/ n 6 alrededor de 3 veces superior, lo que indica buena calidad nutricional de los FA principalmente EPA y DHA presentes en este descarte. El perfil de FA *P. muelleri* presenta semejanzas, al reportado por Gómez- Estaca (2017) para la especie *L. vannamei*.

4.2.3. Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad

La humedad en las cáscaras ejerció un efecto positivo en la extracción de carotenoides. Existen reportes en los que, en la extracción, utilizaron distintos solventes a los utilizados en esta tesis, pero independientemente del solvente utilizado, los rendimientos de extracción mejoran significativamente con muestras con húmedas (Sindhu y Sherief, 2011, Parjikolaei y col. 2015.)

4.2.4. Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento del descarte

La estabilidad de los carotenoides como se mencionó en la introducción de esta tesis se ve afectada por distintos parámetros entre los que se encuentra la temperatura. Los pigmentos fueron conservados en distintas matrices y en todos los casos la preservación de los pigmentos aumentó con el descenso de la temperatura. En cuanto a las diferentes matrices de conservación ensayadas, el almacenamiento en forma de extracto sería la forma más conveniente. Esto difiere con lo presentado por Gouveia y Empis (2003) para extractos obtenidos de microalgas. En segundo lugar estarían las cáscaras secas, que conservan una mayor proporción de los carotenoides en comparación a las cáscaras húmedas. Esto puede deberse al efecto de la actividad del agua en el deterioro de los alimentos, en este caso en particular en el deterioro de lípidos (Labuza, 1980).). Dados el alto grado de insaturación presente en la estructura de la astaxantina y de los carotenoides en general y la gran cantidad de PUFA presentes en los extractos, éstos son susceptibles a la oxidación. La disminución en el contenido de carotenoides puede deberse, a la acción antioxidante de los mismos al evitar la oxidación de los FA (Takeungwongtrakul y Benjakul, 2016).

Existen reportes del estudio de la estabilidad de carotenoides obtenidos a partir de descartes de *L.vannamei*. Algunos resultados fueron similares, como el efecto de la temperatura en la conservación de un extracto obtenido de

hepatopáncreas del camarón patiblanco *L. vannamei*. (Takeungwongtrakul y Benjakul 2016) y otros resultados presentaron diferencias en cuanto a la cantidad conservada. Para la misma especie (*L. Vannamei*) Gómez-Estaca y col. (2017), obtuvieron un porcentaje de conservación mayor al presentado en esta tesis. Estas diferencias pueden deberse a la cantidad de FA presentes en el extracto susceptibles a oxidación. Dado que como se mencionó en el apartado 4.2.2., el perfil de FA del *L. vannamei* es el que presenta mayor semejanzas al de *P. muelleri*, presentado en esta tesis.

4.2.5. Comportamiento cromatográfico del extracto

Las características estructurales de la astaxantina, hacen posible la existencia de tres formas distintas: Libre, monoesterificada y diesterificada. Estas formas se encuentran en distintas proporciones, según la especie. Si bien para la realización de este análisis sólo se contaba con patrón de astaxantina libre, las dos bandas coloreadas restantes presentaron comportamiento cromatográfico similar a los que la literatura sugiere como, astaxantina monoesterificada y diesterificada (Sánchez-Camargo y col. 2011). Es interesante notar que las proporciones en las que se presentaron las distintas formas en ambos descartes fue la misma, a diferencia de lo reportado para *P. monodon*, en donde el contenido de astaxantina monoesterificada fue dos veces superior en cáscaras respecto de la cabeza (Sachindra y col. 2005). Los resultados obtenidos para los extractos de *P. muelleri*, difieren de las especies reportadas por Sachindra y col. (2005) y de los reportados para el *P. borealis* y *L. vannamei*, donde la forma más abundante fue la diesterificada, seguida por la monoesterificada y luego la libre (Guillou y col. 2005, Gómez-Estaca 2017). Sin embargo, son similares a las proporciones en las que se encuentra en el microalga *H. pluvialis* (Focsan y col. 2016). Esto es importante dado que existen reportes de utilización de este microalga, en donde se ha probado con resultados satisfactorios la pigmentación en trucha arcoíris (Sommer y col 1992).

Es importante resaltar que las separaciones cromatográficas realizadas, no mostraron la presencia de otros carotenoides, como el β -caroteno que se encuentra presente en extractos de otras especies (Sachindra y col. 2005).

En cuanto al análisis de los FA presentes en las bandas, la proporción en la que se encuentran en cada una de ellas difiere. Estas diferencias fueron reportadas también para la especie *A. alcockii* (Sindhu y Sherief, 2011). El perfil de la banda 2 presenta como componentes principales los mismos FA que cáscaras y residuos (palmítico, oleico, eicosapentaenoico y docosahexanoico). En el caso de la banda 3 los FA que se encuentran en mayor proporción son saturados: palmítico y esteárico, encontrándose en una proporción al menos diez veces menor eicosapentaenoico y docosahexanoico. Sindhu y Sherief (2011), reportaron una mayor variedad de FA esterificando a la astaxantina en la especie *A. alcockii*. A diferencia de *P. muelleri* una mayor proporción de MUFA esterifican la forma monoesterificada, mientras que en la forma diesterificada aumenta la proporción de EPA y DHA.

