



Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y
Acuicultura

**“OBTENCIÓN DE ASTAXANTINA DE LA MUNIDA, *Pleuroncodes monodon*
(CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA), EMPLEANDO CO₂ SUPERCRÍTICO
PARA SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA”**

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

AUTORA

Morante Llanos, Fiorella de Fátima

ASESOR

Ing. Llontop Veléz Carlos

JURADO

Dr. Zambrano Cabanillas, Abel Walter

Ing. Figueroa Vargas-Machuca, Manuel Eduardo

Ing. Mogollón Ávila, Santos Valentín

Lima - Perú

2021

Dedicatoria

A Dios, a mis padres: Hernán Morante Bockos y Lucila Llanos Camasca, a mi hermano Geanfranco, por la confianza que tienen en mí, por su motivación constante y su apoyo incondicional.

Agradecimiento

A mis asesores, Dra. Maritza Barriga Sánchez e Ing. Carlos Llontop Vélez por su constante apoyo y paciencia en el desarrollo de la presente investigación. La Dra. Barriga me permitió además realizar mi estudio en las instalaciones del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).

A los investigadores y personal del ITP, quienes me brindaron su conocimiento y contribuyeron a mi formación profesional.

A mis amigos de la Universidad Nacional Federico Villarreal, quienes de diversas maneras me motivaron para culminar mi carrera y alcanzar mis objetivos.

Al Ing. Miguel Varas, compañero investigador quien siempre me brindó su apoyo durante la presente investigación.

Al Programa Nacional de Innovación, Pesca y Acuicultura (PNIPA), por financiar el proyecto “Obtención de astaxantina mediante fluidos supercríticos a partir de munida (*Pleuroncodes monodon*), evaluación de su estabilización mediante microencapsulación e incorporación en la dieta de truchas como medio de pigmentación y contribución al fortalecimiento de la producción orgánica de la Comunidad Campesina de Iscayapi, Arapa, Región Puno, para satisfacer las exigencias del nuevo mercado”, mediante contrato N° 005-2018-PNIPA, a la Empresa Truchas Arapa Perú S.A.C. por ser la empresa ejecutora del proyecto, y al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) por ser la entidad asociada.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento	iii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y formulación del problema.....	1
1.1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.1.2. Problema principal	2
1.1.3. Problema específico	3
1.2. Antecedentes	3
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General.....	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Justificación	7
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Bases, teóricas sobre el tema de investigación	11
2.1.1. Munida	11
2.1.2. Carotenoides	13
2.1.3. Extracción con solventes orgánicos y Fluidos supercríticos.....	16
2.1.4 Metales pesados: Plomo y Cadmio	21
2.1.5 Ácidos grasos	24
CAPITULO III. MÉTODO.....	26
3.1. Tipo de investigación.....	26
3.2. Ámbito temporal espacial	26
3.3. Variables	26
3.3.1. Variables de extracción.....	26
3.4. Población y muestra.....	27

3.4.1. Selección de muestra.....	27
3.4.2. Procedencia de la muestra.....	27
3.5. Instrumentos.....	28
3.5.1. Materiales.....	28
3.5.2 Equipos	29
3.5.3 Reactivos.....	31
3.6. Procedimientos.....	32
3.6.1 Caracterización de la munida.....	32
3.6.2. Determinación de astaxantina	34
3.6.3. Determinación de metales pesados	34
3.6.4. Perfil de Ácidos Grasos	35
3.7. Análisis de datos	36
3.7.1. Obtención del extracto oleoso.....	37
3.8. Análisis de datos estadísticos.....	39
3.8.1. Caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida.....	39
3.8.2. Comparación de los contenidos de astaxantina extraídos por métodos convencionales y con CO ₂ supercrítico.....	40
3.8.3. Comparación de los contenidos de metales pesados.....	40
3.8.4. Perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos de munida.....	41
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	42
4.1. Caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida.....	42
4.2. Comparación de los contenidos de astaxantina de los extractos obtenidos por métodos convencionales y con CO ₂ supercrítico	43
4.3. Comparación de los contenidos de metales pesados.....	44
4.4. Perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos de munida.....	45
CAPITULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
5.1. Caracterización Biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida	47
5.1.1 Identificación de la munida.....	47
5.1.2. Biometría.....	47
5.1.3. Composición Proximal.....	48
5.2. Comparación de los contenidos de astaxantina extraídos por métodos convencionales y con CO ₂ supercrítico.....	49
5.3. Comparación de los contenidos de plomo y cadmio	52

5.3.1. Contenido de plomo y cadmio en MF y RM	52
5.3.2 Contenido de plomo y cadmio de los extractos de munida	53
5.4. Perfil de ácidos grasos	54
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	56
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES	58
CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59
CAPITULO IX. ANEXOS	69

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Producción de Trucha Arco Iris en toneladas (t) por departamentos (2011 – 2016).....</i>	8
Tabla 2. <i>Contenidos de astaxantina de algunas especies</i>	15
Tabla 3. <i>Propiedades críticas de algunas sustancias</i>	19
Tabla 4. <i>Ventajas y limitaciones de extracción con solventes y CO₂ supercrítico</i>	20
Tabla 5. <i>Biometría de la munida (P. monodon).....</i>	42
Tabla 6. <i>Composición química proximal de MF, MS, RM (g/100g ms)</i>	43
Tabla 7. <i>Contenido de astaxantina por extracto y por muestra seca.</i>	43
Tabla 8. <i>Contenidos de plomo, cadmio y mercurio (mg/kg) de la MF, MS y RM</i>	44
Tabla 9. <i>Contenidos de plomo, cadmio para cada extracción (mg/kg)</i>	44
Tabla 10. <i>Ácidos grasos (%) de los extractos oleosos obtenidos con hexano: alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO₂ supercrítico.....</i>	45

Lista de Figuras

Figura 1. Evolución de la producción de Trucha Arco Iris a nivel mundial (2011 – 2017).....	8
Figura 2. Evolución de la producción de Trucha ArcoIris en el departamento de Puno (2011 – 2017)..	10
Figura 3. Munida (<i>Pleuroncodes monodon</i>).....	12
Figura 4. Distribución de <i>Pleuroncodes monodon</i> entre Perú y Chile.	12
Figura 5. Estructura de la molécula de astaxantina.	15
Figura 6. Diagrama de fases solido – liquido – gas. *PT: Punto triple, PC: punto crítico Pc: presión critica; Tc temperatura critica.	18
Figura 7. Ubicación geográfica de la zona de captura de munida.	28
Figura 8. Característica de genero <i>Pleurocondes</i>	32
Figura 9. Ejes de medidas considerados AC: Ancho del cefalotórax; LC: Largo del Cefalotórax; LT: Largo Total.....	33
Figura 10. Flujo para la obtención de la munida seca.	36
Figura 11. Flujo para la obtención del extracto oleoso de munida.	39
Figura 12. Vista a través del estereoscopio de <i>Pleuroncodes monodon</i>	42
Figura 13. Contenido de astaxantina de los extractos oleosos obtenidos con hexano:alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO ₂ supercrítico.....	50
Figura 14. Contenido de astaxantina por gramo de muestra seca obtenidos con hexano:alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO ₂ supercrítico.....	51
Figura 15. Contenido de plomo y cadmio en MF, MS y RM.	53
Figura 16. Contenido de plomo y cadmio en los extractos oleosos obtenidos con diferentes solventes.....	54

Resumen

La astaxantina es un pigmento carotenoide utilizado como aditivo en las dietas de salmónidos para lograr la coloración salmonada de la carne. Una fuente natural de astaxantina es el camaroncito rojo munida (*Pleuroncodes monodon*). En 2017, el Instituto del mar del Perú (IMARPE), estimó una biomasa de $5,4 \times 10^6$ t de munida en aguas peruanas, lo que la convierte en un recurso importante para la obtención de este pigmento. Los resultados de la biometría de las hembras y machos fueron: ancho de cefalotórax (AC): $10,15 \pm 1,19$ y $9,93 \pm 1,19$ mm; longitud de cefalotórax (LC): $16,60 \pm 2,23$ y $16,66 \pm 1,89$ mm; longitud total (LT): $30,59 \pm 3,48$ y $29,31 \pm 3,48$ mm, respectivamente, demostrando que las hembras de la zona sur tienen mayor tamaño que los machos. El objetivo del presente estudio fue extraer la astaxantina mediante cuatro métodos, compararlos entre sí y establecer cuál de ellos fue el mejor método de extracción. La munida fue secada, triturada, tamizada y almacenada a -18 °C. Se determinó la composición química proximal (CQP) de la munida seca (MS) y munida fresca (MF). En los métodos de extracción se utilizaron: a) hexano: alcohol isopropílico (60:40); b) acetona; c) CO₂ supercrítico, y d) etanol absoluto. Se cuantificó la astaxantina de los extractos. La CQP de la munida fresca (MF) fue: humedad (H), 73,57 %; cenizas (C), 7,59 %; grasa (G), 6,06 % y proteína (P), 10,69 %, mientras que la CQP de MS fue: H, 9,17 %; C, 15,15 %; G, 23,16 % y P, 34,50 %. El contenido de astaxantina de MS fue superior en el extracto de acetona, obteniéndose 869,55 µg Astx/g, mientras que con hexano: alcohol isopropílico se obtuvo 781,25 µg Astx/g. Los contenidos de plomo y cadmio de los extractos oleosos fueron 0,16 y 0,09 mg/kg utilizando hexano: alcohol isopropílico; 0,10 y 0,12 mg/kg usando acetona; 0,09 y 0,01 mg/kg utilizando CO₂ supercrítico y 0,13 y 0,22 mg/kg utilizando etanol absoluto, respectivamente. El contenido de EPA + DHA en los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico fue 30,64 % mientras que con etanol absoluto se obtuvo 30,06 %.

