

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

CIT- GSJ

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

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, que me permitirá hacer 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 y buena predisposición.

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	
Resumen.....	iv
ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. <i>Acuicultura</i>	10
1.2. <i>Características de los alimentos balanceados</i>	12
1.3. <i>Astaxantina (3S, 3'S) 3,3'- dihidroxi- β,β'caroteno- 4,4'- diona</i>	16
1.4. <i>Uso de astaxantina como antioxidante</i>	21
1.4.1. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	24
1.5. <i>Metodologías para la extracción de carotenoides a partir de fuentes naturales</i> 25	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. <i>Material biológico</i>	30
2.2. <i>Preparación de los extractos</i>	30
2.3. <i>Preparación de dietas</i>	31
2.4. <i>Composición centesimal</i>	32
2.4.1. <i>Humedad</i>	32
2.4.2. <i>Cenizas</i>	32
2.4.3. <i>Nitrógeno total</i>	33
2.4.4. <i>Quitina</i>	33
2.4.5. <i>Lípidos</i>	34
2.5. <i>Ácidos grasos (AG)</i>	34
2.6. <i>Colesterol</i>	34
2.7. <i>Carotenoides</i>	35
2.7.1. <i>Astaxantina</i>	36
2.8. <i>Capacidad antioxidante</i>	36
2.8.1. <i>Espectroscopía de resonancia paramagnética</i>	36
2.8.1.1. <i>Generación de radicales lipídicos (RL[•])</i>	36
2.8.1.2. <i>Producción de radical hidroxilo ([•]OH)</i>	37
2.8.1.3. <i>Detección de radical ascorbilo (A[•])</i>	38
2.8.2. <i>Ensayo de la inhibición de la oxidación de fluoresceína (ORAC)</i>	38
2.9. <i>Disponibilidad de biomasa</i>	39
2.10. <i>Estadística</i>	40
2.11. <i>Reactivos</i>	41
3. RESULTADOS	42
3.1. COMPONENTES DE INTERÉS PRESENTES EN DESCARTES DE <i>P. MUELLERI</i> Y <i>L. SANTOLLA</i>	43
3.1.1. <i>Composición proximal</i>	44
3.1.2. <i>Ácidos grasos (AG)</i>	45
3.1.3. <i>Colesterol</i>	47
3.1.4. <i>Carotenoides</i>	48
3.1.5. <i>Disponibilidad de biomasa</i>	50
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN CAROTENOIDES A PARTIR DE DESCARTES DE <i>P. MUELLERI</i>	55
3.2.1. <i>Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura</i>	56

3.2.2.	<i>Variación del contenido en AG en distintas épocas de captura</i>	60
3.2.3.	<i>Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad</i>	64
3.2.4.	<i>Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento de cáscaras</i>	65
3.2.5.	<i>Comportamiento cromatográfico del extracto.</i>	66
3.2.6.	<i>Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol</i> 96	69
3.2.7.	<i>Efectos de la temperatura y el tiempo en los carotenoides del extracto.</i>	70
3.2.8.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de P. muelleri</i>	73
3.3.	PREPARACIÓN DE DIETAS ENRIQUECIDAS PARA SALMÓNIDOS	77
3.3.1.	<i>Caracterización de alimentos balanceados comerciales</i>	78
3.3.2.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales</i>	79
3.3.3.	<i>Elaboración y caracterización de alimento balanceado con extracto</i>	80
3.3.4.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto</i> 84	
4.	DISCUSIÓN	85
4.1.	COMPONENTES DE INTERÉS PRESENTES EN DESCARTES DE P. MUELLERI Y L. SANTOLLA	86
4.1.1.	<i>Composición proximal</i>	86
4.1.2.	<i>Ácidos grasos.</i>	88
4.1.3.	<i>Colesterol</i>	90
4.1.4.	<i>Carotenoides</i>	90
4.1.5.	<i>Disponibilidad de biomasa</i>	92
4.2.	CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN CAROTENOIDES A PARTIR DE DESCARTES DE P. MUELLERI	93
4.2.1.	<i>Variación del contenido en carotenoides en diferentes épocas de captura</i> ...	93
4.2.2.	<i>Variación en contenido de AG en distintas épocas de captura.</i>	95
4.2.3.	<i>Rendimiento de extracción a partir de biomasa de langostino con diferente contenido de humedad</i>	96
4.2.4.	<i>Evaluación del contenido de carotenoides totales en distintas condiciones de almacenamiento del descarte</i>	96
4.2.5.	<i>Comportamiento cromatográfico del extracto</i>	97
4.2.6.	<i>Comparación de solventes de extracción: acetona/metanol 7/3 vs. Etanol</i> 96	98
4.2.7.	<i>Estabilidad de extracto carotenoideo: Efectos de la temperatura y el tiempo</i>	99
4.2.8.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de P. muelleri</i>	100
4.3.	PREPARACIÓN DE DIETAS ENRIQUECIDAS PARA SALMÓNIDOS ...	101
4.3.1.	<i>Caracterización de alimentos balanceados comerciales</i>	101
4.3.2.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos balanceados comerciales</i>	101
4.3.3.	<i>Elaboración y caracterización de alimento balanceados con extracto</i>	102
4.3.4.	<i>Evaluación de la capacidad antioxidante ORAC de alimento balanceado con extracto.</i> 103	
5.	CONCLUSIONES	104
6.	PERSPECTIVAS.	107
7.	BIBLIOGRAFÍA	109

wq

Resumen

Argentina es un país costero con un extenso litoral marítimo, que permiten el desarrollo de la pesca continental. 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 caparzones (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 peces de agua dulce, trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) en la Patagonia y pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en el norte del país. Para poder aumentar el desarrollo del cultivo de salmónidos, el principal inconveniente es el valor de los alimentos balanceados. Los alimentos balanceados tienen entre sus ingredientes aceites de distintos orígenes que aportan ácidos grasos (AG) con distintos grados de insaturación; los cuales 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 AG se agregan diversos antioxidantes, como BHT, BHA o antioxidantes naturales. Los alimentos balanceados contienen además pigmentos como la astaxantina. 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 (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β - β caroteno) 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. Se estudio 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 centolla (*Lithoides santolla*) y langostino argentino (*Pleoticus muelleri*). Se estudió el rendimiento de extracción de astaxantina con los dos tipos más abundantes de descartes (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. El material fue provisto por empresas pesqueras de la localidad. La muestra consistió en cáscaras de cola y cabezas de *P. muelleri*, caparazones y cáscara de patas de *L. santolla*. Residuos de ambos materiales presentaron componentes de valor agregado como carotenoides, AG, quitina. Se observó que el mejor tratamiento del material de partida para obtener más rendimiento en astaxantina es procesar los descartes inmediatamente o bien almacenarlo secos a bajas temperaturas. Los carotenoides como los AG 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. En los extractos se observaron distintas formas de astaxantina, libre y monoesterificada, o libre, monoesterificada y diesterificada, siendo la monoesterificada la forma más abundante. Todas las formas de astaxantina se ven afectadas por la temperatura, aunque la forma monoesterificada es la más afectada. Cuando se determinó la capacidad antioxidante, 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 adicionado al balanceado aporta AG 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 60 días. De esta manera los descartes de *P. muelleri* dada su abundancia, su riqueza en carotenoides y AG se convierte en una buena fuente de extracto rico en carotenoides para incorporar a alimentos balanceados. Aún restan los estudios *in vivo* que permitan evaluar la capacidad pigmentadora y efecto antioxidante del

aditivo sobre salmónidos. Además, en una etapa posterior se continuará con los estudios toxicológicos, microbiológicos, de estabilidad del alimento. de palatabilidad y biodisponibilidad.

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

Abreviaturas

A: Absorbancia

A[•]: Radical ascorbilo

AA: Ácido araquidonico

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

AG: Ácidos Grasos

ALA: Ácido α -linolénico

Ast: Astaxantina

Ast L: Astaxantina libre

Ast M: Astaxantina monoesterificada

Ast D: Astaxantina diesterificada

β -C: β -Caroteno

Col: Colesterol

Car: Carotenoides

DHA: Ácido graso docosapentaenoico

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

DMSO: Dimetil sulfoxido

EAG: Ácidos grasos esenciales

EPA: Ácido graso eicosapentaenoico

EPR: Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica

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

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

LA: Ácido linoleico

LR[•]: Radicales lipídicos

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

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

PUFA: Ácidos grasos polinsaturados

\bullet OH: Radical hidroxilo

RF: Relación de frente

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SFA: Ácidos grasos saturados

TAG: Ácidos totales grasos

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

1. Introducción

1.1. Acuicultura

Las distintas actividades humanas como la pesca indiscriminada de diferentes especies de peces, o el uso de contaminantes como agroquímicos que son vertidos en fuentes de agua dulce; los cambios de cursos de agua, entre otros, afectan los recursos acuáticos, y se refleja en muchos casos en la disminución de la población 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 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. La FAO presenta además en su informe SOFIA (2016) que los volúmenes de captura mundial se encuentran prácticamente estables desde el 2003 al 2014. Por esta razón es que las actividades de producción acuícola deben, en muchos casos, iniciarse o mejorarse para garantizar la calidad del alimento (FAO 2016; Luchini y Panné Hiudobro 2008).

Se considera que 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 alcanzó en 2016, 80 millones de toneladas. El consumo de pescado *per cápita* se encuentra en aumento desde 1970 a nivel mundial (FAO 2018). La Figura 1 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.

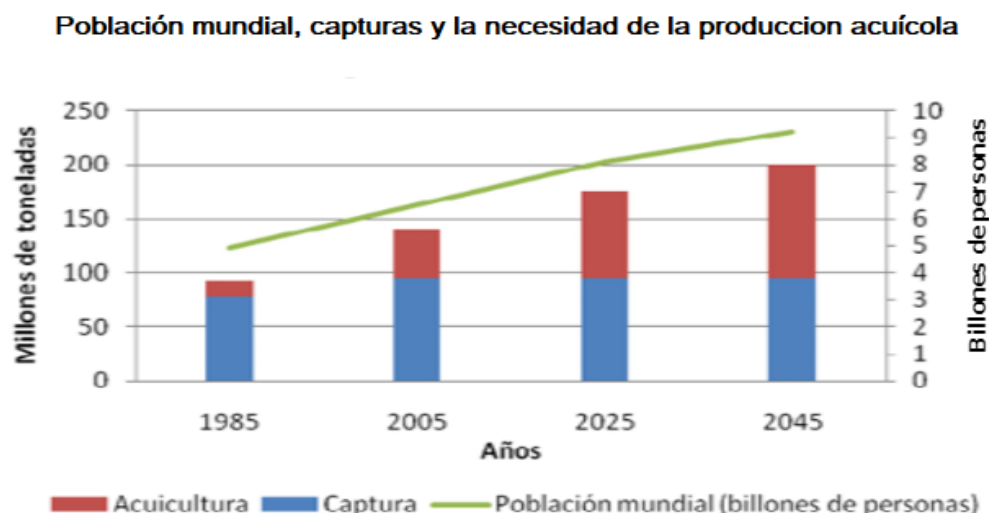


Figura 1: Estimación del consumo de pescado en base a la proyección del aumento de la población mundial. Tomado de: Luchini y Panné Hiudobro 2008

El crecimiento de esta actividad se debe a que el alimento tiene un factor de conversión bajo, aproximadamente 1-1,4 kg de alimento balanceado = 1kg de pez en salmones, pero para lograr estos valores es necesario contar una dieta de calidad, con los requerimientos proteicos y lipídicos necesarios ajustados a cada etapa del crecimiento y especie del pez (FAO 2016; Miller y col 2008). 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 de incipiente desarrollo y consiste principalmente en peces de agua dulce, trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) en la Patagonia y pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en el norte del país (Figura 2). Durante el período 1992-2007 el crecimiento promedio anual alcanzó un 16,6%, siendo el total de producción de la actividad acuícola de 3014 ton para el año 2007 y de 3681 ton en el año 2015, en donde se registró una disminución respecto al año 2014. En cuanto a la producción de truchas arcoíris alcanzó en 2007 las 1800 ton.

En general los cultivos de trucha se realizan en agua dulce, aunque en Patagonia se conocen cultivos en agua salada en la localidad de Camarones, Puerto Madryn y Tierra del Fuego. 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 (FAO 2014a; FAO

2014b; Choubert y col 1999). A esta causa se le atribuye las disminuciones registradas en la producción en años como el 2015.

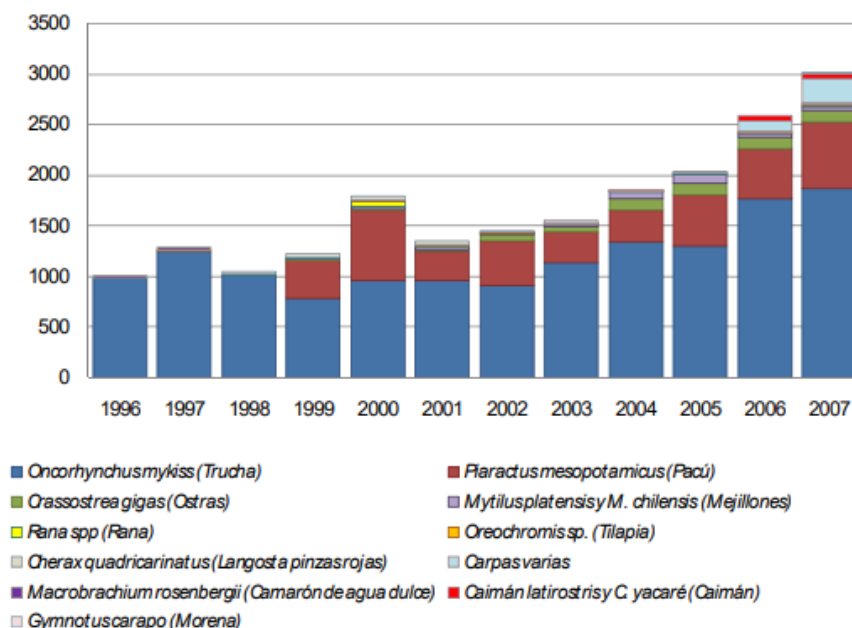


Figura 2: Principales especies cultivadas en Argentina. Tomado de: Luchini y Panné Hiudobro 2008

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 carotenoides 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, solo astaxantina y 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).

1.2. 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 manual de cultivo e trucha 2014). Los alimentos balanceados tienen entre sus ingredientes aceites de distintos orígenes, ricos en ácidos grasos (AG) con distintos grados de insaturación. En el caso del alimento balanceado con aceite de pescado, estos aportan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), 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 AG, 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).

Los peces tienen requerimientos de nutrientes que varían según la especie y la etapa del ciclo de vida en el que se encuentre. En 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 (AGE) 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 3) y n 6.

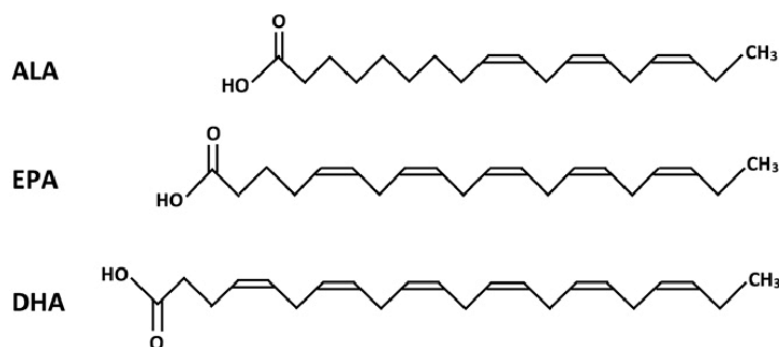


Figura 3: Estructura de ácidos grasos insaturados α -linolénico (ALA), eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA).

Los peces de agua dulce necesitan incorporar en la dieta ácido linoleico (LA) y ALA y a partir de estos pueden suplir sus requerimientos de EPA, ácido araquidónico (AA) y DHA (Figura 4). 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 AGE en la dieta por su estrecha relación con la respuesta inmune. La deficiencia de AGE 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).