4.2.6. Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol 96%

En estudios previos realizados sobre descartes de langostino y centolla fueron ensayadas extracciones con éter de petróleo, acetato de etilo, cloruro de metileno, acetona, metanol y también mezclas de acetona / metanol. Entre todos estos solventes, la mezcla acetona/ metanol 70/30 fue la que se presentó mejores rendimientos (Mazzuca 2007). Esta mezcla está también aconsejada por Britton y col. (1995). Para aumentar los rendimientos de extracción muchos autores recomiendan el uso de mezclas de solventes, aunque debido a que es más costosa la recuperación de los mismos luego del uso, esta práctica ha quedado restringida solo a laboratorios. En la búsqueda del mejor solvente de extracción se compararon los rendimientos obtenidos con etanol y la mezcla acetona: metanol.

Como se observó en la sección de resultados, el rendimiento total en carotenoides obtenido utilizando etanol como solvente de extracción no difiere del obtenido con la mezcla acetona/metanol. Si se observa el rendimiento de cada forma de astaxantina, los resultados correspondientes a la forma diesterificada son ligeramente menores, pero no significativamente diferentes. Esta diferencia puede deberse a la polaridad del etanol, dado que la mezcla de solventes contaba con un solvente de menor polaridad, la acetona. El uso de

etanol como solvente de extracción fue reportado por Sánchez- Camargo y col. (2011) como co-solvente en la extracción por fluido supercrítico, en donde los resultados fueron exitosos.

La utilización de etanol como solvente de extracción, tiene varias ventajas, en primer lugar, el rendimiento de extracción, por otro lado, la accesibilidad dado que se trabajó con etanol 96°de venta libre, la disminución de los costos en lo que respecta a solventes y la posibilidad de utilizar bioetanol, es decir etanol biosintetizado a partir de residuos de otras industrias, como la azucarera, o a partir de residuos de granos y almidón de maíz (Gray y col. 2006).

4.2.7. Estabilidad de extracto carotenoide: Efectos de la temperatura y el tiempo

El almacenamiento de extractos a temperatura ambiente, provoca cambios que son perceptibles a simple vista. En el día 0 los extractos presentan una coloración roja intensa, a medida que transcurre el tiempo los mismos van adquiriendo color marrón. Estos cambios en la coloración se deben a que la oxidación (fotooxidación o autooxidación) de la astaxantina causa blanqueamiento por desorganización y descomposición de la cadena poliénica (Blanco y col. 2007, Takeungwongtrakul y Benjakul 2016).

El análisis de la variación en el contenido de las diferentes formas de astaxantina mostró que la forma monoesterificada (más abundante) es la que registra mayores pérdidas. Sin embargo el análisis 63527/de las proporciones relativas muestra una mayor conservación de la forma esterificada. Estos resultados coinciden con lo reportado por Blanco y col. (2007), Niamnuy y col. (2008), Armenta y col. (2009). Las pérdidas alcanzadas por la fracción libre a temperatura ambiente, son cercanas al 100 %, estos resultados coinciden con lo reportado por Armenta y col. (2009), en los que la astaxantina libre se oxidó fácilmente y de manera acelerada por la temperatura.

4.2.8. Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *P. muelleri*

El análisis de la evaluación de la capacidad antioxidante mostró, el efecto del extracto en la inhibición de generación de radicales. Esto es debido a la presencia de la astaxantina en sus diversas formas. En el rango de concentraciones trabajadas, se observó que la inhibición de la generación de radicales es proporcional a la concentración de la solución del extracto.

En cuanto a la evaluación del efecto del almacenamiento en la capacidad antioxidante, la misma se vio afectada por la temperatura y el tiempo. De la misma forma que en la conservación de carotenoides, hubo una mayor preservación de la capacidad antioxidante en las muestras que fueron conservadas a -20°C. Estos resultados se evidenciaron para la inhibición de generación de los tres radicales estudiados, •OH, LR• y A•. En general, a las 3 temperaturas analizadas, se registró una mayor inhibición de los RL•. Se ha comprobado que una matriz lipídica favorece a la capacidad antioxidante de la astaxantina (Liang y col. 2009), por lo que la obtención de un extracto lipídico resultaría ventajoso.

Sin embargo es importante tener en cuenta que, por la capacidad de quelar metales divalente de la astaxantina (Hernández-Marín y col. 2012, Focsan y col. 2017) la determinación de los radicales •OH pudo verse afectada. Puede haberse generado la inhibición de la reacción de Fenton que como consecuencia produciría una disminución en la producción de los radicales.