Palabras clave: astaxantina natural, munida, extracto oleoso, CO₂ supercrítico

Abstract

Astaxanthin is a carotenoid pigment used as an additive in salmonid diets to achieve salmon-colored meat. A natural source of astaxanthin is the munida red shrimp (*Pleuroncodes monodon*). In 2017, Instituto del Mar del Perú (IMARPE) estimated a biomass of $5,4 \times 10^6$ t of munida in Peruvian waters, which makes it an important resource for obtaining this pigment. The results of the biometrics of females and males were: cephalothorax width (AC): $10,15 \pm 1,19$ and $9,93 \pm 1,19$ mm; cephalothorax length (LC): $16,60 \pm 2,23$ and $16,66 \pm 1,89$ mm; Total length (LT): $30,59 \pm 3,48$ and $29,31 \pm 3,48$ mm, respectively, demonstrating that females in the southern zone are larger than males. The objective of the present study was to extract astaxanthin by four methods, compare them with each other and establish which of them was the best extraction method. The munida was dried, crushed, sieved and stored at -18 °C. The proximal chemical composition (CQP) of the dry munida (MS) and fresh munida (MF) was determined. The extraction methods used were: a) hexane: isopropyl alcohol (60:40); b) acetone; c) supercritical CO₂, and d) absolute ethanol. The astaxanthin of the extracts was quantified. The CQP of the fresh munida (MF) was: humidity (H), 73,57 %; ashes (C), 7,59 %; fat (G), 6,06 % and protein (P), 10,69 %, while the CQP of MS was: H, 9,17 %; C, 15,15 %; G, 23,16 % and P, 34,50 %. The astaxanthin content of MS was higher in the acetone extract, obtaining 869,55 µg Astx/g, while with hexane: isopropyl alcohol 781,25 µg Astx/g was obtained. The lead and cadmium contents of the oily extracts were 0,16 and 0,09 mg/kg using hexane: isopropyl alcohol; 0,10 and 0,12 mg/kg using acetone; 0,09 and 0,01 mg/kg using supercritical CO₂ and 0,13 and 0,22 mg/kg using absolute ethanol, respectively. The content of EPA + DHA in the extracts obtained with supercritical CO₂ was 30,64 % while with absolute ethanol 30,06 % was obtained.

Keywords: natural astaxanthin, munida, oil extract, supercritical CO₂

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La pesca artesanal e industrial de anchoveta, en ocasiones captura una gran cantidad de especies de manera incidental a lo largo de toda la costa peruana, una de estas especies es la munida (*Pleuroncodes monodon*), la cual en el Perú presenta una distribución pelágica en todas sus etapas de vida, llegando a compartir nichos ecológicos y patrones de distribución espacial similares con otras especies pelágicas como la anchoveta, especialmente en las aguas más frías y costeras (Gutiérrez, Ramirez, Bertrand, Móron & Bertrand, 2008). La munida se concentra en la franja de las 50 millas del mar peruano, principalmente en las 22 más cercanas a la costa, con una biomasa de 2,3 millones de toneladas (Instituto del Mar del Perú, 2016), y en el 2017 la biomasa estimada fue de 5,4 millones de toneladas (IMARPE, 2017a).

Por otro lado, en la acuicultura se utiliza el pigmento astaxantina como un aditivo en las dietas de salmónidos, ya que su efecto principal es dar coloración salmonada al músculo (Meyer, 2000). Las fuentes de extracción del pigmento natural son las algas verdes (*Haematococcus pluvialis*), levadura roja (*Phaffia rhodozyma*), entre otras (Wu *et al.*, 2015). Sin embargo, los desechos de crustáceos se presentan como una alternativa altamente prometedora como fuente de astaxantina (Routray, Dave, Cheema, Ramakrishnan & Pohling, 2019), por lo que la munida puede ser utilizada para la obtención de astaxantina natural.

1.1. Descripción y formulación del problema

1.1.1. Planteamiento del problema

Existe un creciente interés en elaborar alimentos o suplementos alimenticios en base a ingredientes funcionales de origen natural y que el método de extracción sea amigable con el medio ambiente; la astaxantina obtenida a partir de fuentes naturales

se incluye dentro de esta tendencia, pudiendo ser utilizada en la industria alimentaria, nutracéutica, alimentación animal o en acuicultura (Bustamante, 2012).

En el caso de los productores de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Puno requieren que el alimento tenga astaxantina natural para así ofrecer un producto orgánico y competir en mercados internacionales, ya que en la actualidad solo existe alimento de trucha con astaxantina sintética en el mercado.

El objetivo de este trabajo fue comparar las diferentes técnicas de extracción de astaxantina natural usando solventes orgánicos y fluidos supercríticos a partir de un recurso no aprovechado que es la munida. Generalmente en la extracción de carotenoides, dentro del cual está la astaxantina, se utilizan solventes orgánicos como éter etílico, acetona, hexano, cloroformo, en estos métodos tradicionales puede ocurrir degradación por oxidación y/o isomerización, además, estas técnicas producen la contaminación del extracto, son muy demandantes de tiempo, requieren múltiples pasos, consumen grandes cantidades de solvente y su principal desventaja es que su producto final no se puede usar directamente para el consumo humano, volviendo cuestionable su uso para la alimentación (Turner, Whitehand, Nguyen & McKeon, 2004; Bustamante, 2012); sin embargo, la técnica de fluidos supercríticos resulta una alternativa interesante porque no posee los inconvenientes de los disolventes orgánicos tradicionales (Velasco, Villada y Carrera, 2007).

1.1.2. Problema principal

- ¿Cuánto de astaxantina se obtiene a partir de la especie *Pleuroncodes monodon* utilizando la extracción con CO₂ supercrítico?

1.1.3. Problema específico

- ¿Cuál es la caracterización biométrica y fisicoquímica de la munida?
- ¿La cantidad de astaxantina obtenida con fluidos supercríticos será igual a la obtenida con hexano: alcohol isopropilico; acetona; etanol absoluto?
- ¿Cuáles son los contenidos de plomo y cadmio en los extractos oleosos de munida obtenidos con hexano: alcohol isopropilico; acetona; etanol absoluto y CO₂ supercrítico?
- ¿Los perfiles de ácidos grasos de los extractos oleoso obtenidos con hexano: alcohol isopropilico; acetona; etanol absoluto y CO₂ supercrítico a partir de la munida son iguales?

1.2. Antecedentes

La costa peruana se caracteriza por tener el sistema de la Corriente de Humboldt conocido también como el afloramiento costero del Perú, es el sistema de borde oriental oceánico más cercano al Ecuador y provee la mayor producción pesquera en relación a otros sistemas análogos (Chavez, Bertrand, Guevara-Carrasco, Soler & Csirke, 2008). El afloramiento costero permite que exista una alta productividad primaria y secundaria, las cuales a su vez sostienen la gran biomasa de peces; en el Perú la pesca de anchoveta (*Engraulis ringens*), es una de las principales actividades pesqueras, sus desembarques llegaron al 15 % de la captura mundial (Ayón, Swartzman, Espinoza & Bertrand, 2011).

Por otro lado, la pesca industrial de anchoveta en aguas peruanas captura diversas especies adicionales, entre las que se encuentra *Pleuroncodes monodon*, conocida comúnmente en el Perú como munida o camaroncito rojo y en Chile como langostino

colorado o langostino zanahoria (Saldarriaga, 2015), la munida habita en la corriente de Humboldt desde la isla Lobos de Afuera (06° S) Perú hasta bahía Ancud (42° S) Chile (Franco-Meléndez, 2012). En Perú, el recurso munida es frecuentemente encontrado con la anchoveta debido a la sobreposición vertical entre munida y la anchoveta, la cual, es reducida durante el día y alta por la noche, sin embargo, la red de pesca tiene el suficiente velado para capturar ambas especies (IMARPE, 2017b), si bien la munida contiene compuestos bioquímicos valiosos, según la Resolución Ministerial N° 487-2018 el único recurso permitido para la elaboración de harina de pescado es la anchoveta (Ministerio de la Producción, 2018b), lo que alienta el descarte de la munida.

En la evaluación hidroacústica de recursos pelágicos en la zona de Pisco-Pimentel realizada por IMARPE (2016), se determinaron dos zonas costeras donde la munida comparte área con la anchoveta, la primera es Huarmey – Chancay dentro de las 25 millas náuticas (mn) y la segunda entre Callao - Pisco con una distribución costera de 15 mn, las mayores densidades se localizaron frente a Supe - Punta Bermejo, en donde registraron que la distribución vertical de esta especie fue en un rango 100 - 150 m de profundidad, sin embargo, IMARPE (2017a) reportó en la evaluación hidroacústica de recursos pelágicos de que la distribución de la munida fue totalmente costera entre Supe - Morro Sama alcanzando 50 mn de la costa hasta 131 m de profundidad.

El Ministerio de la Producción (2013) considera a la munida un recurso potencial para la industria pesquera y gastronomía peruana, ya que es un recurso no aprovechado, pero que a partir del año 2013 se comenzó a impulsar su extracción. Sin embargo, en el área de investigación solo ha sido utilizada para la elaboración de ensilado con el fin de obtener

pigmentos liposolubles, donde se sugieren otras alternativas de extracción para su óptimo aprovechamiento integral (Albrecht-Ruiz y Cueto, 2006).

En relación a los pigmentos, los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, algas, animales tales como los aves, peces, invertebrados, plantas superiores; en las aves, los carotenoides son los responsables del color amarillo y rojo de las plumas, del color de la piel y carne en gallinas, especialmente de la yema de huevo; mientras que en los peces adquiere gran importancia en la carne de trucha y salmón (astaxantina y cantaxantina); en invertebrados marinos como el camarón, cangrejo, langosta, entre otros, la astaxantina y otros carotenoides pueden estar presentes en concentraciones altas, a menudo como complejos carotenoprotéinicos de color verde, púrpura o azul cuando el animal está vivo, mientras que al ser cocidos, estos complejos se desnaturalizan dando lugar al color rojo del carotenoide (Britton, 1982). También la astaxantina está presente en el *Haematococcus pluvialis*, en bacterias fotosintéticas como *Rhodococcus maris*, mientras que entre las cianobacterias se ha encontrado cantaxantina en *Anabaena variabilis*. Finalmente, destaca también la presencia de astaxantina en la levadura *Phaffia rhodozyma* (Britton, 1982).

El consumo de salmónidos se juzga por su talla, textura, frescura, sabor y precio, pero el criterio clave de decisión es el impacto visual que provoca la coloración de su carne que varía de rosada a roja (Sinnot, 1989). Esta característica de pigmentación de los salmónidos se logra por la absorción y depósito de pigmentos carotenoides oxigenados en sus músculos, es por ello que los salmónidos cultivados deben recibirlo en la dieta, puesto que son incapaces de sintetizar estos pigmentos (Torrissen, Hardy & Shearer, 1989).