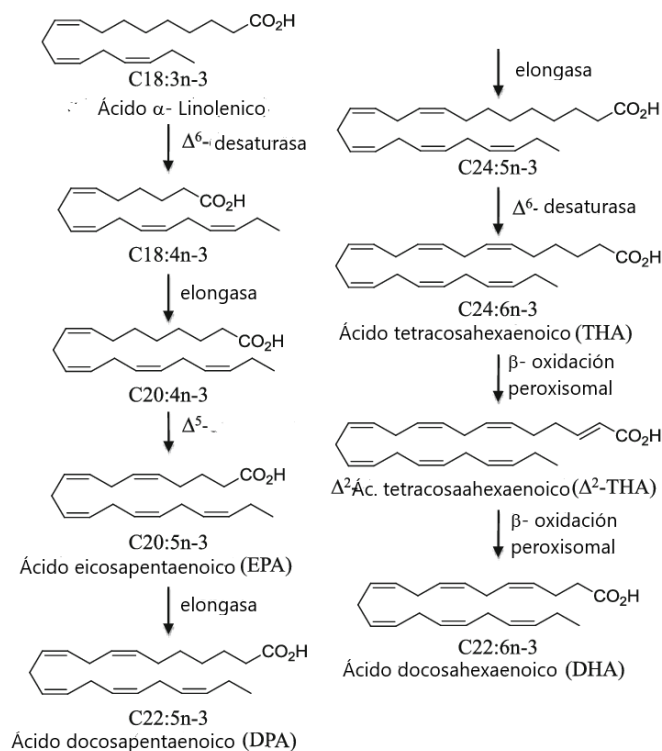


Figura 4: Rutas de bioconversión de ácidos grasos y prostaglandinas. Tomado y modificado de: https://www.researchgate.net/figure/Metabolic-pathway-of-bioconversion-of-n3-polyunsaturated-fatty-acids_fig1_49968411

Los AG son moléculas formadas por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxílico. En animales los AG contienen entre 14 a 22 carbonos y pueden presentar de 1 a 6 dobles enlaces (Christie 1990). Los AG pueden encontrarse libres o esterificados. Cuando la unión es al glicerol pueden formarse los mono-, di- o triglicéridos. De acuerdo al grado de insaturación que presentan, pueden clasificarse como ácidos grasos saturados (SFAs), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) (Rubio - Rodriguez y col. 2010). Los MUFAs 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 PUFAs, contienen de 2 a 6 insaturaciones. Tanto los MUFAs como los PUFAs 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 $\omega 9$, $\omega 6$ y $\omega 3$ (Christie 1990).

Otro de los lípidos de interés en nutrición es el colesterol, que se encuentra dentro del grupo de los esteroides (Figura 5). 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).

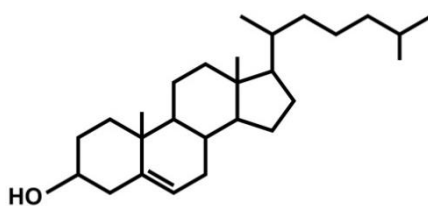


Figura 5: Estructura del colesterol.

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 (Stahk 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 6 muestra la estructura de algunos carotenoides de importancia en distintas industrias.

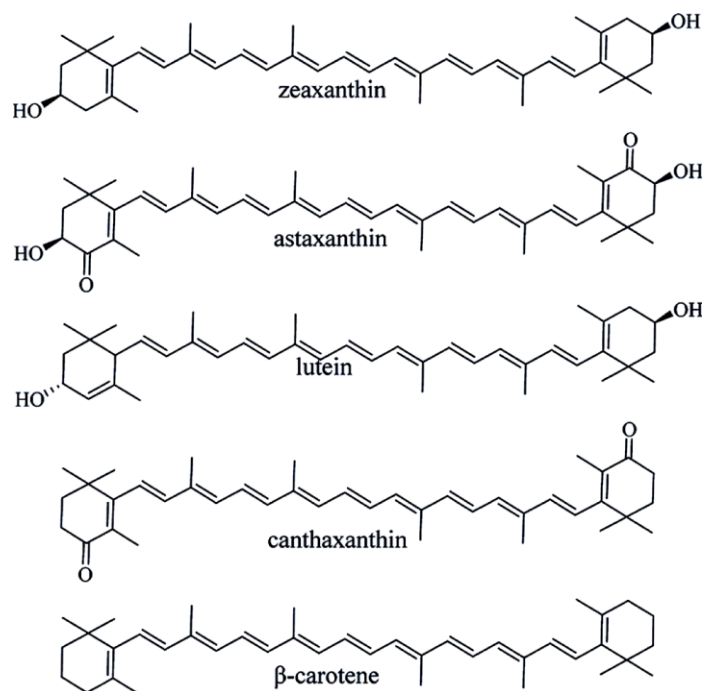
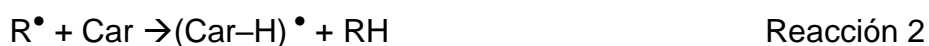


Figura 6: Estructura química de algunos carotenoides. Tomado de Agbozo y col 2018

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).



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

La astaxantina cumple variadas funciones en los peces contribuye al correcto desarrollo del embrión y a la reproducción en los peces, dado que protege a las células del daño oxidativo (Higuera- Ciapara y col. 2004, García- Chavarría y Lara-Flores 2013). Por algunos peces, la astaxantina es utilizada como protección

ante los depredadores, les permite camuflarse, y también es importante en el reconocimiento, comunicación y comportamiento sexual (Amaya y Nickell 2015, García- Chavarría y Lara-Flores 2013). Durante el proceso de maduración sexual el contenido de carotenoides disminuye en músculo y se concentra en la piel en machos y ovarios en 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 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 (Satoh 2016). En humanos es utilizada como suplemento dietario por su capacidad antioxidante (Higuera-Ciapara 2004).

La astaxantina es un pigmento carotenoide perteneciente a las xantofilas, dado que posee en su estructura química oxígeno (Figura 7A). 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, calor y acción de los rayos UV, efectos que provocan la isomerización de la molécula (Choubert 1999; Latscha 1989; Higuera-Ciapara 2004, Amaya y Nickell 2015). 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 diesterificada (Figura 7B y C). La astaxantina también puede encontrarse unida a proteínas como se encuentra en algunos crustáceos formando crustacianinas, las mismas de color azul, 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).

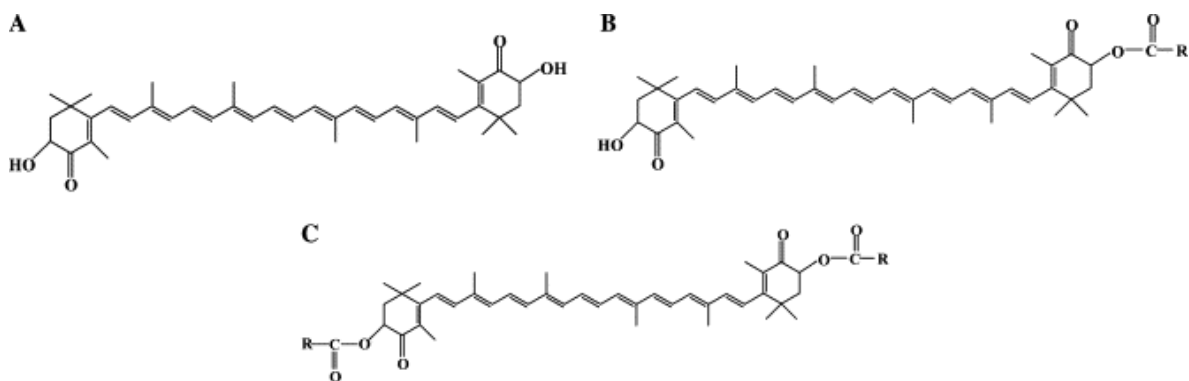


Figura 7: Formas de astaxantina. A: libre; B: monoesterificada; C: diesterificada.

Debido a las características mencionadas anteriormente, como pigmento y antioxidante, la astaxantina tiene importancia en diferentes industrias, como nutraceútica 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 (Goswami y col. 2015, Amaya y Nickell 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 y consiste en una mezcla de los isómeros (3S, 3S), (3R, 3S), and (3R, 3R) en proporciones 1:2:1 respectivamente (Higuera –Ciapara 2006; Takeungwongtrakul y col 2013; Kandra y col. 2017). Existe en el comercio 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 (Amaya y Nickell 2015; Choubert 1999). Entre los productos comerciales se encuentra el Carophyllpink® de la empresa DMS nutritional products, que es en el país la más utilizada.

Existen reportes del agregado de astaxantina natural de distintas especies de algunas 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 ácidos grasos poliinsaturados 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 puede considerarse como fuente de astaxantina natural los descartes del procesamiento de dichos organismos y como materia prima barata para la obtención de alimentos balanceados (Sindhu y Sherief 2011; Morales y Calvo 1987). 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).

Como se mencionó anteriormente los crustáceos son uno de los principales productos de la pesca en nuestro país y la región. En la Figura 8 se muestran las especies que se capturan en mayor proporción en Patagonia son el langostino (*P. muelleri*) y la centolla (*L. santolla*). El procesamiento de estas especies genera grandes cantidades de descartes que constituyen miles de toneladas anuales (Minagri 2018a; Minagri 2018b; LLadser y col. 2014). Gran parte de estos descartes consisten en cáscaras y caparazones (exoesqueleto).

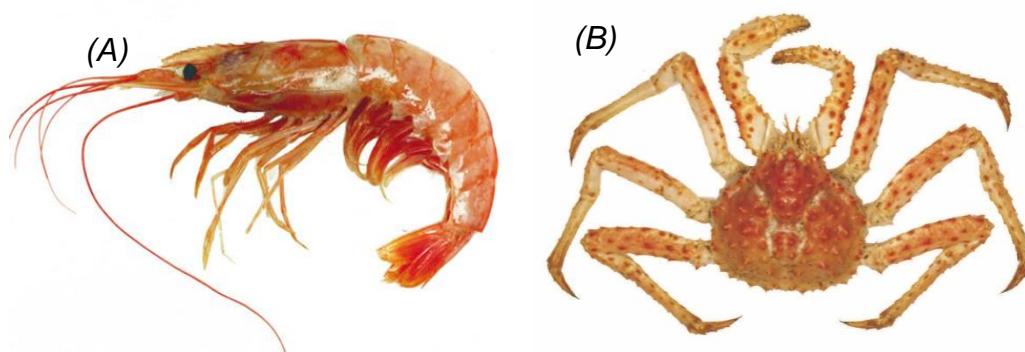


Figura 8: *Pleoticus muelleri* (A), *Lithodes santolla* (B).

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 (pereion), telson y uropodos (Figura 9). Las cáscaras incluyen cáscaras de cola, telson y urópodos. Se estima que el residuo completo constituye un 70% y que las cáscaras un 50% en peso del langostino

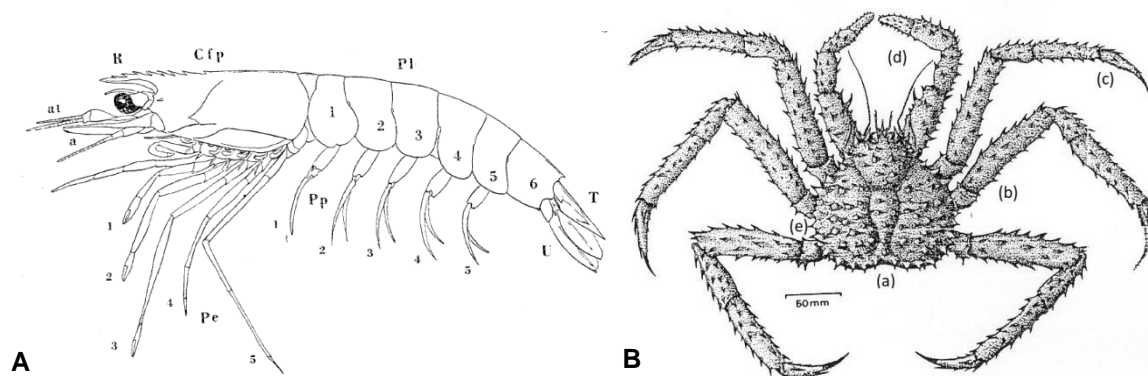


Figura 9: A Diagrama del cuerpo de *P. muelleri*. Tomado de Boschi, 1962. B. Diagrama del cuerpo de *L. santolla*. <https://alchetron.com/Lithodes-santolla> CfP cefalopereion, PI (pereion), T telson, U uropodos. (a) caparazón, (b) brazos y piernas, (c) puntas, (d) pinzas, (e) hombros

El porcentaje de descarte que se genera del procesamiento de *L. santolla* es muy variable, oscilando entre un 12-80% aproximadamente del peso, según el producto (Boschi 2016). El residuo completo está formado por partes duras y blandas. Las partes duras incluyen caparazones, cáscara de brazos y piernas, hombros, puntas y pinzas.

Las principales especies de pesca marina en Argentina se presentan en la Figura 10. Los volúmenes de captura del *P. muelleri* se encuentran en aumento en la última década y lo convierte en la principal especie de captura. Durante el 2017 la pesca alcanzó las 243.245 toneladas (ton), de las cuales 183.291 ton se exportaron a distintos países. Del volumen de *P. muelleri* exportado 119.770 t fueron en la forma de langostino entero mientras que el resto aproximadamente 60.000 toneladas son procesadas en planta para producir cola con cáscara o cola

sin cáscara (Minagri 2018a; Minagri 2018b). En cuanto a la *L. santolla* el volumen de captura total de *L. santolla* fue de 2.288 ton, de este total, 1.328 toneladas se exportaron en forma de patas con carne (Minagri 2018a; Minagri 2018b).

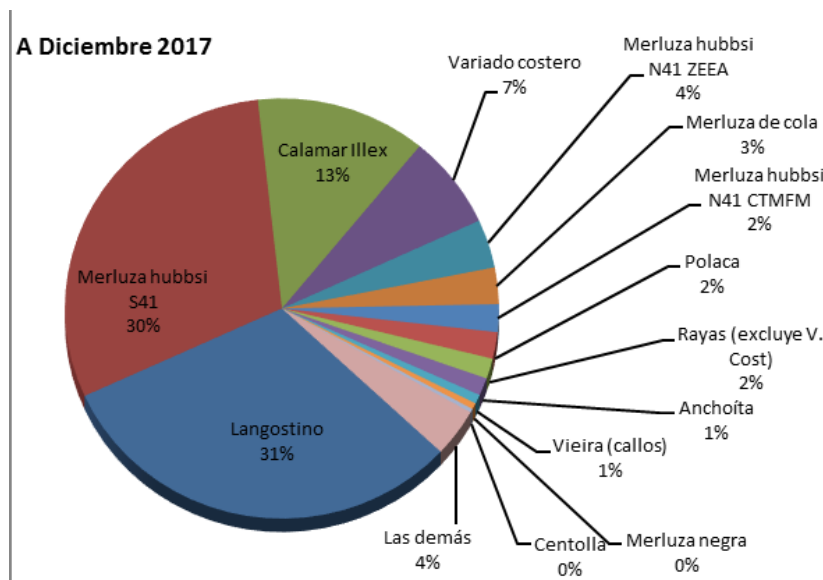


Figura 10: Principales especies de la pesca marina en Argentina. Tomado de Minagri 2018b

1.4. Uso de astaxantina como antioxidante

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los organismos vivos se produce como 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 O_2 consumido por los organismos vivos llevan a la formación de ROS a través de la reducción parcial del O_2 con la adición univalente de un electrón. Esta reducción parcial del O_2 produce especies como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies son inestables y reaccionan rápidamente con otros grupos o sustancias en las células y tejidos dañándolos (Je y col. 2003; Halliwell 2006; Pospíšil 2009). Cuando se produce un desbalance entre la concentración de ROS y el sistema antioxidante se produce lo que se denomina estrés oxidativo (Sanchez- Moreno 2002). 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 $\bullet\text{OH}$, 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 .