Si se comparan los efectos de la temperatura y el tiempo en la conservación de carotenoides y de la capacidad antioxidante, es interesante notar como esta última se ve menos afectada. La conservación de carotenoides a temperatura ambiente fue afectada con pérdidas en la concentración cercana al 100%, sin embargo, la capacidad antioxidante se ve disminuida sólo en un 10-30% en comparación al día 0 y dependiendo del radical.

4.3. Preparación de dietas enriquecidas para salmónidos

4.3.1. Caracterización de alimentos balanceados comerciales

Como puede apreciarse en la sección 3.3.1, los alimentos balanceados analizados presentan composiciones proximales muy similares, aunque varía el contenido lipídico. Si bien la diferencia entre ambos radica en el agregado o no de astaxantina y éste es de naturaleza lipídica, las cantidades en las que se adiciona son pequeñas (entre 50-100 mg / kg de balanceado) (Bjerkeng 2000, White y col. 2002). Los porcentajes de lípidos, proteínas y cenizas determinados en los alimentos analizados se encuentran entre los recomendados para cubrir los requerimientos básicos en trucha. En cuanto al contenido de FA, el alimento con astaxantina posee un contenido unas 3,5 veces mayor. Esto puede deberse a que en muchos casos se aumenta el contenido de FA para aumentar la absorción de la astaxantina (Chinsing y col. 2013), o a que en algunos casos los gránulos astaxantina sintética contiene además aceites vegetales. En cuanto al contenido de n3 este representa aproximadamente el 0,1% del peso, un porcentaje diez veces menor al sugerido en la literatura (Hilton y Slinger 1981).

4.3.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales

La evaluación de la capacidad antioxidante en los alimentos balanceados permitió observar el efecto del agregado de astaxantina. La misma tiene efecto inhibitorio de la capacidad de generación de radicales A•, •OH, y LR•, que se intensifica con el aumento de la concentración, llegando a una inhibición prácticamente total en el caso de los LR•. Estos resultados concuerdan con los observados en el extracto.

4.3.3. Elaboración y caracterización de alimento balanceados con extracto

En la elaboración del alimento balanceado con el agregado del extracto natural obtenido se busca que el mismo cumpla con los requerimientos necesarios para un correcto desarrollo de los peces. En el alimento balanceado enriquecido con extracto, el contenido lipídico es superior al alimento base, pero inferior con un porcentaje aún menor al sugerido por literatura. En cuanto a los porcentajes de proteínas y carbohidratos obtenidos en el alimento balanceado con extracto, los mismos se encuentran dentro del rango sugerido por Hilton y Slinger (1981) para el correcto desarrollo de la trucha arcoiris.

Se sugiere que los alimentos comerciales contengan porcentajes lipídicos entre 9-13 %, debido a que los mismos proveen de FA, colesterol y carotenoides a los peces. La literatura sugiere que el balanceado debe contener entre un 6-14 % de grasa cruda, la cual tiene distintos orígenes, animal, marina y vegetal. Se ha demostrado que la absorción y deposición de astaxantina en la carne es mayor cuando aumenta el nivel de lípidos en la dieta (Bjerkeng 2000, Choubert y col. 2006).

Si bien en los alimentos balanceados comerciales se utiliza astaxantina en forma libre como aditivo, y en este trabajo se agrega un extracto con dos de las tres formas posibles, existen reportes que indican que las formas esterificadas son igualmente absorbidas (Mendez Pintos y col. 2004).

En cuanto al contenido de FA el balanceado con extracto contiene alrededor de un 30% menos que el alimento base. Sin embargo, el extracto incorpora PUFA que no estaban presentes en el alimento balanceado base, entre estos se encuentra el EPA. Se recomienda que al menos un 1% en la dieta deben ser FA n3 dado que los mismos mantienen el óptimo crecimiento de los peces (Hilton y Slinger 1981), con el agregado del extracto el porcentaje en el balanceado preparado sigue siendo menor a 0,01%. Si bien la contribución del extracto en PUFA es poca la misma es importante dado que estos son intermediarios de moléculas biológicamente activas, por lo que el déficit de estos FA provoca disminución en el crecimiento y aumento de la incidencia de enfermedades pancreáticas (Miller y col. 2008).

4.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto.

Al determinar la evaluación de la capacidad antioxidante del alimento al cual se le adicionó extracto, se observó que dicha capacidad se mantiene. La capacidad antioxidante del alimento con extracto fue ligeramente menor a la obtenida del alimento con astaxantina comercial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la capacidad atrapadora de radicales de la astaxantina puede verse afectada por el contenido de sales (Focsan y col. 2017). Por esta razón la capacidad antioxidante pudo verse afectada en la determinación debido al contenido de sales en el alimento, que se reflejan con un contenido de cenizas ligeramente superior.

5. Conclusiones

1) Las cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla* presentan componentes de valor agregado de interés en distintas industrias como carotenoides, FA y quitina.