Entre los beneficios de la astaxantina están la mejora en la reproducción y la calidad de la cría, la reducción de la mortalidad embrionaria, efectos sobre la fotorespuesta, el

comportamiento, la respiración, mejora la salud y funciona como antioxidantes provitamina A (Torrissen *et al.*, 1989). Siendo el motivo que ha generado estudios en base a la extracción del pigmento astaxantina utilizando la microalga *Haematococcus pluvialis*, aplicando el método de extracción con solventes orgánicos (Boonnoun *et al.*, 2014) y con el método de fluidos supercríticos (Molino *et al.*, 2018).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la cantidad de astaxantina del extracto oleoso de munida (*Pleuroncodes monodon*) obtenido con CO₂ supercrítico.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar la caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida (*Pleuroncodes monodon*).
- Comparar los contenidos de astaxantina del extracto oleoso de munida obtenidos con hexano: alcohol isopropílico; acetona; etanol absoluto y con CO₂ supercrítico.
- Comparar los contenidos de plomo y cadmio de los extractos oleosos de munida obtenidos con hexano: alcohol isopropílico; acetona; etanol absoluto y CO₂ supercrítico.
- Comparar el perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos de munida obtenidos con hexano: alcohol isopropílico; acetona; etanol absoluto y CO₂ supercrítico.

1.4. Justificación

En el Perú se tiene referencia de una empresa arequipeña que cultiva la microalga *Haematococcus pluvialis* de la cual se obtiene el pigmento astaxantina, utilizado para consumo humano, sin embargo, no existen registros en el Perú de la utilización de recursos hidrobiológicos para la extracción de astaxantina con destino a producción acuícola. Es por ello, que el presente trabajo, dentro del marco del proyecto en ejecución del Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura - PNIPA, 2018 formulado por el Instituto Tecnológico del Perú y en asociación con la empresa Truchas Arapa SAC, se plantea la obtención de un pigmento natural para su inclusión en dietas para la trucha arcoíris, el ITP se encargó de la obtención del pigmento de astaxantina natural y la empresa se encargó de su adición en la formulación de la dieta para la trucha arcoíris.

Por otro lado, la producción mundial de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), durante el periodo del 2011 al 2017 fue fluctuante (Figura 1), estando ubicado el Perú en el quinto lugar de producción de trucha a nivel mundial y en segundo puesto a nivel del continente americano (Ministerio de la Producción, 2018a).

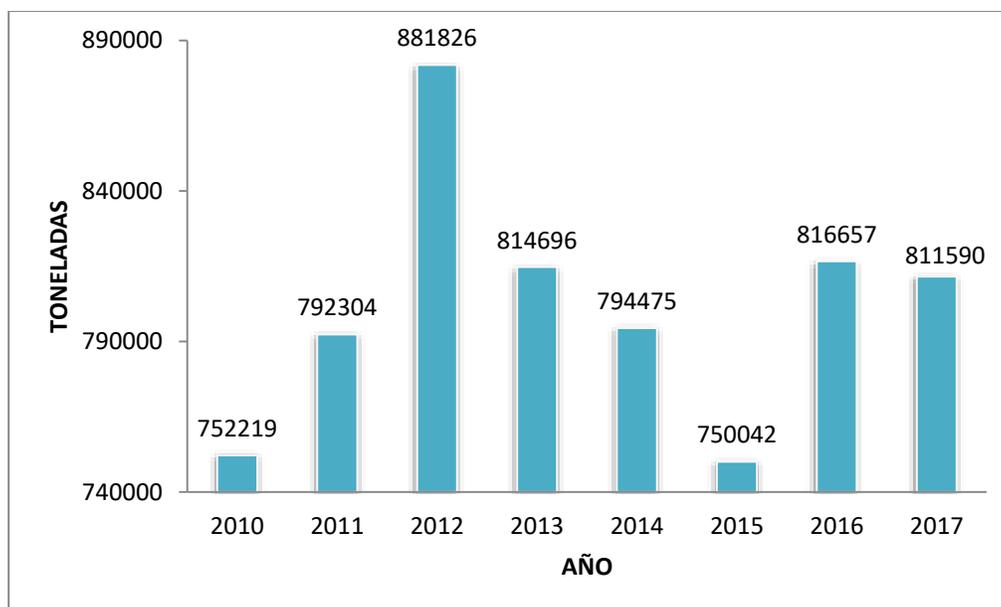


Figura 1. Evolución de la producción de Trucha Arco Iris a nivel mundial (2011 – 2017).
Fuente: Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras Fishstat (2017).

El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) ha tenido un crecimiento vertiginoso, desarrollándose con relativo éxito en la zonas altoandinas. En la Tabla 1 se muestra la producción de trucha arcoíris entre los años 2011 y 2016, registrándose una tasa de crecimiento anual del 21 % durante dicho periodo (Ministerio de la Producción, 2018a).

Tabla 1

Producción de Trucha Arco Iris en toneladas (t) por departamentos (2011 – 2016)

N°	DEPARTAMENTO	2011	2012	2013	2014	2015	2016
1	Puno	15 550	18 472	29 093	28 243	34 124	43 298
2	Huancavelica	1 122	1 144	1 222	1 444	3 387	3 704
3	Junín	1 967	3 413	2 127	1 615	1 178	2 263

4	Cusco	252	438	641	170	637	798
5	Ayacucho	209	240	265	304	483	544
6	Lima	83	128	197	220	253	344
7	Amazonas	25	61	41	36	81	291
8	Huánuco	110	148	198	269	259	247
9	Pasco	122	90	88	89	128	234
10	Cajamarca	294	329	328	175	75	139
11	La Libertad	7	9	10	49	122	120
12	Apurímac	27	38	50	60	74	98
13	Ancash	128	136	659	82	79	86
14	Tacna	21	48	21	68	30	33
15	Arequipa	44	62	43	91	29	18
16	Moquegua	1	6	11	8	8	0
Totales		19 962	24 762	34 994	32 923	40 947	52 217

Nota. Fuente: Ministerio de producción (2018a).

El departamento de Puno se ha convertido en el principal productor de trucha con 44 845 toneladas en el 2017 (Figura 2), representado el 83 % de la producción nacional

(Ministerio de la Producción, 2018a), por lo tanto, existe toneladas de trucha arcoíris que podrían ser alimentadas con un pigmento natural, dando oportunidad a nuevos mercados.

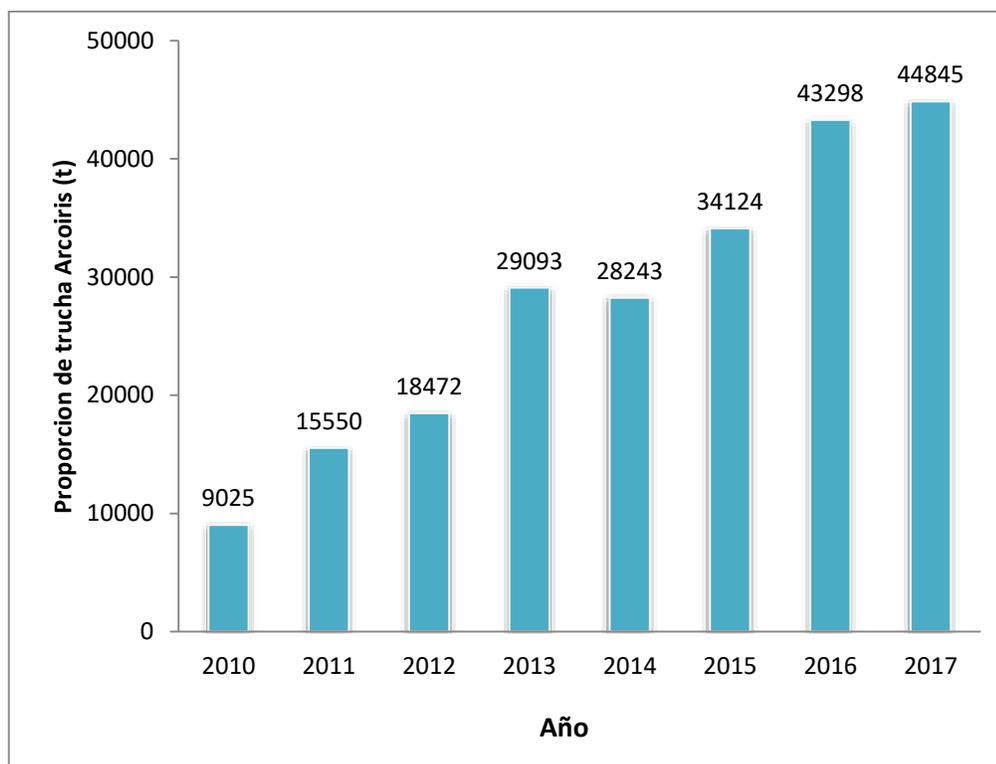


Figura 2. Evolución de la producción de Trucha ArcoIris en el departamento de Puno (2011 – 2017).
Fuente: Ministerio de la Producción (2018).

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases, teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. Munida

El crustáceo *Pleuroncodes monodon* pertenece a la clase *Malacostraca* de la orden *decapoda*, es un *anomuro* de la familia *Galatheidae* de genero *Pleurocondes* y especie *monodon* (Milne-Edwards, 1837). Como se mencionó anteriormente el crustáceo munida (Figura 3), se distribuye desde Chile (41° S) hasta el sur de México (15° N). En particular, en las costas sudamericanas se extiende desde isla Lobos de Afuera (06° S) Perú hasta bahía Ancud (42° S) Chile (Figura 4), llamado comúnmente camaroncito rojo, munida o langostino colorado muy abundante y forma parte de la producción secundaria de uno de los sistemas de surgencias más productivos del mundo, el Sistema Peruano-Chileno de la Corriente de Humboldt (Franco-Meléndez, 2012).



Figura 3. Munida (*Pleuroncodes monodon*).
Fuente: Instituto del mar de Perú (IMARPE).



Figura 4. Distribución de *Pleuroncodes monodon* entre Perú y Chile.
Fuente: Elaboración propia.

La munida forma parte significativa en la alimentación de la merluza (*Merluccius gayi peruanus*), caballa (*Scomber japonicus*), jurel (*Trachurus murphyi*), cachema (*Cynoscion analis*), bagre (*Galeichtys peruvianus*), anchoveta y tiburones, aves marinas como zarcillo (*Larosterna inca*), golondrina de mar (*Oceanodroma markami*) y guanay (*Phalacrocorax bouganvilli*) en la península de Paracas (Escobedo, 2018).

Pleuroncodes monodon es una especie heterosexual con marcado dimorfismo sexual; los machos presentan el primer y segundo par de pleópodos adaptados como órganos copuladores (Gutiérrez y Zúñiga, 1977). Su período de muda es durante el verano y su período reproductivo es entre las estaciones de otoño e invierno, existiendo mayor presencia de hembras ovígeras (Flores, Queirolo & Tomasoni, 2017).

2.1.2. Carotenoides

Los carotenoides son hidrocarburos poliinsaturados que consisten de una cadena de carbonos con varios dobles enlaces conjugados, la estructura esta ciclada en uno o ambos extremos para formar anillos cíclicos llamados ionona. La constitución de la serie de dobles enlaces conjugados ocasiona la variabilidad de las longitudes de onda absorbidas que dan origen a la característica de los colores que van del amarillo al rojo (Shahidi & Brown, 1998).