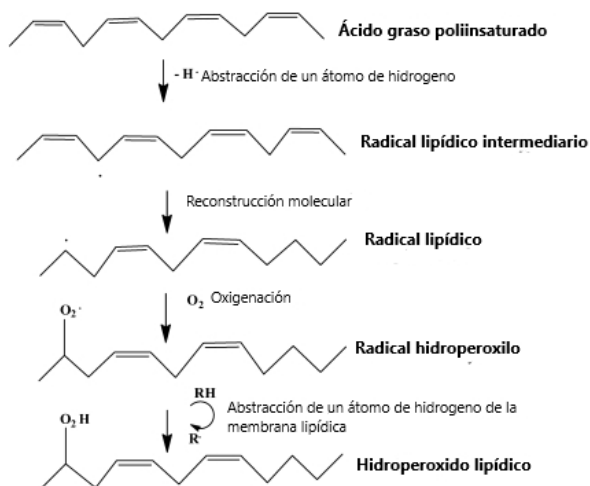


Figura 11: Reacciones de peroxidación de ácidos grasos. Tomado y modificado de: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2607004_FNR-51-048-g001&req=4pasar

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

La astaxantina es un potente antioxidante y tiene la capacidad de atrapar radicales libres. Los mismos son especies que contienen uno o más electrones desapareados (Sanchez- Moreno 2002). Los radicales libres se generan por numerosos mecanismos, tanto en sistemas vivos como no vivos (Je y col 2003). 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} inhiben la formación de ROS, producidos por la reacción de Fenton (Focsan y col 2017).

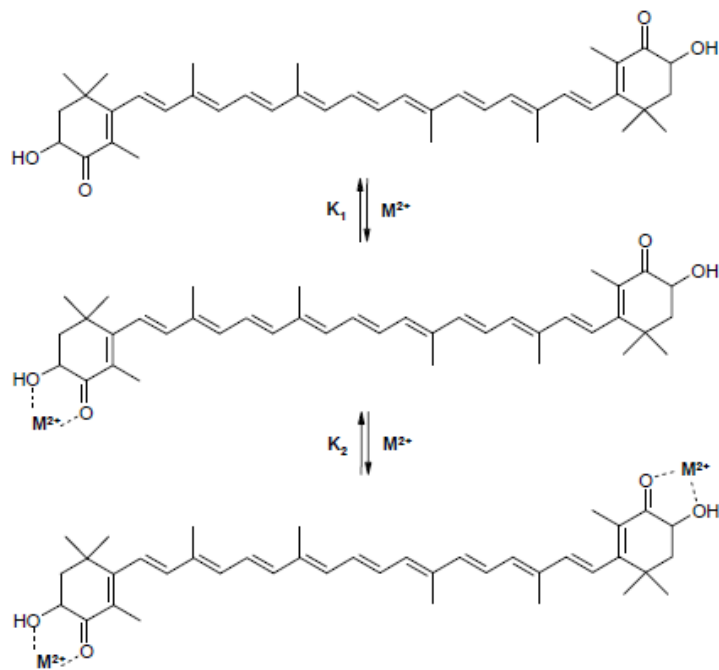


Figura 12: Complejos de astaxantina con metales divalentes (M^{2+}).

1.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante.

Los radicales 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 (Malanga y col. 2012, Kispert y col. 2004). 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 reciben el nombre de atrapadores, que generalmente son especies reactivas que secuestran radicales libres en matrices no-reactivas (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 nitróxidos o nitrona-derivados que reaccionan con biomoléculas lábiles (Borbat y col. 2001). Para determinar $\cdot\text{OH}$ o $\text{LR}\cdot$, a temperatura ambiente, generalmente se emplean atrapadores de espín.

Otro método ampliamente utilizado para medir la capacidad antioxidante tanto de sustancias puras, extractos o drogas es la determinación de la Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC). Es un método muy utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos y productos naturales (Zapata y col 2014, Dudonne y col 2009, Huang y col 2005). 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 ($\text{ROO}\cdot$) 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 (Zapata y col 2014, Dudonne y col 2009, Huang y col 2005). La sonda fluorescente utilizada es la fluoresceína. A medida que avanza la reacción la fluorescencia disminuye su intensidad, pero en presencia de un antioxidante se ve inhibida. 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 (Sanchez-Moreno 2002).

1.5. 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 es 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 (Sachindra 2006; Chunua

y col. 2006; Parjikolaei y col. 2015; Sanchez-Camargo y col. 2011; Nianmuy y col. 2008). 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 materiales, como microalgas (Goto y col. 2015), levaduras (Chunua y col. 2006), crustáceos (Nianmuy y col. 2008) y sus restos (Sachindra 2006; Parjikolaei y col. 2015; Sanchez Camargo 2011). Sin embargo, este método que utiliza solventes orgánicos ha quedado restringido solo 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 (2015) utiliza aceite de girasol, y metilesteres del mismo; Pu (2010) utiliza 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 (Sanchez Camargo y col. 2011; Goto y col. 2015). Como desventaja de esta extracción se puede mencionar que se requiere del equipamiento especial y de altos costos.

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

La astaxantina al igual que el resto de los 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 (Britton 1995; Nianmuy y col. 2008; Blanco y col. 2007, Yuan y col. 2013). 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 (Vakareloba y col. 2017). Existen reportes sobre estabilidad de la astaxantina obtenida a partir de descartes de crustáceos, principalmente de diferentes especies de langostinos (Ahmed y col. 2015; Bustamante y col 2016; Guillou y col.

1995;) y de la influencia en la estabilidad de los AG acompañantes (Gómez-Estaca y col. 2017).

Hipótesis y objetivos

Los descartes constituyen serios problemas ambientales y considerando los compuestos de valor agregado pueden ser utilizados en la fabricación de alimentos balanceados (Kandra y col. 2012). Este trabajo se focalizará 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 pescado, la cual adicionada al alimento balanceado mejorará la pigmentación y prevendrá la oxidación de lípidos de peces en cultivo locales.

Objetivo General:

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. Esto contribuirá a disminuir la contaminación local originada por la eliminación de residuos de la industria procesadora de pescados y mariscos.

Objetivos específicos

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

Objetivo 2: Obtener un extracto de langostino 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: Obtener y caracterizar alimentos balanceados con y sin suplementación con extracto de *P. muelleri*. 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 “B/P El Gauchito” y las de centolla por el Dr. M. Varisco, Instituto de Desarrollo Costero. 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*. En todos los casos, una vez en el laboratorio, el material 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 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).

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: Diferentes condiciones para almacenamiento de residuos.

	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

2.2. Preparación de los extractos

Se realizaron tres extracciones sucesivas, utilizando acetona-metanol (7:3) como solvente (Britton 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 extracto fue obtenido por gravimetría.

2.3. 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.

	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: Alimentos balanceados preparados.

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

2.4. 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 corresponden a muestreos de marzo de 2014, marzo de 2015 y marzo de 2018.

2.4.1. Humedad

Se pesaron 5,0 g en 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 estufa de secado y cultivo (FAC, Argentina), y 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.

2.4.2. Cenizas

Se pesaron 2,00 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.

2.4.3. Nitrógeno total.

Se pesó 1,0 g de muestra en un balón Kjeldahl, 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.

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

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.

2.4.4. Quitina

Para esta determinación se pesó 1,0 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.

2.4.5. 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).

2.5. Ácidos grasos (AG)

La determinación de AG fue realizada en los residuos, el extracto, las fracciones ricas en astaxantina y las dietas de acuerdo a Lepage y Roy (1984), por transesterificación directa. Se utilizó como estándar interno ácido heptadecanoico C17:0 (MP Biomedicals, LLC. Illkirch, France). El perfil de ácidos grasos 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 ácidos grasos 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 hidrogeno, como gas carrier a flujo constante (100kPa ml/min). Se utilizó un programa de temperatura con 120°C de temperatura inicial, 1 min. La temperatura se incrementó 10°C/min hasta alcanzar los 160°C, luego 3°C/ min hasta 200°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 240°C. La identificación de los ácidos grasos se realizó frente a un patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco Inc., Supelco Park, Bellefonte, USA).

2.6. 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 1ml 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 acetoneitrilo- Isopropanol (55:45) Como estándar externo y para la construcción de la curva de calibración se utilizó colesterol comercial (Fluka 99% pureza).

2.7. Carotenoides

Extracción

Para la determinación de carotenoides totales, 3 g de muestra fueron extraídos a temperatura ambiente utilizando acetona-metanol (7:3) como solvente (Britton 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 se resuspendieron en acetona, realizando las diluciones necesarias para lograr una correcta medición espectrofotométrica ($A < 1$). La cuantificación se realizó frente a una curva de calibración patrón de astaxantina (Sigma Aldrich, 92% pureza, Alemania), utilizando un $\epsilon_{477\text{nm}} : 2177,4 \text{ 100 ml. g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (reporte técnico, Aquaresearch 1999).

Cromatografía en placa delgada

Las cromatografías en placa analítica y preparativas realizadas al extracto de *P. muelleri* fueron realizadas sobre 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, ácido graso (heptadecanoico) y carotenoides (astaxantina y β -caroteno). El acetato de etilo fue una modificación a la técnica propuesta por Sanchez-Camargo y col. (2011) que fue utilizada como referencia. Para la separación preparativa, aproximadamente 50mg de extracto disueltos en cloruro de metileno fueron sembrados en línea. El análisis se realizó en 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), posterior filtración y eliminación del solvente por evaporador rotatorio.

Análisis de AG

Las bandas coloreadas obtenidas de la cromatografía en placa delgada preparativa fueron saponificadas y posteriormente se extrajeron los AG de acuerdo

a lo propuesto por Sachindra y col. (2005). Los ésteres metílicos obtenidos se separaron cromatográficamente tal como fue descrito en la sección ácidos grasos.

2.7.1. Astaxantina

Para la determinación de astaxantina 0,02 -0,3 g de extracto fueron disueltos en 25ml 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 rediseñado 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: 1ml/ min, 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 fue necesario 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 Gomez Estaca, 2017

2.8. Capacidad antioxidante

2.8.1. Espectroscopía de resonancia paramagnética

La capacidad antioxidante se determinó por EPR. 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.

2.8.1.1. Generación de radicales lipídicos (RL \cdot)

Los RL \cdot fueron generados por dihidrocloruro de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH) cuya estructura puede observarse en la Figura 13A. La

mezcla de reacción conteniendo 10 mM α -(N- Oxido de 4-Piridil)-N-tert-butilnitrona (POBN) Figura 13B, 10 mM AAPH y distintas concentraciones del extracto fue incubado durante 30 min a 37°C y luego transferido a una pipeta Pasteur y 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, receptor 2×10^4 (Jurkiewicz y Buettner 1994). La cuantificación del aducto de spin fue realizada usando una solución acuosa de 2,2,5-tetrametil piridina 1-oxyl (TEMPO), su estructura química se representa en la Figura 13 C. El espectro EPR fue registrado para muestras y soluciones de TEMPO, empleando las mismas variables de ajuste del equipo y se calculó la primera derivada del espectro EPR según Kotake y col. (1996).

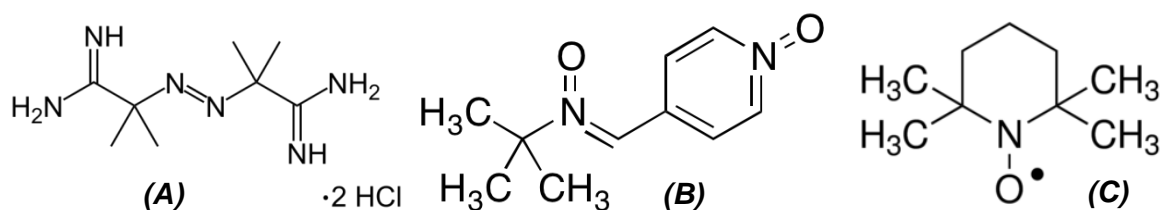


Figura 13: Estructura químicas de (A) AAPH, (B) POBN, (C) TEMPO.

2.8.1.2. Producción de radical hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$)

El N-oxido de 5,5-Dimetil-1-pirrolin (DMPO) (Figura 14) 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 100 mM DMPO, 10 mM H_2O_2 , 10 mM Fe^{+2} y 50 mM de solución reguladora de fosfato de potasio (pH 7,4), incubada durante 3 min a temperatura ambiente y fue transferido a una pipeta Pasteur para 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.

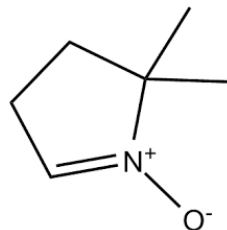


Figura 14: Estructura química DMPO.

2.8.1.3. Detección de radical ascorbilo (A^\bullet)

Un espectrómetro Bruker ECS 106 fue usado para la medida de A^\bullet . Ácido ascórbico (60 mM) fue suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) la Figura 15 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, tiempo 655 ms, receptor 1×10^5 , frecuencia 9,81 Ghz, velocidad de scaneo 0,18 G/s (Giulivi y Cadenas 1993). La cuantificación fue realizada según Kotake y col. (1996).

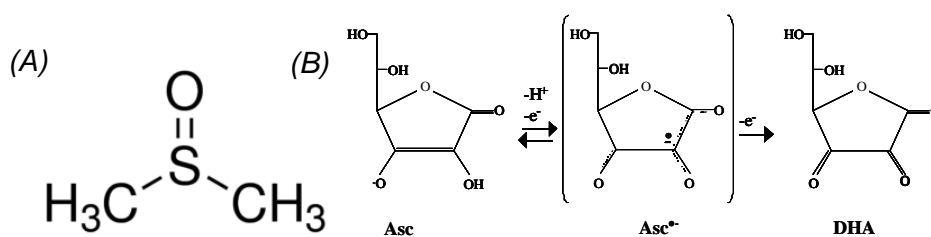


Figura 15: (A) Estructura química DMSO, (B) reacción de formación del radical ascorbilo.

2.8.2. Ensayo de la inhibición de la oxidación de fluoresceína (ORAC)

Para realizar el análisis de la capacidad de absorber radicales del oxígeno en alimentos balanceados y extracto, se prepararon las siguientes soluciones: Buffer fosfato 75mM pH7,0, Fluoresceína 10 μ M, ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcromano-2- carboxílico (Trolox) 200 μM , AAPH 275mM, 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 19 A y B respectivamente. En una microplaca de 96 pocillos, se prepararon las soluciones. Se realizó la medición de la fluorescencia emitida cada 60 segundos 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

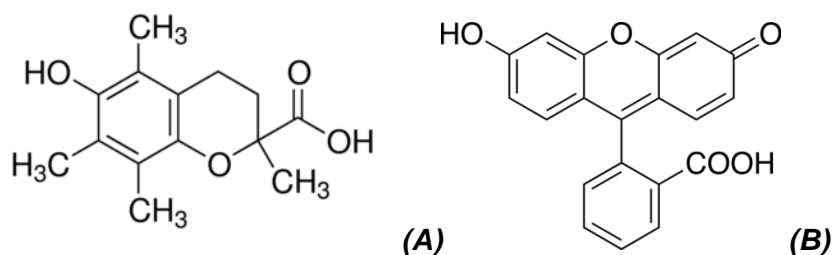


Figura 16: Estructura química de la fluoresceína (A) y trolox (B).

2.9. 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 (SAGy P) 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 17. Los cálculos de volumen de descartes de *P. muelleri* se llevaron a cabo teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por LLadser y col. (2014). Se considera que las cáscaras representan un 40% del peso del

langostino y que solo 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 tuvieron en cuenta los volúmenes de captura de la flota de costeros y centolleros que desembarca en los puertos patagónicos. De acuerdo a Boschi 2016 solo lo que se captura por la flota costera es procesada en tierra. El mismo autor sugiere que la producción de clusters (producto más común del procesamiento de la centolla) produce entre un 75-70% del peso del animal en descartes.