2) Para un correcto aprovechamiento de las cáscaras de los crustáceos bajo estudio como fuente de carotenoides de uso en acuicultura, es necesaria la extracción de los componentes. Esto se debe a que la alta proporción de minerales presentes imposibilita su uso directo.

3) Los descartes de *P. muelleri* y *L. santolla* son ricos en componentes de valor nutricional. Sin embargo, el punto crítico en la elección de la materia prima para planificar un posible desarrollo industrial de extracto rico de carotenoides fue la abundancia de los descartes de *P. muelleri* y que los mismos constituyen un problema ambiental en la región.

4) Los carotenoides y FA presentes cáscaras y residuos completos del procesamiento de *P. muelleri* se hallan en concentraciones variables a lo largo del año, en relación al ciclo de muda de la especie.

5) La extracción de carotenoides a partir de cáscaras húmedas ofrece un mayor rendimiento de extracción y reducción de los tiempos de trabajo que las cáscaras secadas previamente. Este es un aspecto importante dado que además se ahorraría en equipos y gastos de energía para efectuar el secado, lo que constituiría una etapa más en el proceso.

6) En la separación cromatográfica de los extractos obtenidos a partir de *P. muelleri*, se observan 3 bandas pigmentadas. La banda corresponde a la astaxantina: libre mientras que las bandas 2 y 3 presentan comportamiento cromatográfico al que la literatura sugiere como astaxantina monoesterificada y diesterificada. La banda 2 es la más abundante.

7) Los pigmentos carotenoides se conservan mejor si son almacenados en forma de extracto que si se los almacena en su matriz original

(cáscara) y a -20°C. Por tanto será conveniente pensar en un proceso en el que el material fresco se procese inmediatamente.

8) Todas las formas de astaxantina se ven afectadas por la temperatura y el tiempo, aunque la forma libre es la más susceptible.

9) El extracto rico en astaxantina de *P. muelleri*, presenta capacidad antioxidante. Aunque el contenido de carotenoides disminuye a medida que aumenta la temperatura, la capacidad antioxidante del extracto se mantiene por un período de 60 días.

10) El alimento balanceado suplementado con extractos ricos en astaxantina presenta los contenidos mínimos en lípidos requeridos para el desarrollo de los peces.

11) El extracto de *P. muelleri* adicionado al alimento balanceado aporta FA de calidad nutricional, ausentes en el alimento base.

6. Perspectivas.

Se espera próximamente terminar con el ensayo *in vivo*, esta etapa permitirá evaluar la capacidad pigmentadora y efecto antioxidante del aditivo obtenido en salmónidos.

Se espera en etapas posteriores continuar trabajando con el alimento balanceado para mejorar aún más su calidad. Podrían realizarse análisis toxicológicos, microbiológicos y de estabilidad del alimento. Como así también estudios de palatabilidad del mismo y biodisponibilidad. El trabajo también brinda apertura para continuar con el estudio de la materia prima respecto a otros productos de valor agregado como la quitina, proteínas y FA.

7. Bibliografía

- Agbozo, S., Street, S., Kispert, L. D. 2018. The carotenoid bixin: Optical studies of aggregation in polar/water solvents. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **362**: 31-39.
- Ahmed, F., Yan, L., Fanning, K., Netzel, M., Schenka, P.M. 2015. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. *Food Research International*. **74**: 231–236.
- Albertó, E., Scrosati, R. A., Díaz, G. A. 1993. Feeding of the shrimp *Pleoticus muelleri*(Crustacea, Decapoda) from the Gulf of San Jorge, Argentina. *Gayana Zoología*. **57**(2), 279-284.
- A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (15th ed.).
- Amaya, E., y Nickell, D. 2015. Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans. Capítulo 11 *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Copyright © 2015 Elsevier Ltd.
- Avila A.J., Costamagna V., Strumia M.C. 2007. Obtención de quitina y quitosano a partir de caparazones de langostinos y centollas. *Naturalia patagonica*. **3**(2):1-8 ISSN 0327 - 8050ISSN 0327 – 5272
- Basu, S. 2007. The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. **51**(2): 48-61.
- Bjerkeng, B. 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 71-89.
- Blanco, M., Sotelo, C.G., Chapela, M.J., Pérez-Martín, R.I. 2007. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends in Food Science & Technology*. **18**: 29-36
- Bligh,E.G., Dyer,W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **37**: 911-917