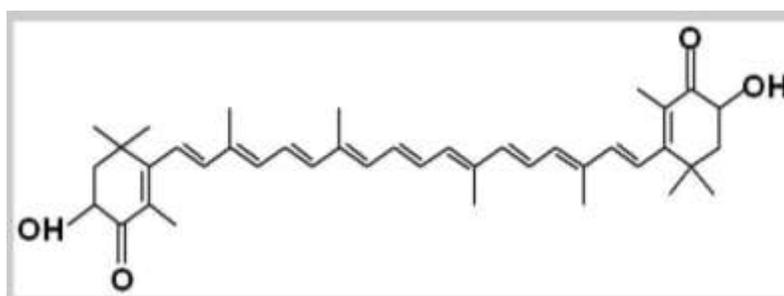
Los carotenoides son liposolubles, manifiestan una amplia gama de colores amarillos y rojos en productos vegetales y animales. Su distribución en la naturaleza es muy abundante; en organismos vivos, los carotenoides desempeñan funciones importantes, como la coloración del cuerpo, tejidos, o fluidos biológicos, permitiendo de ese modo la adaptación al ambiente; la presencia de estos colorantes en los animales es el resultado de los hábitos alimenticios, absorción, transformaciones metabólicas y simbiosis (Shahidi & Brown, 1998). Los pigmentos carotenoides existen en forma libre disueltos en la fracción lipídica del tejido vegetal, formando complejos con proteínas, unidos a hidratos de carbono por medio de un enlace glucosídico, o como ésteres de ácidos grasos, la asociación con proteínas los hace más estables, sin embargo, los carotenoides puros son inestables en presencia de oxígeno, la pérdida de color es la

característica más usual de su propia oxidación; existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales ejemplo: β caroteno, licopeno y las xantofilas que contienen oxígeno en sus anillos terminales ejemplo: luteína, astaxantina (Armenta, 2002).

- **Astaxantina**

La astaxantina es abundante en la naturaleza, especialmente en los ambientes marinos es sintetizada sólo por microalgas y levaduras que después pasan a ser parte de la cadena alimenticia, es un pigmento conocido por provocar el tinte rojoroso en la carne de los salmónidos, a la vez en el camarón, langostas y cangrejo; sin embargo, estas especies acuáticas no pueden sintetizar a la astaxantina por lo que tienen que adquirirlos a través de su alimento (Armenta, 2002).

La astaxantina es una xantofila roja de tipo carotenoide, su denominación IUPAC es 3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione (Figura 5), su fórmula



molecular es $C_{40}H_{52}O_4$ y peso molecular de 596.84 g/mol (Ambati, Phang, Ravi & Aswathanarayana, 2014).

Figura 5. Estructura de la molécula de astaxantina.
Fuente: Ambati *et al.* (2014).

La molécula de astaxantina tiene dos carbonos asimétricos localizados en las posiciones 3 y 3 de los anillos benzoicos sobre cualquiera de las partes finales o extremos de la molécula, los estereoisómeros (3S, 3'S) y (3R, 3'R) son los más abundantes en la naturaleza, *Haematococcus* biosintetiza el isómero (3S, 3'S) mientras que la levadura *Phaffia rhodozyma* produce el isómero (3R, 3'R) (Hussein, Sankawa, Goto, Matsumoto & Watanabe, 2006). La astaxantina sintética comprende isómeros de (3S, 3'S) (3R, 3'S) y (3R, 3'R). El estereoisómero primario de astaxantina que se encuentra en el krill antártico *Euphausia superba* es 3R, 3'R que contiene principalmente forma esterificada, mientras que en el salmón del Atlántico salvaje es 3S, 3'S que se presenta como la forma libre (Ambati *et al.*, 2014). En la Tabla 2 se muestra contenido de astaxantina de algunas especies.

Tabla 2

Contenidos de astaxantina de algunas especies

Fuente de Astaxantina	Concentración de astaxantina (partes por millón)
Salmónidos	13
Plancton	60
Krill	120
Camarones árticos (<i>P. borealis</i>)	1 200

<i>Phaffia rhodozyma</i>	10 000
<i>Haematococcus pluvialis</i>	40 000

NOTA: Fuente: Capelli & Ding (2018).

La astaxantina protege las células contra la oxidación al detener los radicales libres para prevenir las reacciones en cadena, se ha demostrado que la astaxantina es significativamente más efectiva para neutralizar los radicales libres que el betacaroteno y protege mejor contra la peroxidación de los ácidos grasos que la mayoría de los otros antioxidantes potentes. Se ha demostrado que la capacidad antioxidante de las astaxantinas es aproximadamente 10 veces más fuerte que otros carotenoides como la luteína, la zeaxantina y el betacaroteno (Miki, 1991). La astaxantina ha llamado la atención por su potencial bioactivo que incluye su actividad antioxidante, anti cancerígena, antidiabética y antiinflamatoria (Fassett & Coombes, 2011).

2.1.3. Extracción con solventes orgánicos y Fluidos supercríticos

En la extracción con solventes orgánicos se puede incluir el método soxhlet y maceración, siendo el soxhlet la técnica estándar y principal referencia para evaluar el rendimiento de otros métodos de extracción sólido - líquido (De Castro y García-Ayuso, 1998). Sin embargo, para las extracciones se necesita un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el solvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de

recuperación de la corriente de extracto y bajo costo (Dahlstrom *et al.*, 1997). Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicas (Zarnowski & Suzuki, 2004).

En la extracción de astaxantina es común el uso de solventes orgánicos como acetona, isopropanol, metanol, etanol, hexano y combinaciones de estos, sin embargo, estos tipos de extracciones presentan inconvenientes como el uso de altas temperaturas, altos costo de energía y elevados tiempos de extracción, lo cual perjudica la calidad de la astaxantina obtenida, además, genera una gran cantidad de desechos de solventes. Se ha descrito que la astaxantina es más polar en comparación con otros carotenoides, y el hexano podría no ser una de las mejores opciones, ya que puede conducir a la cristalización de compuestos polares (Routray *et al.*, 2019). Además, el hexano está ubicado como el número uno en la lista de los 189 contaminantes del aire más riesgosos por la Agencia Americana de Protección del ambiente (Mamidipally & Liu, 2004).

Debido a los problemas asociados con la extracción con solventes, se ha despertado un creciente interés en desarrollar métodos más simples, más rápidos y más eficientes para la extracción de carotenoides de alimentos y productos naturales; entre los cuales destaca la extracción utilizando fluidos supercríticos, el cual ha demostrado ser una de las técnicas más atractivas para el tratamiento de muestras sólidas (López, Arce, Garrido, Ríos & Valcárcel, 2004).

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico (Figura 6 y Tabla 3), tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un

líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción; los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Brunner, 2005; Rozzi & Singh, 2002).

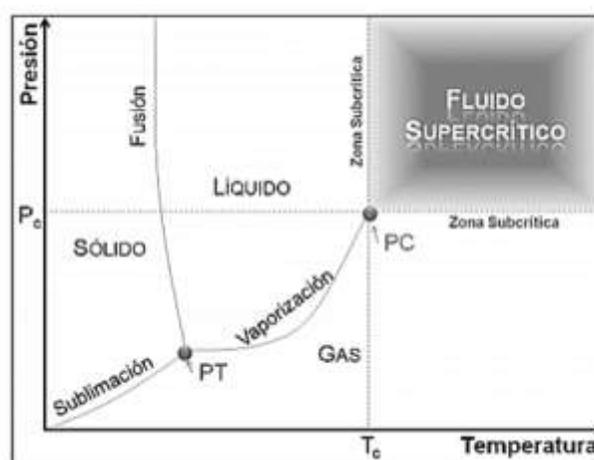


Figura 6. Diagrama de fases sólido – líquido – gas.
 *PT: Punto triple, PC: punto crítico P_c : presión crítica; T_c temperatura crítica.

Fuente: Luque de Castro, Valcárcel y Tena (1993).

Según Velasco *et al.* (2007), el proceso de extracción mediante fluidos supercrítico cuenta con cuatro etapas básicas indispensables que son:

- Etapa de presurización: con el fin de alcanzar la presión necesaria del solvente para la extracción que se requiere ya sea por medio de un compresor o de una bomba.
- Etapa de ajuste de temperatura: remoción o adición de energía térmica ya sea con un intercambio de calor, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el fluido comprimido a la temperatura de extracción requerida.

- Etapa de extracción: Es llevada a cabo en un recipiente extractor a alta presión, el cual contiene la matriz que será procesada. En esta etapa, el fluido entra en contacto con la matriz y arrastra el soluto deseado.
- Etapa de separación: Es mediante la cual se separa la sustancia extraída del solvente.

La extracción con fluidos supercríticos (FSC) es una tecnología moderna; con aplicaciones cada vez mayores en la industria de transformación farmacéutica y alimentaria (Mendes, Nobre, Cardoso, Pereira & Palavra, 2003).

Tabla 3

Propiedades críticas de algunas sustancias

Fluido	T _C (°C)	P _C (bar)	ρ (kg/m ³)
Acetileno	36	62,47	232,14
Acetona	235	47	278
Agua	374	220,9	322,6
Dióxido de carbono	31	73,86	467,6
Etano	32	48,71	135,75
Etanol	240,4	61,4	276
Etileno	9	0	195,8
Metano	-83	45,95	161,43
Metanol	239,4	80,9	272
Propano	97	42,47	225,6
Propileno	91,8	46	232

Nota. *ρ: densidad.

Fuente: Velasco *et al.* (2007).

El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja

residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, siendo estas sus ventajas en comparación con los solventes orgánicos (Velasco *et al.*, 2007). En la Tabla 4 puede observarse las ventajas y limitaciones al utilizar solventes orgánicos y CO₂ supercrítico. La viscosidad del CO₂ supercrítico es menor que la viscosidad de los solventes orgánicos convencionales, lo que da como resultado caídas de presión más bajas en las tuberías que transportan los fluidos y en los recipientes de lecho compacto, facilitando el contacto entre las dos fases fluidas y contribuyendo a la mejor transferencia de masa (Erkey, 2011).

Tabla 4

Ventajas y limitaciones de extracción con solventes y CO₂ supercrítico

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	VENTAJAS	LIMITACIONES
Extracción con solventes orgánicos (éter de petróleo, hexano, acetona, etc)	Uso de temperaturas bajas no provoca termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Posibilidad de separación de componentes individuales.	Costoso, contaminante del ambiente, riesgo de incendio y explosión. Difícil separar completamente el solvente sin alterar la composición del aceite.
Extracción con CO ₂ supercrítico	Alto rendimiento ecológicamente limpio. No es toxico. No deja residuos. Fácil separación de sustancias.	Menor estabilidad oxidativa del aceite obtenido debido a la ausencia de fosfátidos que en algunos casos protegen al aceite de la autooxidación. Alta inversión inicial.