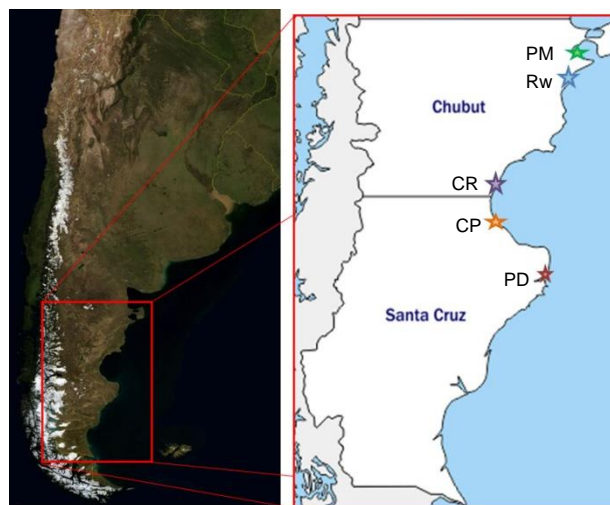


Figura 17: Mapa de la región considerada en el estudio de disponibilidad de biomasa.

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

2.10. Estadística

Todos los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar de tres (3) réplicas por muestra. Se utilizó Microsoft office Excel para Windows 10. Se utilizó Past 3.17. Øyvind Hammer Natural History Museum University of Oslo, para realizar los análisis estadísticos ANOVA, Test de Student y Test de Tukey, el MANOVA, y multifactorial en los experimentos de composición centesimal, ácidos grasos acondicionamiento de muestra y estabilidad de carotenoides y distintas formas de astaxantina. El análisis estadístico para los experimentos de capacidad antioxidante fue ANOVA de una vía y Test de Tuckey como test *a posteriori*. Se utilizó Statview para Windows, SAS Institute Inc., versión 5.0.

2.11.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 parones comerciales: ácido heptadecanoico C17:0 (MP Biomedicals, LLC. Illkirch, France), patrón de metilesteres de ácidos grasos (Supelco Inc., Supelco Park, Bellfonte, USA), colesterol (Fluka), astaxantina (Sigma – Aldrich, 92% pureza, Alemania),

3. Resultados

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

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización del material de descarte -cáscaras - proveniente del procesamiento industrial de langostino (*P. muelleri*) y centolla (*L. santolla*). Los parámetros evaluados fueron: composición proximal, perfil y cuantificación de ácidos grasos, contenido en colesterol y carotenoides totales. Se realizó también el análisis de disponibilidad de descartes de ambas especies.

3.1.1. Composición proximal

La Tabla 4 presenta la composición de cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*. La centolla *L. santolla* mostró un contenido significativamente mayor de humedad, y cenizas. Las cáscaras de *P. muelleri* presentaron un porcentaje significativamente mayor lípidos y nitrógeno total. El porcentaje de lípidos en *P. muelleri* fue ocho veces mayor al obtenido en cáscaras de *L. santolla*. A partir de conocer el nitrógeno correspondiente a quitina y el %N total, se pudo estimar el contenido de proteínas. Para *P. muelleri* el porcentaje de proteínas fue de 20,0%, mientras que, el de *L. santolla* fue: 18,1%.

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 ^a	56,8 ± 0,5 ^b
CC BS (g· 100g⁻¹)		
Lípidos	4,0 ± 1,9 ^a	0,5 ± 0,2 ^b
%N total	5,1 ± 0,1 ^a	3,7 ± 0,1 ^b
Cenizas	47,6 ± 1,3 ^a	54,6 ± 0,8 ^b
Quitina	19,5 ± 0,2 ^a	19,9 ± 3,5 ^a
%N Quitina	0,9 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,2 ^a

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

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$)

3.1.2. Ácidos grasos (AG)

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

Tabla 5: Perfil de AG en cáscaras de *P.muelleri*.

AG	% 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 AG identificados.

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

Tabla 6: Perfil de AG 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. N.D.: no detectado

Concentración: mg· 100g⁻¹ en base seca

Abundancia relativa: porcentaje relativo de los AG identificados

Las cáscaras de *L. santolla* presentaron mayor riqueza en SFA. El C16:0 es el AG que se encontró en mayor porcentaje, representando un tercio de la totalidad de los AG. 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 AG. Respecto al cociente PUFA/SFA *P. muelleri* dobla al valor obtenido en *L. santolla* (Tabla 7).

Tabla 7: Contenido de ácidos grasos totales e indicadores de calidad de AG, en cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

	<i>P. muelleri</i>	<i>L. santolla</i>
TAG	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. N.D.: no detectado

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

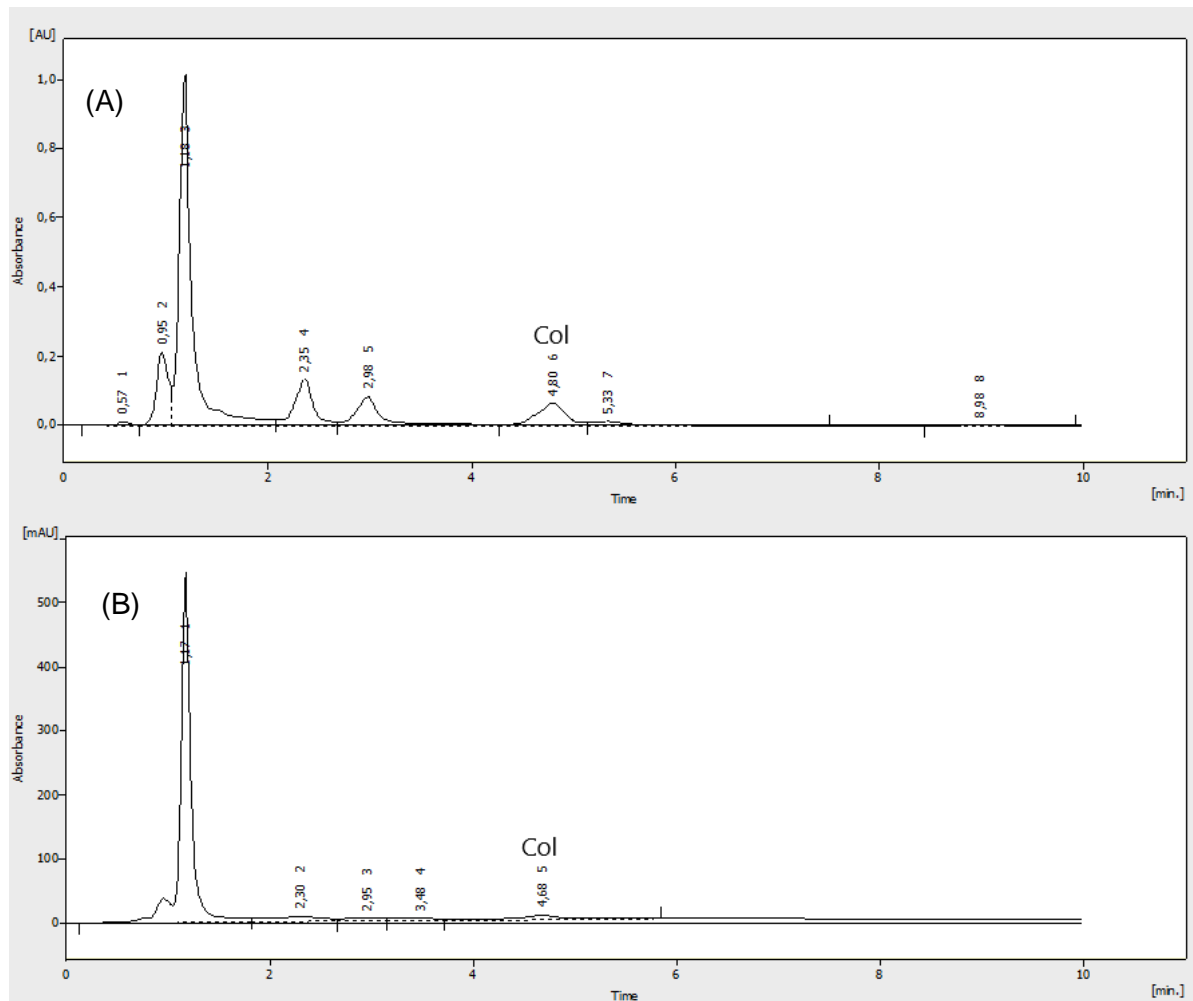


Figura 18: Espectros cromatográficos de HPLC correspondiente al colesterol. (A) En cáscaras de *P. muelleri*, (B) en de cáscaras de *L. santolla* Col: colesterol.

3.1.4. Carotenoides

El rendimiento de carotenoides presentó diferencias significativas entre ambas especies. *P. muelleri* alcanzó valores de aproximadamente el doble que *L. santolla* (Figura 19), estos valores fueron 7,31 y 4,44 mg· 100⁻¹ respectivamente.

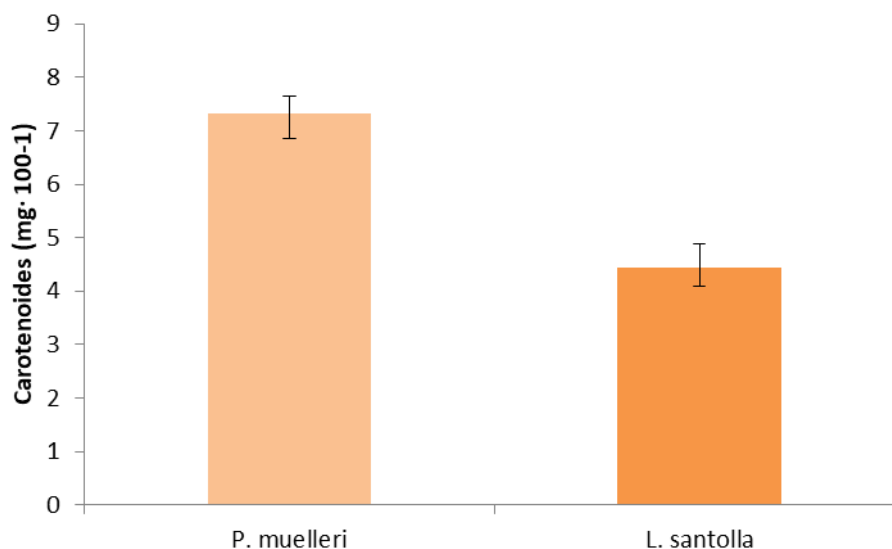


Figura 19: Carotenoides en cáscaras de *P. muelleri* y *L. santolla*.

(■) *P. muelleri*, (■) *L. santolla*.

La Figura 20 muestra las proporciones que representan cada lípido determinado, en el total de lípidos. Las cáscaras de *P. muelleri*, presentaron ocho veces el contenido de lípidos que las de *L. santolla*. 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 AG. En *P. muelleri*, los AG representaron el 54% de los lípidos, mientras que, en *L. santolla* solo el 41%. La proporción de colesterol fue muy similar en ambas especies, 8-10%. Los carotenoides, fueron la fracción que representó el menor porcentaje, inferior al 0,1% en ambas especies. En *L. santolla* este porcentaje de carotenoides triplicó al de *P. muelleri*.

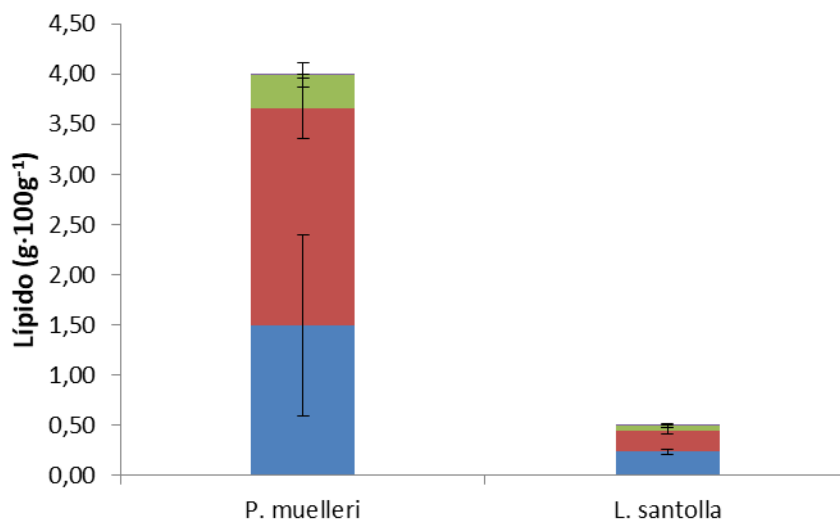


Figura 20: Caracterización de los lípidos totales en cáscara de descartes.

(■): Carotenoides, (■): colesterol, (■): ácidos grasos, (■): lípidos no identificados.

3.1.5. Disponibilidad de biomasa

Las Tablas 8 y 9 presentan los resultados del periodo comprendido entre los años 2008 al 2018, del análisis de la producción de descartes, a partir de los volúmenes de captura anuales de *P. muelleri* y *L. santolla*. 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 en el periodo analizado a los volúmenes de *P. muelleri*. 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.

Tabla 8: Disponibilidad de cáscara de *P. muelleri*.

Año	Total De captura (t)	Captura Fresqueros (t)	Procesado para colas peladas (t)	Cáscaras generadas país fresqueros (t)	Estimación captura en Patagonia	Captura Fresqueros en Patagonia	Procesado para colas en Patagonia (t)	Cáscaras generadas (40%)
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.

Así como difieren los volúmenes de captura entre estas especies, también difieren los volúmenes de descartes. En la tabla 8 se muestran los descartes (cáscaras) que se producen del procesamiento de *P. muelleri* tanto a nivel nacional, como en Patagonia, se observa que la mayor parte de los descartes se producen en esta región. En la tabla 9 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 producidos por los 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 50 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.

Tabla 9: Disponibilidad de cáscaras de *L. santolla*.

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	117	272	389
2009	325	282	313	289	19	122	141
2010	734	721	699	388	6	355	361
2011	3112	2875	3108	1878	21	1406	1437
2012	4522	4341	4501	2452	16	2159	2170
2013	4077	3968	3984	2204	210	1934	1984
2014	3448	3439	3219	2529	186	1587	1717
2015	4133	4134	3902	2196	1	2066	2067
2016	2521	2521	2521	1899	28	1241	1261
2017	2281	2281	1899	1328	13	1131	1141
2018	2336	2336	1702	1355	193	1031	1223

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

Los resultados se expresan en toneladas, en base húmeda.

A partir de los resultados obtenidos de la determinación de carotenoides, ácidos grasos, quitina, se puede estimar que para el año 2018 podrían haberse obtenido a partir de cáscaras de *P. muelleri* 328kg de carotenoides, 892 ton de quitina y 97 ton de ácidos grasos. Mientras que a partir de cáscaras de *L. santolla* 4kg de carotenoides, 17 ton de quitina y 0,2 ton de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a los descartes de *P. muelleri* para la obtención de extractos ricos en carotenoides.

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 puede presentar variaciones ligados 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 es importante determinar el contenido en carotenoides en los diferentes tipos de descartes (cáscaras y residuo completo). Asimismo, es importante evaluar el tratamiento previo de los descartes en el laboratorio hasta el momento de su utilización.

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

La Tabla 10 presenta la variación mensual del contenido de carotenoides en descartes de *P. muelleri*. El rendimiento en carotenoides fue variable en los distintos meses analizados, presentándose diferencias significativas, en los dos tipos de descartes estudiados. Los meses en los que en cáscaras se obtuvieron las mayores concentraciones fueron abril, junio y julio. Sin embargo llegando a la primavera y avanzado el verano (en los meses de noviembre, diciembre y febrero), el contenido es superior en el residuo completo. El contenido de carotenoides presentes en las cáscaras alcanza un máximo, superior al del residuo completo.

Tabla 10: Variación mensual de carotenoides en residuos completo de *P. muelleri*.

Mes	Cáscara	Residuo completo
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}

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

N.A. = no analizado.