- Boggio, S. M., Hardy, R. W., Babbitt, J. K., Brannon, E. L. 1985. The influence of dietary lipid source and alpha-tocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. **51(1)**: 13-24.
- Borbat, P.P., da Costa-Filho, A.J., Earle, K.A., Moscicki J.K., Freed, J.H., 2001. Electron spin resonance in studies of membranes and proteins. *Science*. **291**: 266-269.
- Boschi, E.E., ed. 2016. Los crustáceos de interés pesquero y otras especies relevantes en los ecosistemas marinos. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP. 271 p.
- Brauge, C., Corraze, G., Médale, F. 1995. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, body composition, nitrogen excretion and plasma glucose levels in rainbow trout reared at 8 or 18C. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences*. **35 (3)**: 277- 290.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 1995. Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis, 1st Ed.; Birkhauser: Basel, Switzerland: Birkhäuser. Pp:81-107, 131-198.
- Cao, G., Prior, R. L. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in enzymology*. **299**: 50-62.
- Chen, X., Chen, R., Guoa,Z., Li, C., Li P. 2007. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with b-cyclodextrin. *Food Chemistry*. **101**:1580–1584
- Chimsung, N., Lall, S.P., Tantikitti, C., Verlhac-Trichet, V., Milley, J.E. 2013. Effect of dietary cholesterol on astaxanthin transport in plasma of Atlantic salmo (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*. **165**: 73-81.
- Choubert, G. 1999. Nutrition and Feeding for fish and crustaceans. Springer 2001
- Chunhua, Y., Shuzhen, Y., Xiaolu, L., Hai,Y. 2013. Efficient Extraction of Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* with Polar and Non-polar Solvents after Acid Washing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **21(7)**:776-780.

Christie, W.W. 1989. Gas Chromatography and Lipid: A Practical Guide. 1^o edición, Escocia.

Cretton, M., Cerdá, R., Gurín, M.C., Malanga, G., Mazzuca, M. 2015. Deshechos pesqueros: su utilización como nutrientes en acuicultura. *Libro de Resúmenes IX Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XVII Coloquio de Oceanografía : Ciencia y Sociedad: Integrando saberes en los estudios del mar, p351, ISBN 978-987-33-9294-8.*

Cretton, M., Rost, E., Mazzuca Sobczuk, T., Mazzuca, M., 2016. Variation in the proximate composition and fatty acid profile recovered from Argentine hake (*Merluccius hubbsi*) waste from Patagonia. *Grasas y aceites. 67 (1) :1-6.*

D'Abamo, L.R. 1989. Lipid requirements of shrimp. *Advances in Tropical Aquaculture.9: 271-285.*

Díaz, A.C., Petriella, A.M., Fenucci, J.L., 2003. Ciclo de muda y reproducción de la población del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeoidea) de Mar del Plata. *Ciencias Marinas 29(3): 343–355.*

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(5): 1768-1774.*

Eisenberg, D., Crothers D., 1979. Biochemical spectroscopy. En: Eisenberg, D., Crothers, D. (eds.), *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, pp. 562-645

FAO, 2014a. Fisheries & Aquaculture - Perfiles sobre la pesca y la acuicultura por países - La República Argentina.

FAO, 2014b. Manual práctico para el cultivo de la trucha arcoiris. Guatemala.

FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma, Italia. 224 pp.

FAO, 2018. FAO Aquaculture Newsletter. No. 58 (April). Roma, Italia.

FAO. 2019. Species Fact Sheets *Pandalus borealis*. 20/06/2019, de FAO Fisheries and Aquaculture Department Sitio web: <http://www.fao.org/fishery/species/3425/en>

Fargani, H.E., Lakhmiri, R., Albourine, A., Cherkaoui, O., Safi, M. 2016. Valorization of shrimp co-products "*Pandalus borealis*": Chitosan production and its use in adsorption of industrial dyes. *Journal of Materials and Environmental Science*. **7 (4)**: 1334-1346

Farrell, A. P., Munt, B. 1983. Cholesterol levels in the blood of Atlantic salmonids. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*. **75(2)**: 239-242.

Farrell, A. P., Saunders, R. L., Freeman, H. C., Mommsen, T. P. 1986. Arteriosclerosis in Atlantic salmon. Effects of dietary cholesterol and maturation. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* **6(4)**: 453-461.

Focsan, A.L., Polyakov, N.E., Kispert, L.D. 2017. Photo Protection of Haematococcus pluvialis Algae by Astaxanthin: Unique Properties of Astaxanthin Deduced by EPR, Optical and Electrochemical Studies. *Antioxidants*. **6**: 80;

García-Chavarría, M., Lara-Flores, M. 2013. The use of carotenoid in aquaculture. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, **8(2)**, 38-49.

García, S.M., and Rosenberg, A.A. 2010. Food security and marine capture fisheries: characteristics, trends, drivers and future perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **365**: 2869-2880.

Giulivi, C., Cadenas, E. 1993. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *FEBS Letters*. **332**: 287-290.

Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., and Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. **327 (5967)**: 812-818

- Gómez-Estaca, J., Calvo M.M., Álvarez-Acero, I., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. 2017. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and a-tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chemistry*. **216**: 37–44.
- Goswami, G., Chaudhuri, S., Dutta, D. 2010. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26(11)**: 1925-1939.
- Goswami, G., Chaudhuri, S., Dutta, D. 2015. Studies on the stability of a carotenoid produced by a novel isolate using low cost agro-industrial residue and its application in different model systems *LWT - Food Science and Technology* .**63**: 780-790
- Goto, M., Kanda, H., Wahyudiono Machmudah, S. 2015. Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO₂ and subcritical dimethyl ether. *Journal of Supercritical Fluids*. **96**: 245-251.
- Gouveia, L., Empis, J.M.A. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **4(2)**: 227-233.
- Gray, K. A., Zhao, L., Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Current opinion in chemical biology.*, **10(2)**: 141-146.
- Green, M.J., Hill, H.A. 1984. Chemistry of dioxygen. *Methods in Enzymology*. **105**: 3-22.
- Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, **21(5)**: 210-216.
- Guillou, A., Saucy, P., Khalil M., Adambounou L. 1995. Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, **136**: 351–362.

- Halliwell, B. 2006. Special issue on reactive oxygen species. reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. **141(2)**: 312-322.
- Han, T., Li, X., Wang, J., Wang, C., Yang, M., Zheng, P. 2018. Effects of dietary astaxanthin (AX) supplementation on pigmentation, antioxidant capacity and nutritional value of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, **490**: 169-177.
- Hernández Becerra, J.A., Ochoa Flores, A.A., Alfaro, G.V., Soto-Rodriguez, I., Rodríguez-Estrada, M.T., García, H.S. 2014. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. *Food Chemistry*. **145**: 832–839
- Hernández-Marin, E., Barbosa, A., Martínez, A. 2012. The metal cation chelating capacity of astaxanthin. Does this have any influence on antiradical activity?. *Molecules*, **17(1)**: 1039-1054.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M. 2006. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**:185–196.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M., Arguëlles-Monal W., 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers* **56**: 41–45.
- Hilton, J.W., Slinger, S.J., 1981. Nutrition and feeding of rainbow trout. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. **55**: 1-15.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(6)**: 1841-1856.
- Ibrahim, H. M., Salama, M. F., El-Banna, H. A. (1999). Shrimp's waste: Chemical composition, nutritional value and utilization. *Food/Nahrung*. **43(6)**: 418-423
- Itoh, T., Tomiyasu, A., Yamamoto, K. 2011. Efficient Synthesis of the Very-Long-Chain n-3 Fatty Acids, Tetracosahexaenoic Acid (C 24: 6n-3) and Tricosahexaenoic Acid (C 23: 6n-3). *Lipids*, **46(5)**: 455-461.

- Je, J. Y., Park, P. J., Kim, S. K. 2004. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*. **55(1)**: 17-22.
- Jeckel, W. H., de Moreno, J. E. A., Moreno, V. J. 1990. Changes in biochemical composition and lipids of the digestive gland in females of the shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate) during the molting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. **96(3)**: 521-525.
- Jeckel, W.H., Aizpun, J.E., Moreno, V.J. 1991. Seasonal variation in the biochemical composition and lipids of muscle and carapace in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. **98B**: 261-266
- Jensen, C., Birk, E., Jokumsen, A., Skibsted, L. H., Bertelsen, G. 1998. Effect of dietary levels of fat, α -tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout. *European journal of food research and technology*. **207(3)**: 189-196.
- Jobling, M., Koskela, J., Savolainen, R. 1998. Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, **29(8)**: 601-607.
- Jones, D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. **8(9-10)**: 1865-1879.
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R. 1994. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochemistry and Photobiology*. **59**: 1-4.
- Kandra, P., Challa, M. M., Jyothi, H. K. P. 2012. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied microbiology and biotechnology*. **93(1)**, 17-29.
- Kandra, P., Venkatesh, K., Immandi, S. B., Kasturi, A. P. K., Krishna, C. R., Mohan, C. M. 2017. Next generation nutraceutical from shrimp waste: the convergence of applications with extraction methods. *Food chemistry*. **237**: 121-132.

- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi T., Watanabe T. 1995. Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. **(3)**: 361-367.
- Kispert, L. D., Konovalova, T., Gao, Y. 2004. Carotenoid radical cations and dications: EPR, optical, and electrochemical studies. *Archives of biochemistry and biophysics*, **430(1)**: 49-60.
- Kotake, Y., Tanigawa, T., Tanigawa, M., Ueno, I., Allen, D.R., Lai, C. 1996. Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1289**: 362-368.
- Krinsky, N. I. 1993. Actions of carotenoids in biological systems. *Annual review of nutrition*, **13(1)**, 561-587.
- Lage-Yusty, M. A., Vilasoa-Martínez, M., Álvarez-Pérez, S., López-Hernández, J. 2011. Chemical composition of snow crab shells (*Chionoecetes opilio*) Composición química del caparazón del cangrejo de las nieves (*Chionoecetes opilio*). *CyTA-Journal of Food*, **9(4)**: 265-270.
- Lall, S. P., Dumas, A. 2015. Nutritional requirements of cultured fish: Formulating nutritionally adequate feeds. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. **53**: 109.
- Latscha, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture*. **9**: 319-325.
- Lepage G., Roy CC. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*. **27**: 114–120.
- Liang, J., Tian, Y. X., Yang, F., Zhang, J. P., Skibsted, L. H. 2009. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chemistry*, **115(4)**: 1437-1442.
- Lladser, N.L., Becerra Vargas, A.A., Rost, E., Cretton, M., Mazzuca Sobczuk, T., Mazzuca, M. 2014. Propuesta de des-primarización en el procesamiento

del langostino del Golfo San Jorge. Memorias del COINI. ISBN 978-987-1896-39-4

Loftsson, T., Biljana I., Gudrun M.A., Orri T.O., Stefansson, E. 2016. Fatty acids from marine lipids: Biological activity, formulation and stability. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **34**: 71-75.