No daña térmicamente los compuestos.	En algunas extracciones es necesario el uso de un cosolvente.
Los compuestos pueden ser utilizados en la elaboración de alimentos.	

Nota. Fuente: Gil y Sáez (2005); Velasco *et al.* (2007).

2.1.4 Metales pesados: Plomo y Cadmio

Unos de los procesos de contaminación marina de mayor preocupación son de carácter químico, derivado del proceso de industrialización o urbanización, debido a que se vierten a los cuerpos de agua, esto representa un riesgo inaceptable para la salud humana y el medio ambiente; entre los contaminantes se puede mencionar a los metales pesados, dichos contaminantes son adquiridos a través de la cadena alimenticia, son potencialmente peligrosos como el Plomo, Cadmio y Mercurio; y están estrictamente regulados por la Unión Europea y los Estados Unidos (Mamani, 2019).

Los contaminantes marinos potencialmente más tóxicos son los denominados metales pesados, cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua, tanto los elementos de transición como algunos elementos de los grupos III, IV, V y VI de la tabla periódica son comúnmente conocidos como metales pesados. Dichos metales se encuentran en forma natural en la corteza terrestre en diferentes concentraciones (Mamani, 2019).

Así mismo, la ingesta de metales pesados por los organismos acuáticos depende del hábitat y hábitos alimenticios, las especies filtradoras y organismos planctónicos están más expuestos a los metales pesados disueltos en agua o asociados a partículas.

Por otra parte, los sedimentívoros y la miofauna, captan los metales al ingerir partículas sedimentarias y las aguas asociadas a los poros del sedimento (Salomons, Kerdijk, Van Pagee, Klomp & Schreur, 1988).

- Cadmio (Cd)

Es un metal tóxico y no esencial para el organismo, que se acumulan en los tejidos, se absorbe por las vías respiratoria y digestiva. Las intoxicaciones por cadmio resultan de la exposición ambiental e industrial. Además de hallarse en estas actividades profesionales, el cadmio se encuentra en algunos alimentos en el humo del tabaco y en el aire atmosférico de las aglomeraciones urbanas. El cadmio es tóxico para todos los sistemas y funciones humanas o animales. Tiende a ser almacenado en hígado, riñón y pulmones (Vallejos, 2015).

Una fuente natural importante de Cd a la zona costera son las surgencias, las cuales transportan metales disueltos y particulados de las aguas más profundas hacia las aguas costeras superficiales, se relaciona los altos valores de Cd en el bivalvo *Mytilus californianus* con la presencia de surgencias (Segovia-Zavala, Delgadillo, Muñoz-Barbosa, Gutiérrez-Galindo, 2004). Otra fuente natural de Cd a la atmósfera, es la actividad volcánica que es la mayor proporción, por lo que en el ambiente marino los volcanes submarinos y las fuentes hidrotermales de las cordilleras mesoocéánicas contribuyen con emisiones significativas (Frías-Espéricueta, Osuna-López, Aguilar-Juárez y Voltolina, 2010).

El cadmio tiene muchas aplicaciones industriales por lo que su liberación al medio ambiente se ve incrementada por la acción del hombre (quema de combustibles fósiles, metalurgia, incineración de basuras) y por el uso de fertilizantes a base de fosfatos y de lodos residuales (Mamani, 2019). Según Unión Europea Reglamento (CE) N° 488/2014 de la Comisión, de 12 de mayo de 2014, que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L138, 13 de mayo de 2014. El límite máximo para consumo de crustáceos es de 0,5 mg/kg peso fresco, siendo el único límite declarado en cuanto a crustáceos.

- Plomo (Pb)

El plomo es un metal resistente a la corrosión, denso, dúctil y maleable y con un bajo punto de fusión, por lo cual ha sido utilizado desde la antigüedad y ha acompañado al hombre en su crecimiento económico (Frías-Espéricueta *et al.*, 2010).

Su origen natural se encuentra en pequeñas cantidades en la corteza terrestre, puede encontrarse en todas partes en el medioambiente, gran parte proviene de actividades humanas como la quema de combustibles fósiles, la explotación minera y la manufactura; el plomo tiene muchos usos diferentes. Se usa en la fabricación de pilas, municiones, productos de metal (soldaduras y tuberías) y en aparatos para proteger contra los rayos X. Debido a inquietudes

relacionadas con la salud, en los últimos años se ha reducido considerablemente la cantidad de plomo en pinturas, productos cerámicos, materiales para calafatear y para soldar tuberías; la toxicidad del Plomo se debe sobre todo a su forma química, siendo en general las formas inorgánicas menos tóxicas que las orgánicas (Mamani, 2019).

El plomo puede causar daños en el sistema de múltiples órganos, sean neurológicos, cardiovasculares, renales, gastrointestinales, hematológicos y efectos en la reproducción. La exposición a corto plazo a altos niveles de plomo puede causar vómitos, diarrea, convulsiones, coma e incluso la muerte. A largo plazo la exposición al plomo en los seres humanos da lugar a efectos en la sangre, sistema nervioso central (SNC), presión arterial, los riñones y el metabolismo de la vitamina D (Rodríguez, 2013).

La Unión Europea en el reglamento (CE) 2015/1005 de la comisión del 25 de junio de 2015 menciona el contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios, siendo el límite máximo en crustáceos de 0,5 mg/kg en peso fresco, y en cuanto a límite máximo para grasas y aceites es de 0,1 mg/kg.

2.1.5 Ácidos grasos

En términos generales, se distinguen dos tipos de aceites según su origen: los obtenidos a partir de semillas y/o frutos de origen terrestre y los obtenidos a partir de vegetales (algas) y animales (peces, crustáceos, moluscos y mamíferos) de origen marino. Ambos tipos de aceites están igualmente constituidos por mezclas de

triglicéridos cuyos principales componentes son los ácidos grasos (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Los ácidos grasos que componen los aceites en general son ácidos grasos saturados (AGS) e insaturados (AGI). Los insaturados a su vez pueden ser monoinsaturados (AGMI) o poliinsaturados (AGPI). Desde el punto de vista de su uso nutricional, los AGPI se clasifican a su vez en las llamadas familias o series de ácidos grasos. Las tres familias más importantes son el omega-9, omega-6 y omega-3. La denominación omega deriva de la última letra del alfabeto griego, denotando que la enumeración de los ácidos grasos se realiza desde el carbono extremo terminal de la molécula (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Los aceites de origen marino se caracterizan por su alto contenido de ácidos grasos omega-3, llamados ácidos poliinsaturados grasos omega-3 de cadena larga (AGPICL), siendo los más importantes el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico, el beneficio del consumo de EPA se asocia principalmente con la protección de la salud cardiovascular, principal causa de muerte en el mundo occidental; el consumo diario de EPA disminuye los triglicéridos y el colesterol sanguíneo, ambos son un determinante importante de riesgo cardiovascular. El EPA, además, baja la presión vascular y tiene efectos antitrombóticos y antiinflamatorios, así mismo, el consumo de DHA es fundamental para la formación y función del sistema nervioso y visual de los humanos y mamíferos en general (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Por otro lado, en los crustáceos una de las fuentes importantes de EPA y DHA es el krill. El aceite de krill se caracteriza por su alto contenido de fosfolípidos, tiene

una alta proporción de EPA y DHA, especialmente de este último ácido graso, por lo cual son altamente valorados en el mercado de los alimentos funcionales y nutracéuticos (Valenzuela, Valenzuela, Sanhueza, De la Barra y Morales, 2014).

CAPITULO III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Investigación de tipo experimental.

3.2. Ámbito temporal espacial

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios Físico - Químico y en el laboratorio de servicio tecnológico del equipo extractor multisolvente (Fluidos supercríticos) de la Dirección de Investigación Desarrollo Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT) del Instituto Tecnológico de la producción (ITP).

3.3. Variables

3.3.1. Variables de extracción

- Variables independientes: Técnicas de extracción con solventes orgánicos y con CO₂ supercrítico.

- Variables dependientes: Contenido de astaxantina en el extracto oleoso de munida (μg de astaxantina/g muestra seca) se representó como $\mu\text{g Ast/g ms}$, contenido de plomo y cadmio (mg/kg) y porcentaje de ácidos grasos (%).

3.4. Población y muestra

3.4.1. Selección de muestra

Se consideró para la selección de la muestra la “Lista de crustáceos de Perú (decápoda y stomatocopa)” (Chirichigno, 1970), la “Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca” (Fisher, Krupp, Schneider, Sommer, Carpenter y Niem, 1995) y la “Guía Ilustrada para el reconocimiento de invertebrados capturados en la pesquería de arrastre” (Zavalaga, Santamaría y Palacios, 2019).

3.4.2. Procedencia de la muestra

Se capturó la munida en la zona sur del Perú con Latitud $18^{\circ} 6' 34''$ Longitud $70^{\circ} 48,24'$ (Figura 7), y fue almacenada en las cámaras de congelación de la embarcación.