* Rendimiento significativamente diferente al obtenido en los meses restantes en cáscaras. Tukey (p <0,05).

La Figura 21 es la representación gráfica de la variación mensual de carotenoides en los distintos descartes de *P. muelleri*. Se observó que en la mayoría de las oportunidades en las que se realizó la determinación 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 10,52mg· 100g⁻¹. Se determinó también que no existen diferencias significativas en el rendimiento promedio obtenido, entre cáscaras y residuo completo.

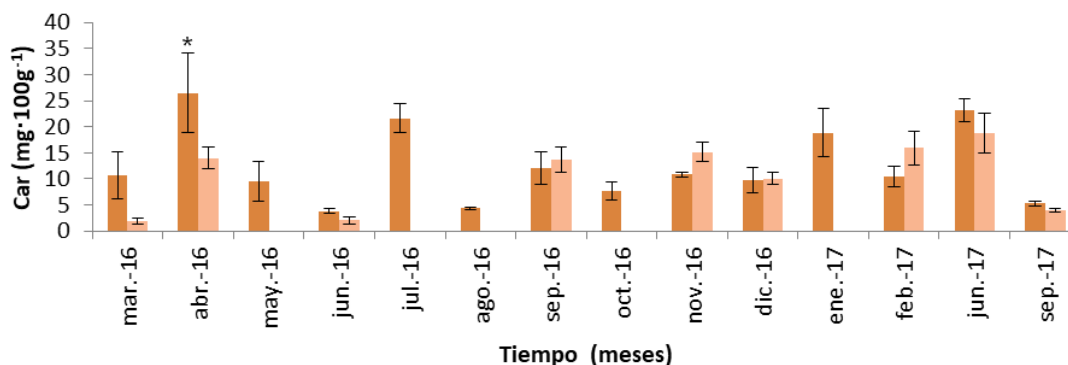


Figura 21: Variación mensual del contenido de carotenoides totales en cáscaras y residuo completo de *P. muelleri*.

Los resultados son expresados como promedio \pm desviación estándar ($n=3$), $\text{mg}\cdot 100^{-1}\text{g}$ de biomasa, en base húmeda.

(■): Cáscaras, (□): Residuo completo

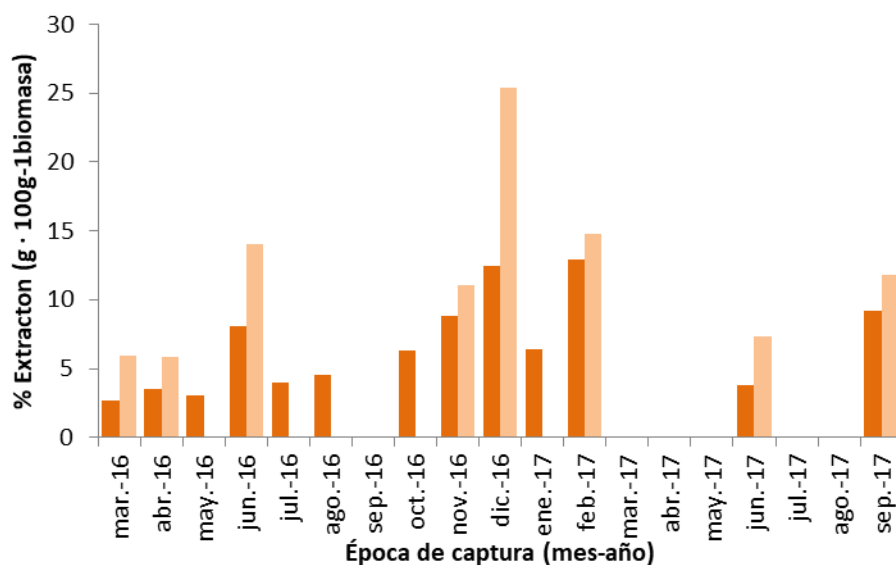
* Rendimiento significativamente diferente al obtenido en los meses restantes en cáscaras. Tukey ($p < 0,05$).

El rendimiento de extracto, como el porcentaje que corresponde a carotenoides en el mismo, presentó variaciones significativas en y entre ambos descartes, en los distintos meses 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 el mes de junio de 2016. El porcentaje de carotenoides en el extracto fue con excepción del mes de febrero, en todos los casos superior en extracto de cáscaras. Si bien el promedio mensual es diferente, la mediana de los carotenoides en ambos extractos no presenta una amplia diferencia (0,18 en cáscaras frente 0,14 de residuos). A pesar de que máximo de % carotenoides alcanzado en cáscaras dobla al máximo obtenido en residuos completos, no existen diferencias significativas cuando se comparan ambos descartes independientemente de la época.

Tabla 11: Rendimiento de extracto y porcentaje de carotenoides.

Mes	Cáscara		Residuo	
	% 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 ^{jr}
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 ^{gfr}	7,29 ± 1,54 ^{ady}	0,33 ± 0,06 ^{js}

La Figura 22 muestra el rendimiento en extracto en ambos descartes. El residuo completo presentó mayor rendimiento en todas las épocas de captura. En promedio el rendimiento obtenido de residuos es aproximadamente el doble, al obtenido de cáscaras (12,0 y 5,9%), siendo estas diferencias significativas.

**Figura 22:** Rendimiento de extracto.

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 ton de residuos completos. A partir de los promedios obtenidos de cada tipo de descartes de *P. muelleri* se estima que se podrían haber obtenido 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 AG en distintas épocas de captura

La variación del perfil y contenido en AG grasos en diferentes épocas de captura para ambos tipos de descarte se presenta en las Tablas 12 y 14.

El perfil de AG obtenido de los residuos varió ligeramente en las distintas épocas de captura. Los PUFA fueron los AG más abundantes. Tanto PUFA, como MUFA, presentaron diferencias significativas en los distintos meses.

Los componentes mayoritarios se marcaron en verde en las Tablas 12 y 14. Con excepción del C16:1 en el mes de septiembre en cáscaras, fueron los mismos en todas las épocas analizadas.

Tabla 12: Perfil de AG de 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. Los números a continuación del tipo de descarte corresponden al mes de la captura. N.D.: no detectado

%: porcentaje relativo de todos los AG identificado. TAG: mg· 100g⁻¹

Las diferentes letras (a,b,c) dentro de una misma fila indican diferencias significativas.

La tabla 13 presenta los resultados obtenidos de la cuantificación de AG totales y de los AG de importancia nutricional como los n3, n6, EPA y DHA, además de índices como n6/n3 y PUFA/SFA. Se observaron en todas determinaciones variaciones durante el año. En septiembre se obtuvieron valores superiores para todas las cuantificaciones realizadas. La determinación de AG mostró resultados variables a lo largo del año. Se obtuvieron en un amplio rango con una diferencia de hasta seis veces entre el valor mínimo el máximo. La cuantificación 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 AG n3 que exceptuando el mes de septiembre en todos los casos fue al menos diez veces superior al obtenido en n6. La cantidad de EPA y DHA obtenidas también fueron variables el valor máximo y, significativamente diferente, se cuantificó en septiembre donde alcanzó una concentración 8 veces superior a la mínima registrada en noviembre.

Tabla 13: Total de ácidos grasos e indicadores de calidad de ácidos grasos en residuo completo de *P. muelleri*

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
TAG	971,56 ± 46,29 ^a	2354,39 ± 68,75 ^a	850,53 ± 48,24 ^a	2741,87 ± 654,45 ^{ab}	4703,85 ± 791,86
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

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. Los números a continuación del tipo de descarte corresponden al mes de la captura. N.D.: no detectado

TAG: mg· 100g⁻¹

* y *Rendimiento significativamente diferente. Tukey (p <0,05).

El perfil de AG obtenido de las cáscaras de *P. muelleri* fue variable. Los PUFA fueron los más abundante excepto en septiembre donde su concentración fue la menor (Figura 7).

Todos los ácidos grasos presentan ligeras variaciones en el porcentaje en las distintas épocas de captura. Los componentes principales (marcados en verde) fueron los mismos en todos los meses.

Tabla 14: Perfil de AG de 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; res= residuo; cásc= cáscara. Los números a continuación del tipo de descarte corresponden al mes de la captura. N.D.: no detectado

%: porcentaje relativo de todos los AG identificado. TAG: mg· 100g⁻¹.

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 20:5n3 y 22:6n3 es superior en cáscaras con excepción del mes de septiembre.

El contenido de AG fue variable aunque dentro de un rango menor al que se presentó en residuos. Febrero fue el mes en el que el contenido 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 15).

Tabla 15: Total de ácidos grasos e indicadores de calidad de ácidos grasos en cáscaras de *P. muelleri*

	Mar-16	Jun-16	Nov-16	Feb-17	Sep-17
TAG	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}
n3	349,90 ± 24,71	420,62 ± 58,82	356,08 ± 69,71	625,37 ± 89,62	404,89 ± 184,4
n6	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; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; res= residuo; cásc= cáscara. Los números a continuación del tipo de descarte corresponden al mes de la captura. N.D.: no detectado

TAG: mg· 100g⁻¹

* Rendimiento significativamente diferente al obtenido en los meses restantes. Tukey (p <0,05).

A diferencia de lo observado en carotenoides, el contenido de AG es significativamente superior en residuos.

El porcentaje de AG en los extractos de ambos descartes fue variable, aunque en residuos esta variación fue mayor. En el extracto obtenido de cáscara los AG, representan entre un 8,5% a un 26%. En 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 más ricos que los extractos de residuo completo.

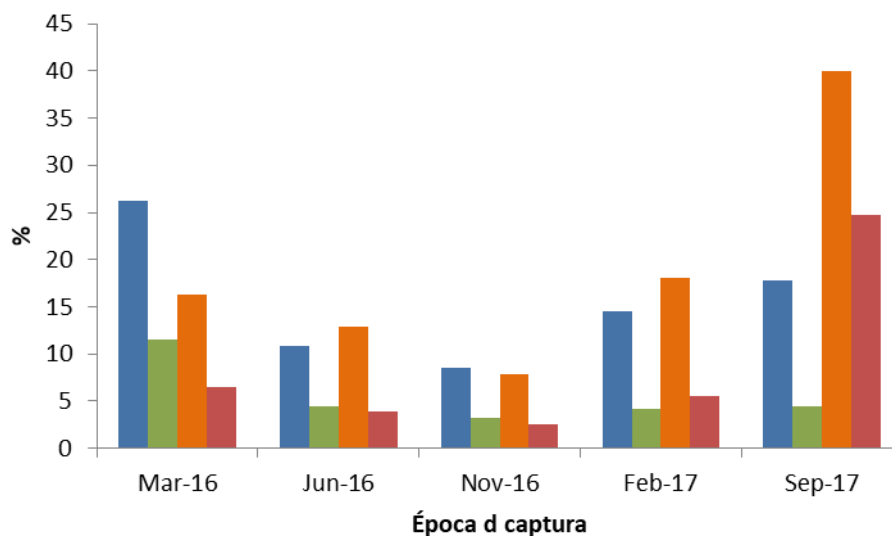


Figura 23: Proporción de AG y EPA+ DHA en extractos.

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

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 (7% humedad) o húmeda (57% humedad), siendo mayor el obtenido a partir de muestra húmeda (22 mg· 100g⁻¹ materia en base seca). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 16: 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 ^a	22,3 ± 0,8 ^b
CS	7,2 ± 0,1	8,1 ± 1,3 ^a	8,8 ± 1,4 ^b

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

Humedad expresada como g· 100 g⁻¹ de biomasa; carotenoides totales mg·100g⁻¹ de biomasa.

CH: cáscara húmeda; CS: Cáscara seca; CT: carotenoides. 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 su procesamiento, se determinó el rendimiento en el contenido de carotenoides en muestras que recibieron distinto tratamiento (oreado, y húmedas). Estas muestras se conservaron durante un periodo de tiempo de 80 días a diferentes temperaturas. Para evaluar su rendimiento se comparó los resultados con los obtenidos de un extracto obtenido inmediatamente al haber recibido el material. Este extracto recibió el mismo tratamiento de temperatura y tiempo que las cáscaras. La Tabla 17 presenta los resultados del ensayo.

Tabla 17: Acondicionamiento de muestra: concentración y porcentaje de conservación de carotenoides

	Día0	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 mojada 15°C; CH 5: Cáscara húmeda 5°C; CH -20: Cáscara mojada -20°C; CS 15: Cáscara seca 15°C; CS 5: Cáscara seca 5°C CS -20: Cáscara seca -20°C; ES 15: Extracto 15°C; ES 5: Extracto 5°C; ES -20: Extracto -20°C.

El contenido de carotenoides disminuyó en todas 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 100% cuando el extracto se conserva en freezer a -20°C. Sin embargo, se obtienen buenos rendimientos también cuando se almacena las cáscaras secas a -20°C, dado que se conserva el 96% del contenido en astaxantina en el día 80.

El análisis multifactorial ANOVA, indico que existe interacción entre la temperatura, el periodo de tiempo almacenado y el tratamiento que haya recibido la muestra hasta el momento de utilizarlo ($p < 0,05$).

3.2.5. Comportamiento cromatográfico del extracto.

Los resultados de la cromatografía en placa se muestran en la Figura 25. Se separó en sus distintos componentes tanto el extracto de cáscaras como el de residuos. 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 para astaxantina monoesterificada (Rf 0,3) y diesterificada (Rf 0,61), según lo indica la literatura (Sanchez-Camargo y col 2011). Como consecuencia del revelado con vainillina, se observa la aparición de una banda con Rf 0,38 coincidente con el patrón de colesterol.

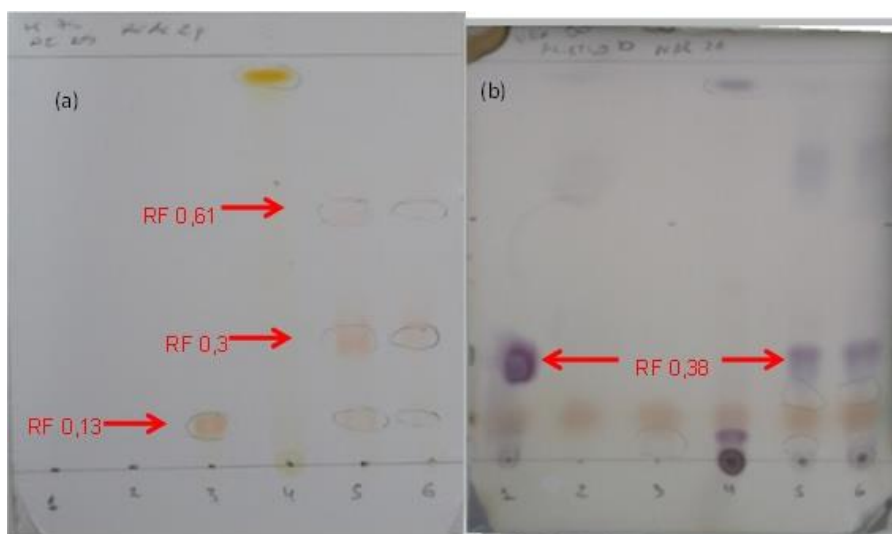


Figura 24: Cromatografía en placa al extracto obtenido de cás y cáscaras de *P.muelleri*. (a) sin revelar; (b) posterior al revelado con vainillina.

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

La cromatografía en placa delgada, la aparición de otra banda coloreada que indique la presencia de otro tipo de carotenoide, como β - caroteno, por ejemplo. 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 la inyección de cada una 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 AG en las mismas.