Luchini, L. y Panné Huidobro, S. 2008. Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local Dirección de Acuicultura -Subsecretaría de Pesca y Acuicultura- SAGPyA.

Malanga, G., Puntarulo, S. 2012. The use of electron paramagnetic resonance (EPR) in the study of oxidative damage to lipids in aquatic systems. En: Abele, D., T., Zenteno-Savín, & J.P., Vázquez-Medina (eds.), *Book on Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, Willey-Blackwell, West Sussex, Reino Unido. pp 448.

Malanga, G., M.B., Aguiar, Puntarulo, S. 2012. The ascorbyl radical/ascorbate ratio as index of oxidative stress in aquatic organisms. En: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P. & Zenteno-Savín, T. (eds.). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, Willey-Blackwell, West Sussex, Reino Unido, pp. 458.

Maoka, T. 2011. Carotenoids in marine animals. *Marine drugs*. **9(2)**: 278-293.

Maraschiello, C., Díaz, I., Regueiro, J. A. G. 1996. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Journal of High Resolution Chromatography*, **19(3)**: 165-168.

Martín, J. F., Gudiña, E., Barredo, J. L. 2008. Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories*, **7(1)**, 3.

Martínez-Delgado, A.A., Khandual, S., Villanueva-Rodríguez, S.J. 2017. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*. **225**: 23–30.

- Mendes-Pinto M.M., Choubert G., Morais R. 2004. Effect of dietary bile extracts on serum response of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a preliminary study. *Aquaculture Nutrition*. **10(6)**: 353-357
- Miller, M.R., Nichols, P.D., Carter, C.G. 2008. n-3 Oil sources for use in aquaculture – alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutrition Research Reviews* **21**: 85–96.
- Minagri (b), 2018. INFORME DPyGP N° 01/2018. *Informe Anual, 2017*.
- Minagri(a), 2018. EXPORTACIONES E IMPORTACIONES PESQUERAS – 2008 - 2017. *Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías*.
- Moghaddam, M. R. M., Janmohammadi, H., Sheikhzade, N. 2015. Comparison and investigation of the effects of natural carotenoids and dietary astaxanthin on carcass pigmentation, growth performance and serum lysozym activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Biosciences (IJB)*, **6(1)**: 235-242.
- Morales M.D., y Calvo P.M.A. 1987. Extracción del pigmento astaxantina de desechos de crustáceos. *Uniciencia* **4(1-2)**: 51-56
- Niamnuy, C., Devahastin, S., Soponronnarit, S., Raghavan G.S.V. 2008. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *Journal of Food Engineering*. **87**: 591-600.
- No, H. K., Meyers, S. P., Lee, K. S. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **37(3)**: 575-579.
- Niu, J., Wen, H., Li, C. H., Liu, Y. J., Tian, L. X., Chen, X., Lin, H. Z. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and β -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition. *Aquaculture*. **422**: 8-17.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*. **35(2)**, 83-108.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49(10)**: 4619-4626.
- Panné Huidobro, S. 2015. Producción por Acuicultura en Argentina en el 2015. Dirección de Acuicultura Dirección Nacional de Planificación Pesquera *Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Ministerio de Agroindustria*
- Parajo, J.C., Santos, V., Vazquez, M. 1996. Producción biotecnológica de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*.
- Parjikolaei, B.R., El-Houri, R.B., Fretté, X.C., Christensen, K.V. 2015. Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. *Journal of Food Engineering*. **155**: 22-28
- Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, C. P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*. **34(7)**: 641-678.
- Porter, N.A. 1986. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*. **19**: 268-273.
- Pospíšil P. 2009. Review Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1787**: 1151-1160
- Pu, J., Bechtel, P.J., Sathivel, S. 2010. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosystems Engineering*. **107**: 364-371.
- Quan, C., Turner, C. 2009. Extraction of astaxanthin from shrimp waste using pressurized hot ethanol. *Chromatographia*. **70(1-2)**, 247-251.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A. M., Carvalho, F., Fernandes, E. 2018. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*. **120**: 681-699.
- Rødde, R. H., Einbu, A., Vårum, K. M. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate polymers*. **71(3)**: 388-393.

- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, **15(3)**: 307-317.
- Roux, A., Piñero, R., Moriondo, P., & Fernández, M. 2009. Diet of the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) in Patagonian fishing grounds, Argentine. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. **44(3)**: 775-781.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Sara, M., Sanz, M. T., Carballido, J. R. 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11(1)**: 1-12.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., Mahendrakar, N. S. 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85(1)**: 167-172.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., Mahendrakar, N. S. 2005 b. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *LWT-Food Science and Technology*. **38(3)**: 221-225.
- Sachindra, N.M., Bhaskar,N., Mahendrakar, N.S. 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*. **26**: 1092-1098.
- Shahidi, F., Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of agricultural and food chemistry*. **39(8)**: 1527-1532.
- Sánchez- Moreno, C. 2002. Review: Free Radical Scavenging Activity in Foods. *Food Science and Technology International*. **8(3)**: 121–137.
- Sánchez-Camargo, A.P., Almeida Meireles, M.A., Fontoura Lopes, B.L., Cabral, F.A. 2011. Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Food Engineering*. **02**: 87–93.

- Satoh T. 2016. Astaxanthin: Health Benefits and Toxicity. Capítulo 38. *Nutraceuticals*. Elsevier Inc.
- Seabra, L. M. A. J., Pedrosa, L. F. C. 2010. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*, **23(6)**: 1041-1050.
- Sindhu, S., Sherief, P.M. 2011. Extraction, Characterization, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Carotenoids from the Shell Waste of Arabian Red Shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 1938. *Open Conference Proceedings Journal*. **2**: 95-103.
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and pharmacotherapy*. **56(8)**: 365-379.
- Sommer, T. R., D'Souza, F. M. L., Morrissy, N. M. 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*. **106(1)**: 63-74.
- Stahl, W., Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, **24(6)**, 345-351.
- Steinbrenner, J., Sandmann, G. 2006. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, **72(12)**: 7477-7484.
- Storebakken, T., No, H. K. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. **100(1-3)**: 209-229.
- Storebakken, T., Per Foss, K., Schiedt, E., Austreng Synnøve, L.J., Ulrich, M. 1987. Carotenoids in Diets for Salmonids IV. Pigmentation of Atlantic Salmon with Astaxanthin, Astaxanthin Dipalmitate and Canthaxanthin. *Aquaculture*. **65**: 279-292.
- Strati, I., Sinanoglou, V., Kora, L., Miniadis-Meimaroglou, S., Oreopoulou, V. 2012. Carotenoids from foods of plant, animal and marine origin: an efficient HPLC-DAD separation method. *Foods*. **1(1)**: 52-65.
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S., Santoso, J., Trilaksani, W., Nurilmala, M. 2015. Extraction and Stability of Carotenoid-Containing Lipids from

- Hepatopancreas of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Processing and Preservation*. **39(1)**: 10-18.
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S. 2016. Astaxanthin degradation and lipid oxidation of Pacific white shrimp oil: kinetics study and stability as affected by storage conditions. *International Aquatic Research*. **8**: 15-27.
- Torrissen, O.J. 1989. Pigmentation of Salmonids: Interactions of Astaxanthin and Canthaxanthin on Pigment Deposition in Rainbow Trout. *Aquaculture*, **79**: 363-374
- Trevithick-Sutton, C. C., Foote, C. S., Collins, M., Trevithick, J. R. 2006. The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: a chemiluminescence and ESR study. *Molecular Vision*. **12(12)**: 1127-35.
- Vakarelova, M., Zanoni, F., Lardo, P., Rossin, G., Mainente, F., Chignola, R., Zoccatelli, G. 2017. Production of stable food-grade microencapsulated astaxanthin by vibrating nozzle technology. *Food chemistry*. **221**, 289-295.
- White, D.A., Page, G.I., Swaile J., Moody A.J. Davies S.J. 2002. Effect of esterification of absorption of astaxanthin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. **33**: 343-350.
- Wu, T., Zivanovic, S. 2008. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*. **73(2)**: 248-253.
- Wynyard, J., Firpo, C.A., Mauna, C. 2015. Contenido de carne de la centolla (*Lithodes santolla*) procesada a bordo de buques centolleros. <https://www.inidep.edu.ar/component/k2/248-informes-de-investigacion-2015.html>
- Wynyard, J., Iorio, M.I., Firpo, C., Boschi E.E. 2016. El mar Argentino y sus recursos pesqueros: tomo 6, los crustáceos de interés pesquero y otras especies relevantes en los ecosistemas marino/ Enrique E. Boschi 1ª ed- Mar del Plata: INIDEP, 2016 p229-248. ISBN 978-987-1443-11-6.

Young, J.J., Park, P.J., Kim, S.K. 2004. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology*. **42**: 381–387.

Yuan, C., Du, L., Jin, Z., Xu, X. 2013. Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate polymers*. **91(1)**: 385-389.

Zapata, S., Piedrahita, A. M., Rojano, B. 2014. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic content of fruits and vegetables from Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*. **16(1)**, 25-36.