Figura 7. Ubicación geográfica de la zona de captura de munida.
Fuente: Elaboración propia.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Materiales

- Bagueta
- Balón de vidrio de 125 mL
- Balón para rotavapor de 500 mL
- Bandeja metálica
- Botellas ámbar de 100 y 250 mL
- Celda de cuarzo de 10 mm
- Crisol de porcelana
- Dedal de celulosa
- Desecador
- Gel Pack
- Microtubos de 2 mL

- Fiolas ámbar de 10, 25 y 50 mL
- Frascos de vidrio 250, 500 y 1000 mL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla de vapores orgánicos
- Matraz de Erlenmeyer de 125 y 250 mL
- Matraz de Erlenmeyer esmerilado de 250 mL
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel toalla
- Parafilm
- Perlas de vidrio
- Pesafiltro
- Pipetas pasteur de plástico de 3 mL
- Probeta de 10 y 100 mL
- Probeta esmerilada de 100 mL
- Soporte universal
- Tamiz de 0,85 mm
- Tips de 100, 1000 y 5000 mL
- Tubos de centrifuga de 50 mL

3.5.2. Equipos

- Agitador vórtex plano (M16700, Barnstead International, USA)
- Analizador de mercurio (M-800, Quick Trace, USA) (Anexo 1)

- Balanza analítica (DV214CD, Ohaus, USA)
- Balanza de plataforma (AFM, Sores, Perú)
- Balanza de precisión (AMD, 6100, Japón)
- Baño termostático (MEMMERT, WNB 7- 45, Alemania)
- Campana extractora (ChemGARD FH5, The Baker Company, USA)
- Centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Brasil)
- Chiller (ProfiCool Primus PCPR 013, Lab, Alemania)
- Congeladora vertical (CS-20, Torrey, Perú)
- Cromatógrafo de gases (Autosystem XL, Perkin Elmer, USA) (Anexo 1)
- Destilador por arrastre de vapor (Vapodest 10S, Gerhardt, Alemania)
- Digestor Kjeldahl (Kjeldatherm KB20S, Gerhardt, Alemania)
- Equipo de absorción atómica (AAAnalyst 800, Perkin Elmer, USA) (Anexo 1)
- Equipo extractor multisolvente (modelo 2802.0000, Top Industrie, Francia) (Anexo 1).
- Espectrofotómetro UV/VIS (UV - 200 S, Shimadzu, Japón)
- Estereoscopio (SMZ-168, Motic, China)
- Estufa de convección natural (ED 115, Binder, Alemania)
- Evaporador rotatorio (Laborota 4003, Heidolph, Alemania)
- Hormilla de plancha (KI 8/16, Gerhardt, Alemania)
- Micropipeta regulable de 10 a 100 μL y 100 a 1000 mL (Labopette, Hirschmann, Alemania)
- Micropipeta regulable de 500 a 5000 mL (Isolab)
- Molino analítico (A 11 Basic, IKA, USA)

- Mufla (F48000, Barnstead International, USA)
- Refrigeradora (NR-BT48, Panasonic, Japón)
- Secador de aire frio (CV-20AN, ASAHI, Japón)
- Sellador de bolsas (SF-300S, Samwin, Perú)
- Selladora al vacío (C200, Multivac, Alemania)
- Sistema de agua ultrapura (D11911, Barnstead International, USA)

3.5.3. Reactivos

- Acetona (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico 36,5 - 38 %, ACS (J.T. Backer, USA)
- Ácido sulfúrico 95 - 98 %, PA (Scharlau, Alemania)
- Agua destilada Q.P. (Palacio de aguas, Perú)
- Alcohol isopropilico, HPLC (Fisher Scientific, USA)
- Argón Ultra puro (Indura, Perú)
- Azul de metilo, ACS (J.T. Backer, USA)
- Dióxido de Carbono líquido (Indura, Perú)
- Estándar de astaxantina 98,6 % (Dr Ehrenstofer, Alemania)
- Etanol absoluto, PA (Merck, Alemania)
- Éter de petróleo (35 - 60 °C), ACS (Tedia, USA)
- Hexano, ACS (Fermont, México)
- Hexano, ACS (Fermont, México)
- Hidrógeno de alta pureza (Indura, Perú)
- Lead Plasma Emission Standard ICP 1000 µg/mL (AccusStandard, USA)
- Mix de ésteres metílicos de ácidos grasos C4-C24 (Sigma-Aldrich, USA)

- Nitrógeno Ultra puro (Indura, Perú)
- Nitrógeno Ultra puro (Linde, Perú)
- Solución estándar de cadmio 1000mg/L Cd (Merck, Alemania)
- Solución estándar de mercurio 1000mg/L Hg (Merck, Alemania)

3.6. Procedimientos

3.6.1. Caracterización de la munida

- **Identificación de la munida (*Pleuroncodes monodon*)**

Se utilizó un estereoscopio para visualizar la munida e identificarla según las referencias de Chirichigno (1970), Fisher *et al.* (1995), y Zavalaga *et al.* (2019) como se muestra en la Figura 8.

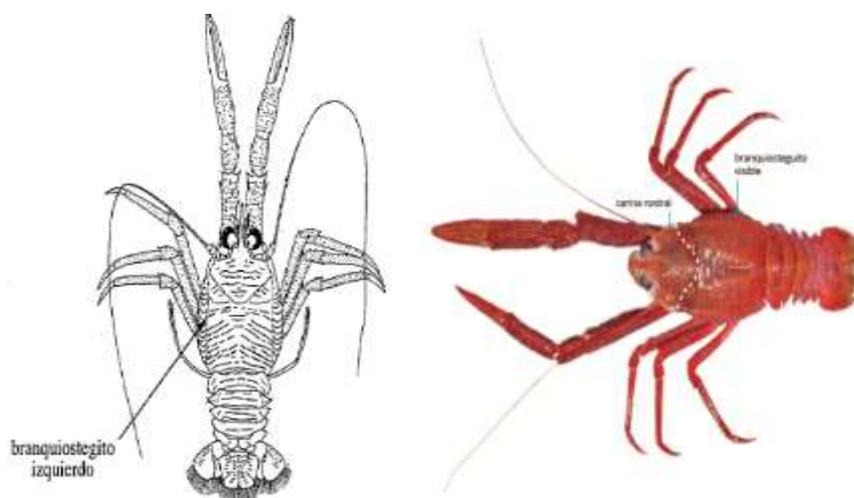


Figura 8. Característica de género *Pleurocondes*.

Fuente: Fisher *et al.* (1995); Zavalaga, Santamaría y Palacios (2019).

- **Caracterización biométrica**

Para la caracterización de la munida se realizó la biometría (Anexo 2) considerando las medidas de Ancho del cefalotórax (AC), Largo del cefalotórax (LC) y el Largo total (LT) según Gutiérrez y Zuñiga (1977) (Figura 9).

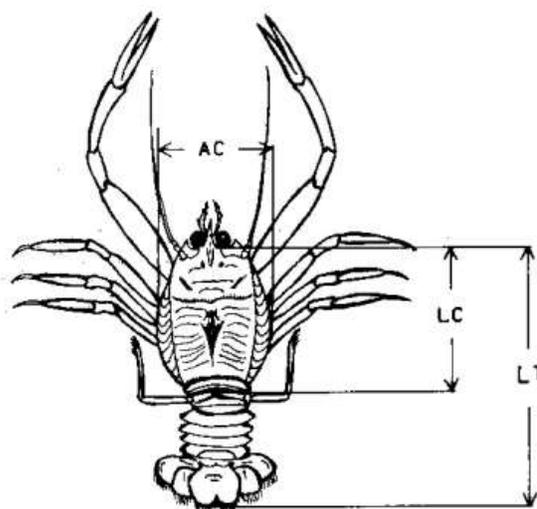


Figura 9. Ejes de medidas considerados AC: Ancho del cefalotórax; LC: Largo del Cefalotórax; LT: Largo Total. Fuente: Gutiérrez y Zuñiga (1977).

- **Análisis fisicoquímicos**

Se realizó la composición químico proximal de la munida fresca (MF), munida seca (MS) y el residuo de munida (RM) de la extracción con CO₂ supercrítico, los cuales comprendieron los siguientes análisis:

- **Determinación de humedad:** Según el método descrito por la FAO (1986) (Anexo 3).
- **Determinación de Grasa:** Según el método descrito por la FAO (1986) (Anexo 4).

- **Determinación de Proteína:** Según el método Kjeldahl descrito por la FAO (1986) (Anexo 5).
- **Determinación de Ceniza:** Según el método descrito por la FAO (1986) (Anexo 6).

3.6.2. Determinación de astaxantina

Se pesó 50 mg del extracto oleoso de munida en una fiola de 10 mL, se enrazó con hexano (Sánchez-Camargo, Martínez-Correa, Paviani & Cabral, 2011). Se realizó una dilución 1/10 de la solución anterior y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de 472 nm por ser el pico de mayor absorbancia en el barrido del espectro.

Se preparó una solución estándar de astaxantina en acetona (250 µg/mL), a partir de la cual se prepararon 5 soluciones a concentraciones entre 1 a 5 µg/mL para elaborar la curva estándar en fiolas ámbar de 10 mL enrazadas con hexano. Se graficó la curva estándar (Anexo 7) y se realizó el análisis de regresión lineal para la cuantificación de astaxantina expresada como µg de astaxantina/g de muestra seca.

3.6.3. Determinación de metales pesados

Se realizaron determinaciones de metales pesados: cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) a la munida fresca (MF), residuo de munida (RM), y a cada uno de los extractos oleosos obtenidos.

- **Determinación de Plomo (Pb)** según el Método acreditado LABS-ITP-FQ-007-09 - AÑO 2009 (validado por ITP). La muestra es carbonizada y luego llevada a 450 °C en un horno mufla hasta la calcinación de la materia orgánica, la cuantificación del Pb se realizó por espectroscopia de

absorción atómica, técnica de llama. Se empleó el equipo Perkin Elmer AAnalyst 800.

- **Determinación de Cadmio (Cd)** según el método acreditado LABS-ITP-FQ-004-09 – AÑO 2009 (validado por ITP), la muestra es carbonizada y luego llevada a 450 °C en un horno mufla hasta la calcinación de la materia orgánica, la cuantificación del cadmio se realizó por espectroscopia de absorción atómica, técnica de llama. Se empleó el equipo Perkin Elmer AAnalyst 800.
- **Determinación de Mercurio (Hg)** según el Método acreditado LABS-ITP-FQ-006-09 - Año 2009 (validado por ITP). Se empleó el equipo Quick Trace M-800.

3.6.4. Perfil de Ácidos Grasos

Se determinó según Método LABS-ITP-FQ-002-98 - Año 1998. Los viales con los ácidos grasos metilados de las muestras se colocaron en el autosampler del cromatógrafo de gases. La temperatura del inyector fue de 250 °C, y la del detector de ionización de llama (FID) fue de 270 °C. Se utilizó una columna Supelcowax 10 de sílice fundida de 30 m de longitud, 0,25 µm de espesor y 0,25 mm de diámetro interno. Se utilizó gas hidrógeno como gas de arrastre y una presión de 10 psi.

El horno del cromatógrafo de gases empezó con una temperatura de 90 °C, la cual se mantuvo por 2 min, para posteriormente seguir la siguiente rampa de temperatura: hasta 180 °C a razón de 30 °C/min y se mantuvo esta temperatura por 10 min, pasado este tiempo se incrementó la temperatura hasta 220 °C a razón de 1 °C/min

y finalmente se incrementó hasta 230 °C a razón de 2 °C/min. Se empleó el equipo Perkin Elmer AutoSystem XL Gas Chromatograph.