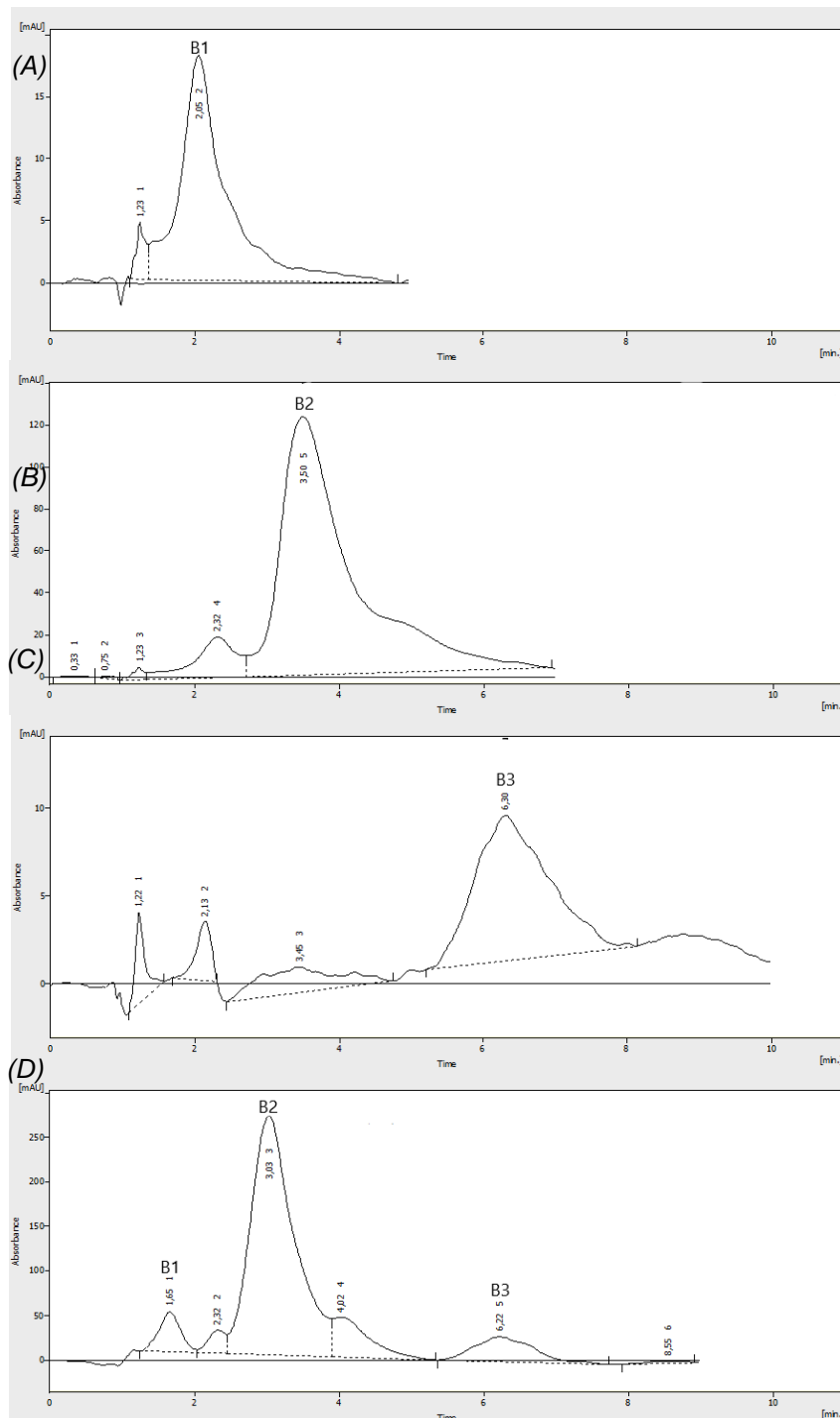


Figura 25: Perfil cromatográfico HPLC banda 1 Rf 0,13 (A), banda 2 Rf 0,3 (B), banda 3 Rf 0,61(C), perfil cromatográfico extracto de cáscaras de *P. muelleri*. (D).

B1: Banda 1, B2: Banda 2, B3: Banda 3.

La Figura 26 presenta los cromatogramas de las bandas obtenidas de la TLC. La banda 1 (Rf 0,13) presenta 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 26 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.

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 AG a las bandas se presentan en las Tablas 18 y 19. En la banda 2 los ácidos grasos más abundantes son los PUFA, el 22:6n3 en un 31%, el 20:5n3 en un 27% aproximadamente. En tercer lugar 16:0 representando el 22%.

Tabla 18: Perfil de ácidos grasos, que esterifican la banda 2.

AG	% 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
----------------	-------

Ab. Rel= abundancia relativa expresada en porcentaje del total de los ácidos grasos identificados

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

Tabla 19: Perfil de ácidos grasos banda 3

AG	% 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

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

Teniendo en cuenta la posibilidad de que el procedimiento pueda escalarse en el futuro, se comparó el rendimiento de extracción de astaxantina en extracto de cáscaras de *P. muelleri* obtenido con acetona /metanol y con uno extraído con etanol 96, dado que este último es considerado como uno de los solventes verdes y económicos aceptable para un posible escalamiento en planta piloto (Quan y Turner

2009). La Tabla 19 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 ($p > 0,05$).

Tabla 20: Rendimientos de extracción con diferentes solventes

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

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.

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

Una vez conocido que el extracto está formado por distintas bandas pigmentadas, se analizó el efecto de la temperatura y tiempo en los pigmentos presentes en el extracto etanólico de *P. muelleri*. El extracto fue conservado a diferentes temperaturas (15, 5 y -20°C) durante 60 días y se realizaron mediciones los días 0, 30 y 60. Los resultados del análisis se presentan en la Figura 27. 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%.

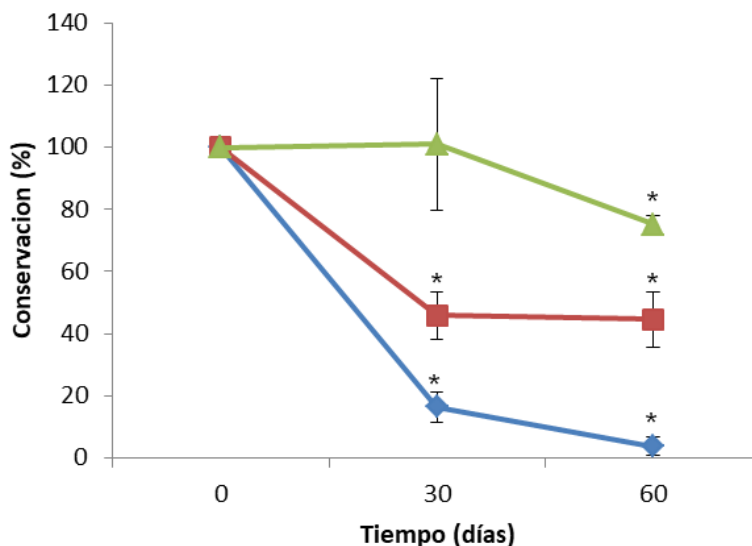


Figura 26: Estabilidad de extracto conservado a diferentes temperaturas durante 60 días.

(■): 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 28, mostraron que en este extracto no se detectó la presencia de la banda 3. Se observó que la intensidad de las bandas coloreadas, se modifica 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.

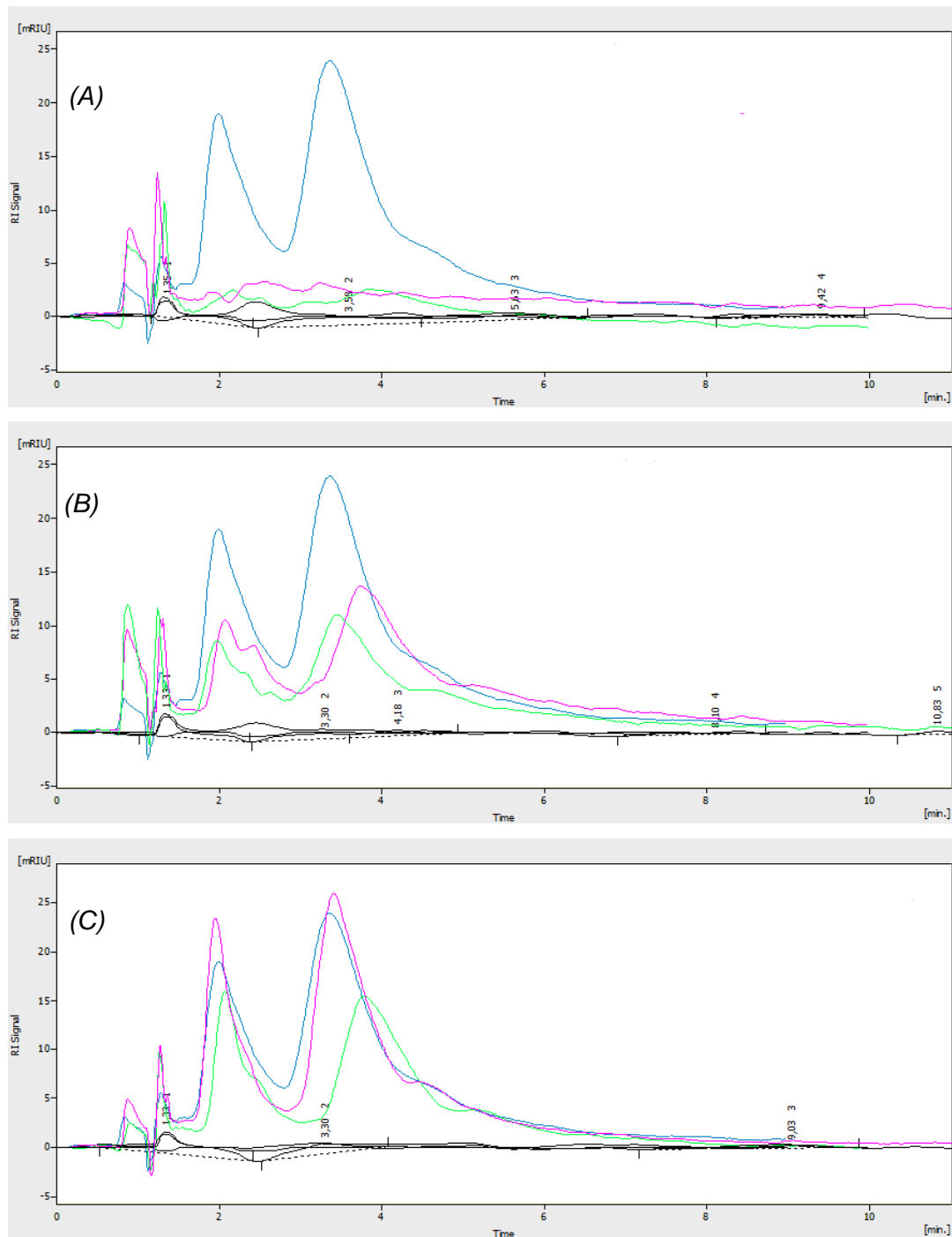


Figura 27: Efecto de la temperatura en la estabilidad del extracto. (A) Extracto conservado a temperatura a 15°C, (B) extracto conservado a 5°C, (C) extracto conservado a -20°C

(■): 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 el día 30 (señal verde) y día 60 (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 banda 2 respectivamente.

Tabla 21: Porcentaje de conservación de bandas pigmentadas

	Día 0		Día 30		Día 60	
	Banda 1	Banda 2	Banda 1	Banda 2	Banda 1	Banda 2
Ambiente	100	100	11	19	2	5
Heladera	100	100	34	51	25	53
Freezer	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 ensayo de la inhibición de la oxidación de fluoresceína (ORAC). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 29 -31. En la Figura 29 (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.

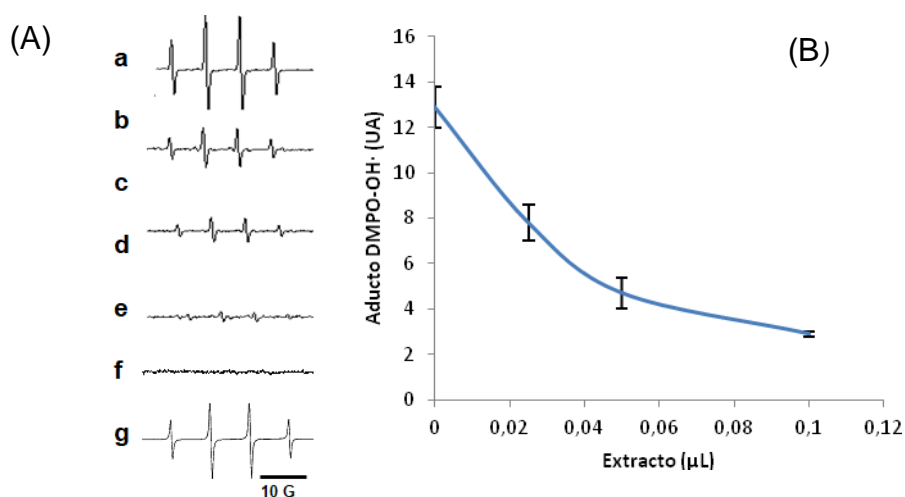


Figura 28: Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina contra radical $\bullet\text{OH}$. **A.** Espectro EPR del aducto DMPO-OH: (a) sistema basal (en ausencia de extracto), (b) espectro del aducto DMPO-OH generado en presencia de 0,025 μl de extracto, (c) espectro del aducto DMPO-OH generado en presencia de 0,050 μl de extracto, (d) espectro del aducto DMPO-OH generado en presencia de 0,1 μl de extracto, (e) espectro del POBN solo, (g) espectro simulado empleando los siguientes parámetros $a_N=15\text{ G}$ y $a_H=15\text{ G}$. **B.** Efecto de la adición de extracto sobre la generación de radical $\bullet\text{OH}$.

La Figura 30 (A) presenta los espectros obtenidos de la inhibición de la generación de los radicales $\text{LR}\bullet$, 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 $\text{LR}\bullet$.

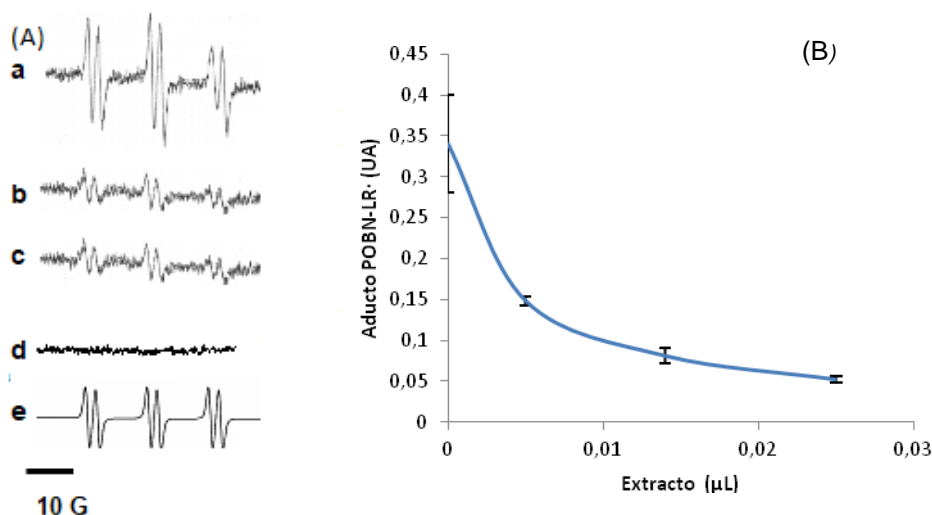


Figura 29: Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina contra $\text{RL}\bullet$. **A.** espectro EPR del aducto POBN- $\text{RL}\bullet$: (a) sistema basal (en ausencia de extracto), (b) espectro del aducto POBN- $\text{RL}\bullet$ en presencia de 0,015 μl de extracto, (c) espectro del aducto POBN- $\text{RL}\bullet$ en presencia de 0,025 μl de extracto, (d) espectro del POBN solo, (e) espectro simulado empleando los siguientes parámetros $a_N=15,8\text{ G}$ y $a_H=2,6\text{ G}$ y $g=2,005$. **B.** Efecto de la adición de extracto sobre la generación de $\text{RL}\bullet$.

El efecto antioxidante del extracto sobre la generación de radicales $\text{A}\bullet$ se muestra en la Figura 31. 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 $A\cdot$ a medida que se aumentó la concentración del extracto.