3.7. Análisis de datos

Se recibieron las muestras de munida congelada en el muelle del Callao de una de las embarcaciones de IMARPE, se mantuvo la cadena de frío hasta llegar a las instalaciones de ITP y posteriormente fueron colocadas dentro de mallas plásticas y éstas en las bandejas del secador de aire frío de 20 - 21 °C, a las 12 horas de secado se movieron las mallas para ayudar al secado. Después de 27 horas se detuvo el secado al presentar humedad de 9 - 10 %, la munida seca fue colocada en bolsas y almacenadas en congelación a -18 °C, posteriormente fueron trituradas en un molino analítico, pasadas por un tamiz de 0,85 mm, selladas al vacío y almacenadas en temperatura de congelación (-18 °C) hasta el momento de la extracción del pigmento (Figura 10 y Anexo 8).

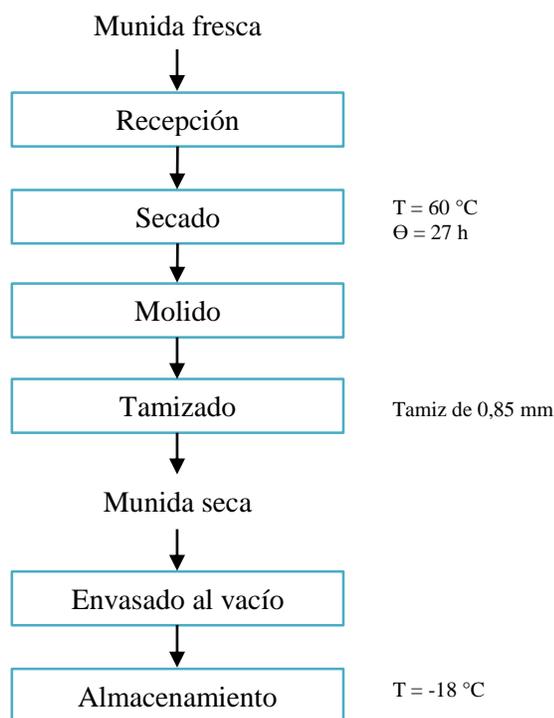


Figura 10. Flujo para la obtención de la munida seca.
Fuente: Elaboración propia.

3.7.1. Obtención del extracto oleoso

Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado.

A.- Extracción con solventes orgánicos

- Extracción hexano: alcohol isopropílico (60 %)

Se utilizó la metodología Sánchez-Camargo *et al.* (2011) y se realizaron ciertas modificaciones.

Se realizó siguiendo la metodología de Sánchez-Camargo *et al.* (2011), con modificaciones. Se pesó 48g de munida seca (MS) y se distribuyó proporcionalmente en 6 tubos falcón de 50 mL, se adicionó para cada tubo 33 mL del solvente se llevó a vortex por 2 min, reposo 5 min, sonicación a 25 °C por 10 min, centrifugación por 40 min a 5000 RPM a 4 °C se recuperó el sobrenadante protegiéndolo de la exposición a la luz. Al precipitado se realizó la misma extracción hasta la decoloración del precipitado, pero con un tiempo de centrifugación de 20 min, se agregaron todos los sobrenadantes en un frasco de vidrio graduado, para luego ser colocado en el evaporador rotatorio a 40 °C y 100 mbar, se retiró el balón y se terminó de evaporar el solvente con nitrógeno hasta peso constante, el extracto oleoso resultante fue guardado en atmósfera de nitrógeno, hasta su posterior análisis.

- Extracción con acetona

Se utilizó la metodología de Aravena (2011), con modificaciones se procedió a pesar 48 g de munida seca, se distribuyó en tubos falcón, se añadió

200 mL acetona, se llevó a vortex por 2 min, se centrifugó a 6400 RPM por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. El procedimiento se repitió de 2 a 3 veces hasta que la MS quedó completamente decolorada. El solvente fue separado en un evaporador rotatorio a 40 °C y 100 mbar, luego se retiró el balón y se terminó de evaporar el solvente con nitrógeno hasta peso constante, finalmente el extracto oleoso resultante fue guardado en atmósfera de nitrógeno ultra puro, hasta su posterior análisis..

- Extracción con etanol absoluto

Se utilizó la metodología del Instituto Tecnológico de la Producción (parámetros de extracción protegidos por el ITP). Se pesó 48 g de muestra seca (MS), en un frasco de vidrio y se mezcló con etanol absoluto, se colocó en un baño termostático, se procedió a filtrar el extracto teniendo cuidado de exposición a la luz, el extracto etanólico fue colocado en un evaporador rotatorio a 40 °C y 60 mbar, el solvente residual fue eliminado con nitrógeno. El extracto oleoso fue recolectado y guardar en atmósfera de nitrógeno hasta su posterior análisis.

B.- Extracción por Fluidos Supercrítico CO₂

Para la obtención del extracto oleoso de munida se colocaron 48 g de la muestra seca dentro de la celda de extracción, la cual se colocó en el equipo multisolvente.

Se realizaron extracciones a la temperatura y presión supercrítica, con un flujo de CO₂ de 40g/min y con etanol absoluto (parámetros de T y P son protegidos por el ITP).

El extracto etanólico recolectado se llevó a un evaporador rotatorio con una temperatura de 40 °C y 60 mbar para eliminar el etanol, se inyectó directamente nitrógeno por 2 min, el extracto oleoso fue dejado en una campana desecadora hasta peso constante. Finalmente, fue guardado en congelación (-18 °C) hasta su posterior análisis (Figura 11).

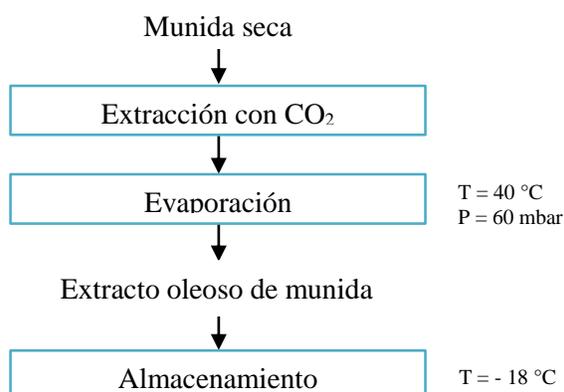


Figura 11. Flujo para la obtención del extracto oleoso de munida.
Fuente: Elaboración propia.

3.8. Análisis de datos estadísticos

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa Statgraphics Centurión XVI.version 16.1.03.

3.8.1. Caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida

Los datos de biometría se analizaron estadísticamente con la prueba t de student para muestras independientes con un nivel de significancia del 5 %. El supuesto de

normalidad de datos fue verificado por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se utilizó la prueba de Levene para verificar la homogeneidad de varianzas de los datos.

3.8.2. Comparación de los contenidos de astaxantina extraídos por métodos convencionales y con CO₂ supercrítico

Se realizó un diseño estadístico de 1 factor con 4 tratamientos y 4 repeticiones.

Unidad experimental: Extracto oleoso de munida.

Factor Tratamiento: 4 niveles: Extracciones con Hexano:alcohol isopropílico, Acetona; Etanol y CO₂ supercrítico.

Factor respuesta: Contenido de Astaxantina.

A los datos del contenido de astaxantina se le aplicó el análisis de varianza, seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia del 5 %. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para verificar los supuestos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas, respectivamente.

3.8.3. Comparación de los contenidos de metales pesados

A los datos de plomo y cadmio se les realizó el análisis de varianza y la prueba de comparación de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia del 5 %.

3.8.4. Perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos de munida

Se analizaron los porcentajes de omega 3, ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y la suma de los ácidos grasos EPA y DHA del perfil de ácidos grasos, se realizó el análisis de varianza y la prueba de comparación de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia del 5 %.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida

En la Figura 12 se muestra la visualización de la munida a través del estereoscopio.



Figura 12. Vista a través del estereoscopio de *Pleuroncodes monodon*.

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 5 se muestra el promedio y moda del ancho del cefalotórax (AC), largo del cefalotórax (LC) y largo total (LT) de 100 munidas tanto hembras como machos.

Tabla 5

Biometría de la munida (P. monodon)

Ejes de medidas	Machos			Hembras		
	Promedio (mm)	Moda	Rango	Promedio (mm)	Moda	Rango
Ancho del cefalotórax	9,93 ± 1,19 ^a	10	7 – 12	10,15 ± 1,19 ^a	11	7 – 13
Largo del cefalotórax	16,66 ± 1,89 ^a	17	11 – 26	16,60 ± 2,23 ^a	17	12 - 20
Largo total	29,31 ± 3,59 ^a	30	22 – 37	30,59 ± 3,48 ^b	30	20 - 36

Nota. Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 100).
 Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0,05).
 Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 6 se muestra resultado de la composición química proximal de la MF, MS y RM después de la extracción con CO₂ supercrítico.

Tabla 6

Composición química proximal de MF, MS, RM (g/100g ms)

Análisis	Munida fresca (MF)	Munida seca (MS)	Residuo de munida (RM)
Humedad (%)	73,57 ± 0,07	9,17 ± 0,04	16,48 ± 0,55
Grasa (%)	6,06 ± 0,08	23,16 ± 0,01	0,42 ± 0,02
Ceniza (%)	7,59 ± 0,09	15,15 ± 0,05	26,37 ± 0,15
Proteína (%)	10,69 ± 0,11	34,50 ± 0,01	44,20 ± 0,28

Nota: Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2).

Fuente: Elaboración propia, realizado en: LABS- ITP 2019.

4.2. Comparación de los contenidos de astaxantina de los extractos obtenidos por métodos convencionales y con CO₂ supercrítico

En la Tabla 7 se muestran los contenidos de astaxantina por extracto y por muestra seca.

Tabla 7

Contenido de astaxantina por extracto y por muestra seca

Método	Astaxantina (µg Ast/g extracto)	Astaxantina (µg Ast/g muestra seca)
Hexano: Alcohol isopropílico (60 %)	3 378,23 ± 53,15 ^a	781,25 ± 12,29 ^a
Acetona	4 373,31 ± 129,22 ^b	869,55 ± 25,69 ^b
CO ₂ supercrítico – Etanol	3 022,31 ± 94,23 ^c	735,03 ± 22,92 ^c
Etanol	2 464,28 ± 45,91 ^d	662,47 ± 12,34 ^d

Nota: Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 4).

Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencia significativa (p < 0,05).

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Comparación de los contenidos de metales pesados

En la Tabla 8 se muestra el contenido de plomo (Pb), cadmio (Cd) y mercurio (Hg), para MF, MS y RM; y en la Tabla 9 se muestra los contenidos de Pb y Cd en los extractos oleosos de munida extraídos con Hexano:alcohol isopropílico, acetona, etanol y con CO₂ supercrítico.