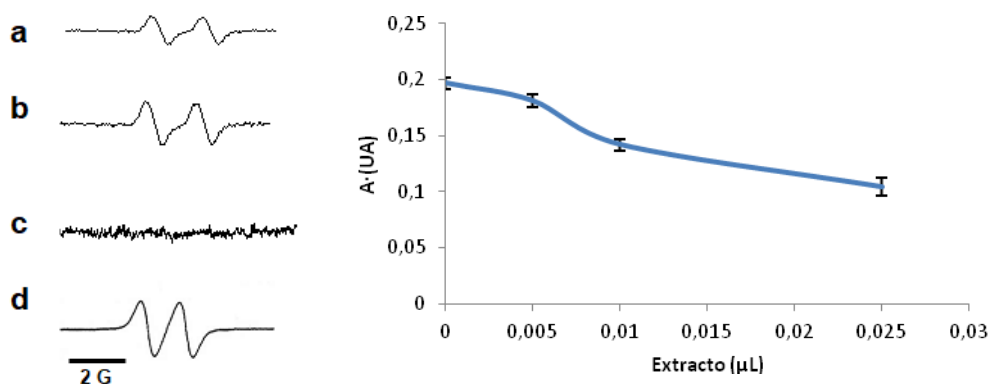


Figura 30: Capacidad antioxidante de extractos naturales ricos en astaxantina contra $A\cdot$. (A) Espectro EPR de $A\cdot$: (a) sistema basal (ácido ascórbico $60 \mu M$ en DMSO), (b) espectro del DMSO solo, (c) espectro de $A\cdot$ en presencia de $0,025 \mu l$ de extracto, (d) espectro de $A\cdot$ en presencia de $0,010 \mu l$ de extracto. Efecto de la adición de extracto sobre el contenido de $A\cdot$.

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 22 presenta los porcentajes de inhibición de generación de radicales $\cdot OH$, $LR\cdot$ y $A\cdot$, 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 $-20^\circ C$. Se evidenció la influencia de la temperatura y el tiempo en la inhibición de generación de los radicales, se observó que el efecto en la inhibición de los $LR\cdot$ fue la menos afectada.

Tabla 22: Porcentaje de inhibición de generación de radicales por extractos rico astaxantina (dilución 1:40) bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

	T(d)	T($^\circ C$)	$\cdot OH$ (%)	$LR\cdot$ (%)	$A\cdot$ (%)
Extractos	0		95	98	75
		-20	81	96,4	77
	30	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 \cdot : inhibición de radicales lipídicos, A:
Los resultados se expresan en porcentaje (%).

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, entre las diferencias se encuentra el agregado o no de astaxantina. La Tabla 23 presenta los resultados de la composición proximal de 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 23: Composición centesimal alimentos balanceados comerciales, con y sin astaxantina.

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas, t de Student ($p < 0,05$).

El perfil de ácidos grasos de los alimentos balanceados se presenta en la Tabla 24. Se observó que existe diferencia en el contenido de AG en los alimentos balanceados con y sin astaxantina. La concentración de AG en alimento con pigmento fue el doble que en el alimento sin pigmento. El porcentaje de PUFA en el alimento con astaxantina es aproximadamente el doble del porcentaje de los mismos en el alimento sin astaxantina 40,30 y 22,37% respectivamente. Mientras que el alimento sin astaxantina resultó mas

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

Tabla 24: Perfil de ácidos grasos 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 32 muestra los resultados (de un experimento tipo) obtenidos del análisis por EPR de la inhibición de generación de radicales 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 (A), OH^\bullet y LR^\bullet (B). 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 muestra 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.

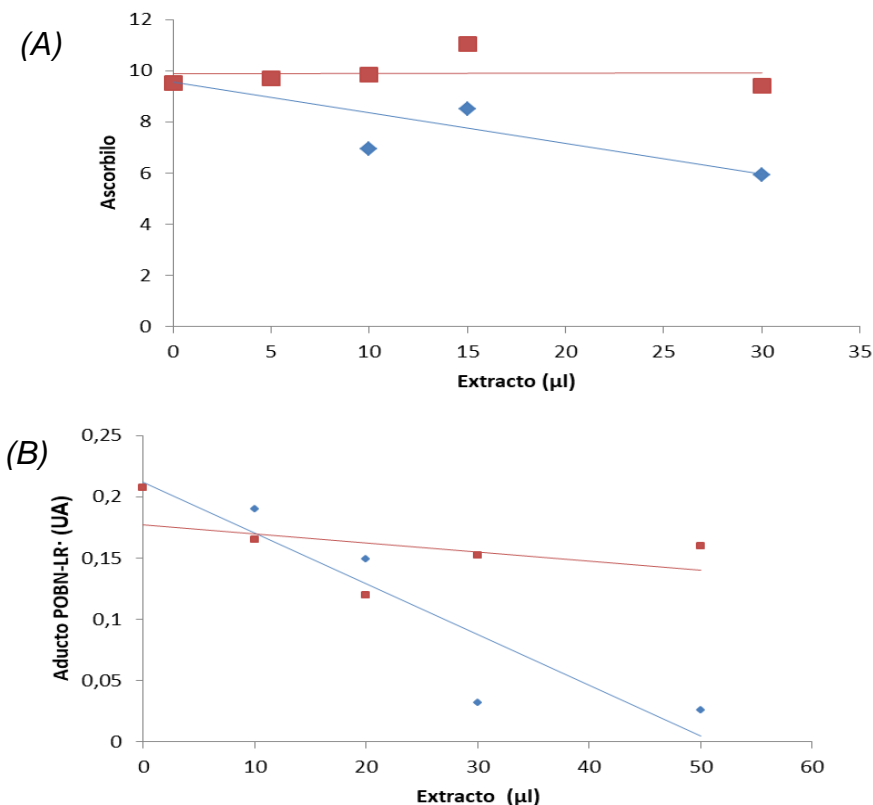


Figura 31: Análisis de la capacidad inhibitoria de generación de radicales libres de alimentos balanceados. (A) A^\bullet , y (B) LR^\bullet .

(*): 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 el tamaño de peces con el que se espera trabajar. Previamente al agregado del extracto se eligió el mejor aglutinante, gelatina, dado que para realizar la correcta incorporación del extracto fue necesario moler el alimento, y luego dar forma nuevamente. De acuerdo a los resultados del análisis del extracto, en cuanto al contenido de carotenoides, fue necesario incorporar 12 g de extracto por cada 1 kg de balanceado para alcanzar los 50 mg de astaxantina. kg^{-1} . Los 12 g de extracto aportaron también alrededor de 2370 mg de AG y 214,51 mg de colesterol. Se elaboraron además 2 alimentos

balanceados con agregado de pigmento comercial. La Tabla 25 presenta la composición proximal del alimento base, el alimento con extracto, y el alimento base con el agregado de Cariophyl Pink (astaxantina sintética) y alimento base con el agregado de Cariophyl red (cantaxantina sintética). Los 4 alimentos balanceados no presentan diferencias significativas en el contenido de lípidos.

Tabla 25: Composición proximal alimentos elaborados

	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)

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 AG de todos los alimentos elaborados se presenta en la Tabla 26. El balanceado con extracto presentó un contenido de ácidos grasos menor al del alimento base, pero con la identificación de los ácidos grasos propios del extracto, principalmente del grupo de los PUFA. Los ácidos grasos más abundantes en todos los alimentos balanceados preparados son el palmítico 31,95% y el oleico 29,63%.

Tabla 26: Perfil y cuantificación de AG en alimentos elaborados

AG	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
TAG	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.

Los alimentos balanceados con el agregado de carotenoide sintético ABAS y ABCS, presentaron el mismo perfil de ácidos grasos que el alimento balanceado base. Sin embargo el contenido TAG fue superior en el alimento balanceado con astaxantina sintética.

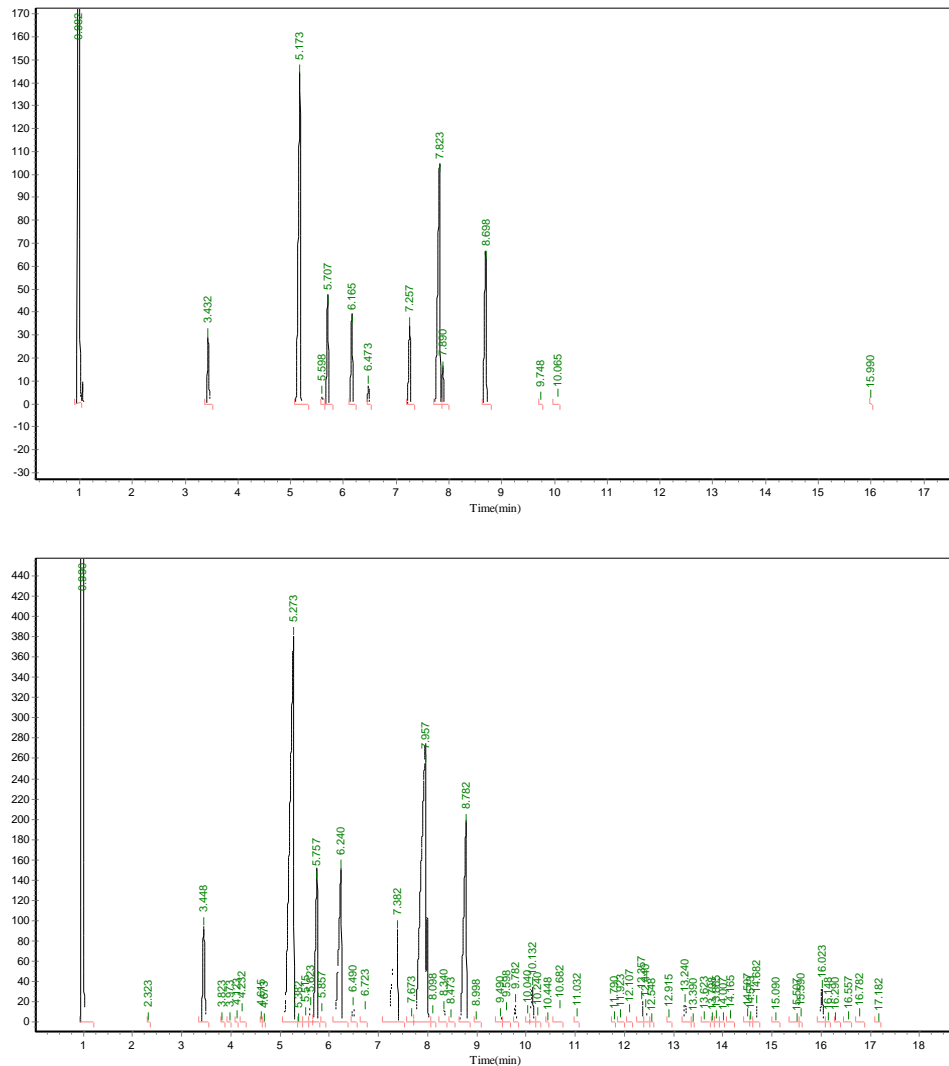


Figura 32: Perfil cromatográfico alimento base (A) y (B) alimento con extracto

Como se puede observar en la Figura 33, el agregado de extracto a alimento balanceado incrementa el número de señales que aparecen el cromatograma. Las nuevas señales que aparecen 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, como 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.

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

La Tabla 27 presenta los resultados del análisis de la capacidad antioxidante en los distintos alimentos balanceados. El alimento con agregado de extracto presentó los mismos resultados que el alimento q 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 27: *Determinación de la capacidad antioxidante en distintos alimentos*

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)

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, como se mencionó anteriormente, 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, en la preparación de alimento balanceado, sin tratamiento previo. 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 para 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 al grado de acetilación que presenta la misma. Se sabe que el grado de acetilación de quitina es cercano a 0,9 aunque, puede alcanzar valores de hasta 0,4 (Pillai y col 2009, Wu y Zivanovic 2008, 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 musculo 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 presenta 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).

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

Existen reportes de composición proximal de descartes de otros géneros de langostinos y camarones, tanto de aguas frías como aguas cálidas. Se compararon los resultados reportados con los obtenidos en la presente tesis. No se observan diferencias entre las especies de aguas frías respecto a las de aguas cálidas. *P. muelleri* presenta un mayor porcentaje de cenizas que el reportado para *Aristeus alcocki*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Penaeus spp.* y *Pandalus borealis* (Sindhu y Sherief 2011, Sanchez- Camargo y col 2011, Ibrahim y col 1999, Shahidi y Synowiecki 1991). En cuanto a la riqueza en lípidos, *P. muelleri* presenta un porcentaje mayor (doble) que el langostino de aguas frías *P. borealis*. Mientras que, presenta valores intermedios a especies de aguas cálidas *F. paulensis* y *A. alcocki* (Sindhu y Sherief 2011, Sanchez-Camargo y col 2011, Shahidi y Synowiecki 1991) y un valor muy similar al reportado por Ibrahim y col (1999) para langostinos *Penaeus spp.* Respecto a quitina, *P. muelleri* presenta un mayor rendimiento que *P. borealis* (Fargani y col 2016, Shahidi, y Synowiecki 1991). El porcentaje de proteínas de las cáscaras de *P. muelleri* son menores a las reportadas para cáscaras de *P. borealis*, *Penaeus spp* y *F. paulensis* (Shahidi, y Synowiecki 1991, Ibrahim y col 1999, Sanchez- Camargo y col 2011).

Respecto a la composición proximal de cáscaras de otras especies de crustáceos, existen reportes de composición proximal de distintas especies de cangrejos. No se encontraron (hasta el momento) reportes de otras especies de centolla. Los resultados obtenidos para la centolla: *L. santolla*, se

compararon entonces con los resultados de la literatura del cangrejo de río y *Chinectes 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 del caparazón.

4.1.2. Ácidos grasos.

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

Las cáscaras de *P. muelleri* son más ricas en ácidos grasos que las cáscaras de *L. santolla*. El ácido graso EPA se encuentra en concentraciones que son aproximadamente 10 veces superior y, DHA alrededor de 17 veces respecto al valor de *L. santolla*. La riqueza de ambos descartes en ácidos grasos n3 que se evidencia por la relación n6/n3 los convierte en una buena fuente de aceites de uso en acuicultura, en especial para especies de agua salada que poseen expresión reducida de la desaturasa necesaria para la obtención de EPA y DHA. Estos ácidos grasos juegan un importante rol como precursores de moléculas biológicamente activas, que intervienen en la respuesta inmune y antiinflamatoria (Oliva- Teles 2012). Existen reportes de la relación entre los AGE n3 y la respuesta inmune en trucha arcoíris. En dietas deficientes en estos AG, existe una producción de anticuerpos baja (Kiron y col. 1995). El material lipídico obtenido de las cáscaras de ambos crustáceos contribuiría a la producción de anticuerpos, contribuyendo en la salud del pez. 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 otras especies de la región (Cretton y col. 2016). El cociente n6/n3 en ambas especies indica que son muy ricos en AG n3. Esta característica es de importancia dado que los AG n3 previenen de enfermedades cardiovasculares y antitromboticas. Se sabe que las ingestas adecuadas de AG 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 AG se encontraban en 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 AG más abundantes coinciden con los reportados con anterioridad por Jeckel y col (1990). La diferencia se presenta principalmente en el porcentaje de PUFA, tanto EPA como DHA se encuentran en mayor proporción que los reportados por Jeckel y col (1990).

No se han encontrado reportes de cantidad de ácidos grasos provenientes de cáscaras de otras especies de langostinos. Si bien en *P. muelleri* representan el mayor componente lipídico identificado, no es posible generalizar. Existen reportes del perfil de AG en otros géneros de langostinos, las cáscaras de *P. muelleri*, presentan similitudes y diferencias con estos. En cuanto al contenido de SFA, *P. muelleri* presenta la misma proporción y componentes principales que en especies de aguas cálidas como el *F. paulensis* (Sanchez- Camargo y col 2011). El contenido de MUFA es un 5% menor en *P. muelleri*, los AG C18:1, C16:1, C20:1 se encuentran en mayor proporción en el langostino de aguas cálidas. El contenido de PUFA es superior en *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 *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 *Penaeus spp*. Sin embargo *P. muelleri*

es rico en AG de cadenas mayores a 18 carbonos, como EPA y DHA, que no fueron identificados en *Penaeus spp.*

El perfil de AG de cáscaras de *L. santolla*, en cuanto al contenido de PUFA es similar al reportado para la especie *Chionoectes 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 *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 AG, mientras que *C. cruciata* es una especie de aguas cálidas (Sachindra y col 2005).

El contenido de AG de cáscaras de *P. muelleri* es interesante considerando la posibilidad de agregar a un alimento balanceado un extracto rico en carotenoides obtenido de *P. muelleri*. El extracto aportaría AG de buena calidad nutricional que generalmente son adicionados a los alimentos balanceados por el agregado de aceites vegetales y aceites de pescado.

4.1.3. Colesterol

El 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 estudiado en descartes del procesamiento de distintos crustáceos (langostinos, camarones, langostas, centollas y cangrejos), tanto de agua salada como agua dulce (Sachindra y col 2005, Sachindra y col 2005 b, Sinduh y Sherief 2011, Rodde y col 2008, Lage-Yusty y col 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 obtenido en la centolla patagónica presenta un mayor porcentaje de carotenoides en el total de lípidos.

Los rendimientos en carotenoides reportados para las distintas especies de crustáceos se presentan en la Tabla 28. El *P. muelleri* presenta rendimientos mayores que *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 solo 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 el doble al de otras especies de cangrejos como *C. cruciata* y *P. potamon* (Sachindra y col 2005 b). Si bien el resultado obtenido es superior, cabe destacar que luego de las extracciones 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 28: Carotenoides en cáscaras de crustáceos

Crustáceo	Especie	Carotenoides (mg·100g ⁻¹)	Autor
Langostino/ camarón	<i>Aristeus alcocki</i>	2,66*	Sindhu y Sherief (2011)
	<i>Penaeus monodon</i>	8,66	Sachindra y col 2005
	<i>Penaeus indicus</i>	5,98	Sachindra y col 2005
	<i>Metapenaeus dobsonii</i>	8,33	Sachindra y col 2005
	<i>Parapenaeopsis stylifera</i>	10,47	Sachindra y col 2005
	<i>Pandalus borealis</i>	14,77*	Shahidi y Synowiecki 1991
	<i>Pandalus borealis</i>	1,4-3,9	Rodde y col 2008
Cangrejo	<i>Charybdis 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>Chionoecetes opilio</i>	7,17*	Lage-Yusty y col 2011

(*) 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 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 distintos organismos (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 variaciones 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 q los volúmenes de descartes de *L. santolla*. Los informes anuales de exportación e importación pesquera del MINAGRi (2008-2018), muestran para *L. santolla* que un gran porcentaje del volumen capturado es procesado y exportado. El procesamiento del producto a exportar se produce en los buques, y el principal producto preparado son clusters, que producen alrededor de un 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 volumenres de descartes. Si existiese alguna

reglamentación para que los descartes llegaran a tierra el volumen aumentaría pero de todas formas sería inferior al producido por *P. muelleri*.

A pesar de que se trata de volúmenes de descartes importantes, no se han encontrado estudios previos de caracterización, y potenciales usos de los mismos. Los volúmenes de captura del *P. muelleri* del año 2018 alcanzan los valores de captura de *P. borealis*, una de las especies de las que existen más reportes del análisis de sus descartes. Además *P. muelleri* supera ampliamente (100 veces en 2016) los volúmenes de *Penaeus indicus* (FAO Fact Sheets), 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 ha estudiado sus descartes (FAO Fact Sheets).

Como se observa en la sección de resultados estos descartes son muy ricos en distintos componentes. El uso de los descartes del procesamiento de crustáceos es de interés internacional. Existen numerosos reportes en donde se resume los posibles usos de estos descartes (Kandra y col 2011, Blanco y col 2007, Rubio- Rodriguez y col 2010, Kandra y col 2017, Mao y col 2017, Nguyen y col 2017). Es importante observar también que del extracto obtenido de ambos descartes solo fue posible identificar y cuantificar un 65% del mismo.

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

La cuantificación de carotenoides 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 ciclos 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 (Diaz 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 previa a realizar la muda. Otra posibilidad de la variación en el contenido de carotenoides de mes a mes o de cáscaras respecto de residuo completo puede deberse a la alimentación. El *P.muelleri* tiene una dieta variada (omnívoro), compuesta por distintas especies de animales entre los que se encuentran camarones (Roux y col 2009, Albertó y col 1993). 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) reportó para distintas especies de langostinos indios (*Penaeus monodon*, *Penaeus indicus*, *Metapenaeus dobsonii* y *Parapenaeopsis stylifera*) que el contenido de carotenoides en cabezas fue de 35,8-153,1µg / g de cabeza y en cáscara 59,8-104,7µg / g de cáscara. Los máximos alcanzados por estas especies, son menores a los obtenidos en el presente trabajo 19 - 188µg/g de residuos, y 38 - 265µg / g 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) 34-53mg de astaxantina/ kg de residuo en base seca, mientras que *P. muelleri* presenta 77,-525,4mg / kg 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 50-100mg•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 AG en distintas épocas de captura.

Los AG 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. Se sabe que los residuos son más ricos en lípidos totales que las cáscaras (Cretton y col 2018). Es interesante notar que en ambos descartes el porcentaje de ácidos grasos 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 AG en cáscaras de *P. muelleri*. Jeckel y col. (1991) presentaron para esta especie valores ligeramente diferentes para cáscaras, los contenidos de ácido palmítico 20-28% y oleico 19-22%, y una marcada diferencia en el contenido de DHA con valores cercanos a la mitad del mínimo registrado en el presente trabajo. Dentro de los ácidos grasos 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 desove. Esto es un dato importante a tener en cuenta debido a que convierte a los descartes no sólo en una fuente de carotenoides, ácidos grasos esenciales y de calidad nutricional, sino que también son fuente de ácidos grasos de uso energético

El perfil de AG, 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 que el contenido de MUFA + PUFA es 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 a especies de aguas tropicales. El residuo completo de *P. muelleri* presentan porcentajes más elevados de los AG, palmítico, oleico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico que los descartes de la especie *Farfantepenaeus paulensis* presentados por Sanchez-Camargo y col. (2011). Si bien el índice PUFA/SFA presentado por Sanchez-Camargo es mayor (1,90) a los obtenidos en el presente trabajo, *P. muelleri* tiene una relación n3/ n 6 alrededor de 3 veces mayor, este valor es indicativo de la gran calidad nutricional de los AG principalmente EPA y DHA presentes en este descarte. El perfil de AG *P.muelleri* presenta semejanzas, al reportado por Gomez- 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 (Sindhu y Sherief, (2011), y 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 las distintas matrices y en todos los casos los resultados obtenidos fueron similares. La

preservación de los pigmentos aumentó con el descenso de la temperatura. En cuanto a la matriz de conservación el almacenamiento en forma de extracto sería la más conveniente esto difiere con lo presentado por Gouveia y Empis (2003) para extractos obtenidos de microalgas. En segundo lugar las cáscaras secas, 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). Dadas las características estructurales (altamente insaturadas) de la astaxantina y carotenoides en general, sumado a la gran cantidad de PUFA, los extractos son susceptibles a la oxidación. La disminución en el contenido de carotenoides puede deberse, a la acción de los mismos al evitar la oxidación de los AG (Takeungwongtrakul y Benjakul, 2016).

Existen reportes del estudio de la estabilidad de carotenoides obtenidos a partir de descartes de otra especie de camarón. 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*) Gomez-Estaca y col. (2017), obtuvo un porcentaje de conservación mayor al presentado en esta tesis. Estas diferencias pueden deberse a la cantidad de AG presentes en el extracto susceptibles a oxidación. Dado que como se mencionó en el apartado 4.2.2., el perfil de ácidos grasos del *L. vannamei* es el que presenta mayor semejanzas al de *P. muelleri*.

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 a partir de los análisis realizados en esta tesis solo se puede asegurar la presencia de la astaxantina libre, las dos bandas coloreadas restantes, presentan comportamiento cromatográfico similar al que la literatura sugiere como, astaxantina monoesterificada y diesterificada (Sanchez-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* (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, en segundo lugar la monoesterificada y en tercer lugar la libre (Guillou y col 2005, Gomez-Estaca 2017). Sin embargo son similares a las proporciones en las que se encuentra en el microalga *H. pluvialis* (Focsan y col. 2016).

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

En cuanto al análisis de los AG 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 AG que cáscaras y residuos (palmítico, oleico, eicosapentaenoico y docosahexanoico). En el caso de la banda 3 los AG 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 AG esterificando a la astaxantina en la especie *Aristeus 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 mediante la que se obtuvo un mejor rendimiento (Mazzuca 2007). Esta mezcla está también aconsejada por Britton (1995). Para aumentar los rendimientos de extracción

muchos autores recomiendan el uso de mezclas de solventes, aunque debido a la toxicidad, costo y accesibilidad a los mismos 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 obtenido utilizando etanol como solvente de extracción no difiere del recomendado por la literatura. 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, y la disminución de los costos en lo que respecta a solventes.

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

El almacenamiento de extractos a temperatura ambiente, provoca cambios que son perceptibles a simple vista. 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 debe 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 de las proporciones relativas muestra una mayor conservación de la forma esterificada. Estos

resultados coinciden con lo reportado por Blanco y col. (2007) y Niamnuy y col. (2008) y 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), que la astaxantina libre se oxida fácilmente y 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, hidroxilos, lipídicos y ascorbilos. En general, a las 3 temperaturas analizadas, se registró una mayor inhibición de los radicales lipídicos. 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 (Focsan y col. 2017, Hernandez-Marín y col. 2012), la determinación de los radicales hidroxilos 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 compara los efectos de la temperatura y tiempo en la conservación de carotenoides y de capacidad antioxidante, es interesante notar como esta última se ve menos afectada. La conservación de carotenoides a temperatura ambiente son cercanas al 100%, sin embargo la capacidad antioxidante se ve

disminuida solo en un 10-30% en comparación al día 0 y dependiendo del radical.

El estudio de la capacidad antioxidante es relevante dado que se ha demostrado que los ROS y radicales libres juegan un importante rol en enfermedades como cáncer, úlceras gástricas, alzheimer, artritis (Je y col. 2003).

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, varía en un pequeño porcentaje 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 se encuentran entre los recomendados para cubrir los requerimientos básicos en trucha. En cuanto al contenido de AG, 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 AG para aumentar la absorción de la astaxantina (Chinsing y col 2013). En cuanto al contenido de $\omega 3$ el mismo representa aproximadamente 0,1% del peso, un porcentaje diez veces menor al sugerido por 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 ascorbilo, hidroxilo, y lipídicos, que se intensifica con el aumento de la concentración, llegando a una inhibición prácticamente total en el caso de los

radicales lipídicos. 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 agregado de extracto se busca que el mismo cumpla con los requerimientos necesarios para un correcto desarrollo de los peces. 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 trucha arcoiris

Se sugiere que los alimentos comerciales contengan porcentajes lipídicos entre 9-13%, debido a que los mismos proveen de ácidos grasos, 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 ácidos grasos 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 balanceado base, entre estos se encuentra el EPA. Se recomienda que al menos un 1% en la dieta debe ser ácidos grasos ω 3 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 AG provoca enfermedades (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* de presentan componentes de valor agregado de interés en distintas industrias como carotenoides, AG, quitina.

2) Para un correcto aprovechamiento de las cáscaras como fuente de carotenoides de uso en acuicultura, es necesaria su extracción, debido a que la riqueza en minerales de las mismas imposibilita su uso.

3) La abundancia en descartes de *P. muelleri* y su riqueza en carotenoides y AG de buena calidad nutricional, hacen a esta biomasa propicia para la preparación de un extracto rico en carotenoides para incorporar a la dieta de salmónidos. Si bien la calidad de los descartes de *L. santolla* es buena desde esta perspectiva, la cantidad de biomasa disponible no justifica por el momento el desarrollo de metodologías para su aprovechamiento.

4) Los carotenoides y AG presentes cáscaras y residuos completos del procesamiento de *P. muelleri* se hallan en concentraciones variables a lo largo del año.

5) La extracción con a partir de cáscaras húmedas ofrece un mayor rendimiento de extracción y reducción de los tiempos de trabajo.

6) En los extractos obtenidos a partir de *P. muelleri*, se observan 2 o 3 formas de astaxantina: libre y monoesterificada, o libre, monoesterificada y diesterificada, siendo la monoesterificada la forma más abundante.

7) En cuanto a la estabilidad de los pigmentos, los mismos se conservan en una mayor proporción cuando son almacenados en forma de extracto y a -20°C. Esto presenta como ventaja adicional la reducción del espacio necesario para almacenar.

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 y la mantiene aún en condiciones de temperatura ambiente.

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 adicionado al balanceado aporta AG de calidad nutricional, ausentes en el alimento base.

12) Los resultados de esta tesis sirvieron de base para el desarrollo de nuevos proyectos de investigación del grupo de trabajo.

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 trabajará con juveniles de truchas arcoiris, a las cuales se les realizará la aclimatación a agua de mar, previamente a la implementación de las dietas. Se probarán las 3 dietas por triplicado. Se controlarán parámetros fisicoquímicos del agua (pH, T°, salinidad, O₂ disuelto, nitritos, nitratos y amonio).

Se realizarán sacrificios de 1 ejemplar de cada tanque los días que se llegue a las 500 y 600 UC (unidades calor), ese mismo día se evaluará talla y peso de todos los peces de cada tanque para realizar los ajustes necesarios en la dieta.

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. Otra posibilidad que se presenta es continuar con el estudio de la materia prima respecto a otros productos de valor agregado como la quitina, proteínas y AG.

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.
- Amaya, E., y Nickell, D., 2015. Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans. Capitulo 11 *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Copyright © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.
- 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
- 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. *Can. J. Biochem. Physiol*, **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. (El Mar Argentino y sus recursos pesqueros, 6).
- 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. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 50-62). Academic Press.
- 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. Capitulo 11 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. *Chin. J. Chem. Eng.* **21(7)**:776-780.
- 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´Abramo, L.R. (1989). Lipid requirements of shrimp. In *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, 20 Feb-4 Mar 1989*.
- 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, 2018. FAO Aquaculture Newsletter. No. 58 (April). Rome.
- 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. *J. Mater. Environ. Sci.* **7 (4)**: 1334-1346
- 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.

- Giulivi, C., Cadenas, E., 1993. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *FEBS Lett.* **332**: 287-290.
- 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, *J Supercrit 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 & emerging technologies.* **4(2)**: 227-233.
- Green, M.J., Hill, H.A., 1984. Chemistry of dioxygen. *Meth.Enzymol.* **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 Physiol.* **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. *Can. Spec. publ. aquat. Sci.* **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.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol.* **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. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 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.
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R., 1994. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem.Photobiol.* **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 defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* **111A(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. *Biochim.Biophys.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. In *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. *J. Lipid Res.*, **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.
- 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 Chem.* **225**: 23–30.
- Mendes-Pinto M.M., Choubert G., MoraisR., 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. *J Food Eng*, **87**: 591-600.
- Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. (15th ed.).
- 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*
- 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. *J Food Eng*. **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. *Acc. Chem. Res.* **19**: 268-273.
- Pospíšil P., 2009. Review Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys 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. *Biosyst Eng.***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, Argentina. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44(3).
- 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 Manag*, **26**: 1092-1098.
- Sanchez- 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 Conf Proc J.*, **2**: 95-103.
- 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.
- 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. *Int Aquat Res.* **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. *Mol Vis*, **12(12)**: 1127-35.
- 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 (om) *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.
- Wyngaard, J., Iorio, M.I., Firpo, C., 2016 o Boschi E.E.. 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.