Tabla 8

Contenidos de plomo, cadmio y mercurio (mg/kg) de la MF, MS y RM

Metales pesados (mg/kg)	Munida Fresca (MF)	Munida seca (MS)	Residuo Munida (RM)
Plomo	0,11 ± 0,01	0,32 ± 0,02	1,96 ± 0,04
Cadmio	2,06 ± 0,02	5,80 ± 0,07	9,13 ± 0,08
Mercurio	0,01 ± 0,0	-	-

Nota: Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2).
Fuente: Elaboración propia, realizado en: LABS- ITP 2019.

Tabla 9

Contenido de plomo, cadmio para cada extracción (mg/kg)

Metales	Hexano:Alcohol isopropílico (60 %)	Acetona	Etanol	CO ₂ supercrítico
Plomo	0,16 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^c	0,09 ± 0,01 ^b
Cadmio	0,09 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^d

Nota: Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2).
Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0,05).
Fuente: Elaboración propia; realizado en: LABS- ITP 2019.

4.4. Perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos de munida

Los ácidos grasos de los extractos oleosos obtenidos con hexano: alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO₂ supercrítico se muestran en la Tabla 10, las unidades se refieren al porcentaje de ácido graso contenido en 100 g de extracto oleoso. Los cromatogramas se muestran en el Anexo 9.

Tabla 10

Ácidos grasos (%) de los extractos oleosos de munida obtenidos con hexano: alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO₂ supercrítico

Ácidos grasos	Solventes de extracción			
	Hexano:Alcohol isopropílico	Acetona	Etanol absoluto	CO ₂ supercrítico
C14:0 (Mirístico)	3,84 ± 0,15	4,07 ± 0,12	4,23 ± 0,01	4,23 ± 0,00
C14:1 (Miristoleico)	0,18 ± 0,00	Nd	nd	Nd
C15:0 (Pentadecaenoico)	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,00	Nd
C16:0 (Palmítico)	20,67 ± 0,30	20,39 ± 0,24	20,71 ± 0,07	21,92 ± 0,01
C16:1 (Palmitoleico)	6,78 ± 0,13	7,23 ± 0,10	7,12 ± 0,02	6,94 ± 0,03
C17:0 (Heptadecaenoico)	2,62 ± 0,00	2,59 ± 0,12	2,46 ± 0,09	2,86 ± 0,02
C17:1 (Cis-10-Heptadecenoico)	0,80 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,34 ± 0,00	0,15 ± 0,00
C18:0 (Esteárico)	2,81 ± 0,00	2,49 ± 0,01	2,52 ± 0,02	2,82 ± 0,02
C18:1 ω-9 (Oleico)	12,28 ± 0,01	12,19 ± 0,01	12,16 ± 0,07	12,46 ± 0,02
C18:1 ω-7 (Vaccenico)	4,15 ± 0,05	4,08 ± 0,00	4,12 ± 0,04	4,31 ± 0,01
C18:2 ω-6 (Linoleico)	1,36 ± 0,00	1,28 ± 0,00	1,35 ± 0,01	1,34 ± 0,01
C18:3 ω-6 (γ-Linolénico)	0,71 ± 0,01	0,75 ± 0,00	0,69 ± 0,01	0,72 ± 0,01

C18:3 ω -3 (α -Linolénico)	0,94 \pm 0,00 ^a	0,93 \pm 0,00 ^a	0,95 \pm 0,02 ^a	0,86 \pm 0,00 ^b
C18:4 ω -3 (Estearidónico)	5,42 \pm 0,35 ^a	5,39 \pm 0,01 ^a	5,48 \pm 0,04 ^a	5,17 \pm 0,01 ^a
C20:0 (Araquídico)	0,45 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00	0,36 \pm 0,00	0,46 \pm 0,02
C20:1 ω -9 (Eicosaenoico)	0,88 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01	0,79 \pm 0,01	0,82 \pm 0,01
C20:2 (Eicosadienoico)	0,25 \pm 0,06	Nd	nd	0,22 \pm 0,01
C20:3 ω -6 (Eicosatrienoico)	nd	Nd	nd	0,64 \pm 0,00
C20:3 ω -3 (Eicosatrienoico)	0,61 \pm 0,01 ^a	0,54 \pm 0,01 ^b	0,66 \pm 0,03 ^a	Nd
C20:4 ω -6 (Araquidónico)	0,30 \pm 0,01	Nd	nd	Nd
C20:5 ω -3 (Eicosapentaenoico)	10,76 \pm 0,11 ^a	10,44 \pm 0,05 ^b	11,15 \pm 0,07 ^c	10,92 \pm 0,01 ^a
C22:6 ω -3 (Docosahexaenoico)	18,83 \pm 0,33 ^a	18,50 \pm 0,18 ^a	18,91 \pm 0,12 ^a	19,72 \pm 0,01 ^b
Saturados	30,77 \pm 0,46 ^a	30,35 \pm 0,26 ^a	30,67 \pm 0,01 ^a	32,27 \pm 0,03 ^b
Monoinsaturados	25,05 \pm 0,06 ^a	24,55 \pm 0,08 ^b	24,52 \pm 0,13 ^b	24,67 \pm 0,01 ^b
Poliinsaturados	39,16 \pm 0,85 ^a	37,82 \pm 0,23 ^a	39,17 \pm 0,30 ^a	39,58 \pm 0,05 ^a
EPA + DHA	29,59 \pm 0,43 ^{a,b}	28,94 \pm 0,23 ^a	30,06 \pm 0,19 ^{b,c}	30,64 \pm 0,03 ^c

Nota. nd: no detectado; Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n = 2).

Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0,05).

Fuente: Elaboración propia.

CAPITULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Caracterización biométrica y caracterización fisicoquímica de la munida

5.1.1. Identificación de la munida

Al visualizar y comparar la munida fresca con la imagen publicada por Fisher *et al.* (1995) y Zavalaga *et al.* (2019) se verificó que cumplía con las características biológicas de la especie *Pleuroncodes monodon*, las cuales como indica Zavalaga *et al.* (2019) son un caparazón con sutura cervical muy notoria, rostro delgado y puntiagudo, sin espinas, con una espina supraocular muy pequeña, branquiosteguito visible dorsalmente; los quelípedos simétricos, algo alargados, con tubérculos y setas cortas y suaves.

5.1.2. Biometría

No existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las medias del ancho cefalotórax de las munidas macho y hembra, tampoco del largo del cefalotorax. Sin embargo, las medias del largo total de las munidas macho y hembra presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) según la prueba de Student-Newman-Keuls (Anexo 10); la munida hembra presentó el largo total mayor que la munida macho.

El rango de las mediciones de LC fue de 12 a 20, y 11 a 26 mm para las munidas hembra y macho, respectivamente, encontrándose dentro de los rangos de 5 a 24 y 5 a 27 mm para munidas macho y hembra, respectivamente, valores reportados por IMARPE (2017a). La moda de las mediciones de LC fue de 17 mm para ambos

géneros, similar a lo reportado por Paredes y Elliot (1997). Sin embargo, los mismos autores registraron mediciones de LC y modas superiores para *P. monodon* en el mar de Chile (Anexo 11).

5.1.3. Composición proximal

La munida fresca presentó un contenido de humedad de 73,57 % (bh), siendo similar al contenido de 74,2 % (bh) obtenido por Albrecht-Ruiz y Cueto (2005). Se tienen referencia de la especie *Pleuroncodes planipes*, la cual habita en la plataforma continental al oeste de México, reportándose para esta especie contenidos de humedad de 73,05 % (Salas-Durán, Chacón-Villalobos y Zamora-Sánchez, 2015) y 83,01 % (Rodríguez y Chavarría-Solera, 2017). La munida seca presentó un contenido de humedad de 9,17 % (bh) después del proceso de secado al que fue sometido para obtener un mejor rendimiento de extracción de astaxantina, debido a que como menciona Cornejo (2011), los carotenoides son solubles en compuestos orgánicos apolares y en muestras con alto contenido de humedad la extracción óptima de los carotenoides se ve dificultada, siendo mejor disminuir la humedad; otros autores reportan contenidos de humedad para muestra seca de *P. planipes* de 6,65 % (Civera *et al.*, 1995) y 11,30 % (Salas-Durán *et al.*, 2015).

En cuanto al contenido de ceniza, la MF presentó un valor de 7,59 % (bh); Albrecht-Ruiz y Cueto (2005) obtuvo un contenido de cenizas del 4,7 % (bh) para *P. monodon*; y Rodríguez y Chavarría-Solera (2017) un contenido 1,51 % para *P. planipes*. Sin embargo, para la MS el contenido de ceniza fue de 15,15 % (bh); se tiene referencia la langostilla mexicana (*P. planipes*) seca con valores reportados en el rango de 12,8 a 3,9 %, un elevado contenido de ceniza es debido principalmente a los

minerales presentes en forma de carbonatos y fosfatos en el exosqueleto del crustáceo (Castro-González, Carillo-Domínguez y Pérez-Gil, 1995).

El contenido de grasa obtenido para la MF fue de 6,06 % (bh); Albrecht-Ruiz (2005) obtuvo un contenido de 6,5 % (bh) para *P. monodon*; mientras que Rodríguez y Chavarría-Solera (2017) reportaron un contenido de 1,16 % en *P. planipes*. Por otra parte, la MS presentó un contenido de 23,16 %, el cual es superior al valor de 11,05 % reportado por Civera *et al.* (1998) y Salas-Durán *et al.* (2015) en muestra seca de *P. planipes*; las diferencias de contenido graso podría deberse a la alimentación y a la variedad de la especie (Castro-González *et al.*, 1995).

El contenido de proteína en la MF fue de 10,69 % (bh), similar al contenido reportado por Albrecht-Ruiz y Cueto (2005), pero inferior al 13,51 % mencionado por Rodríguez y Chavarría-Solera (2017) en *P. planipes*. En cuanto a la MS, el contenido de proteínas fue de 34,50 % (bh), menor a los valores reportados por Castro *et al.* (1995) y mayor a los reportados por Salas-Durán *et al.* (2015) en *P. planipes*.

Asimismo, en la Tabla 6 se puede observar la composición proximal de la munida después de haber realizado la extracción por la técnica de fluidos supercríticos, en el cual se aprecia una disminución significativa del contenido de grasa.

5.2. Comparación de los contenidos de astaxantina extraídos por métodos convencionales y con CO₂ supercrítico

Los contenidos de astaxantina de los extractos oleosos presentan una distribución normal, además cumplen con los supuestos del análisis de varianza (normalidad de errores y homogeneidad de varianza) (Anexo 12).

Se determinó que existe diferencia significativa en el contenido de astaxantina de los extractos obtenidos con los diferentes solventes ($p < 0,05$).

En la Tabla 7 y en la Figura 13 se muestran los contenidos de astaxantina de cada uno de los extractos.

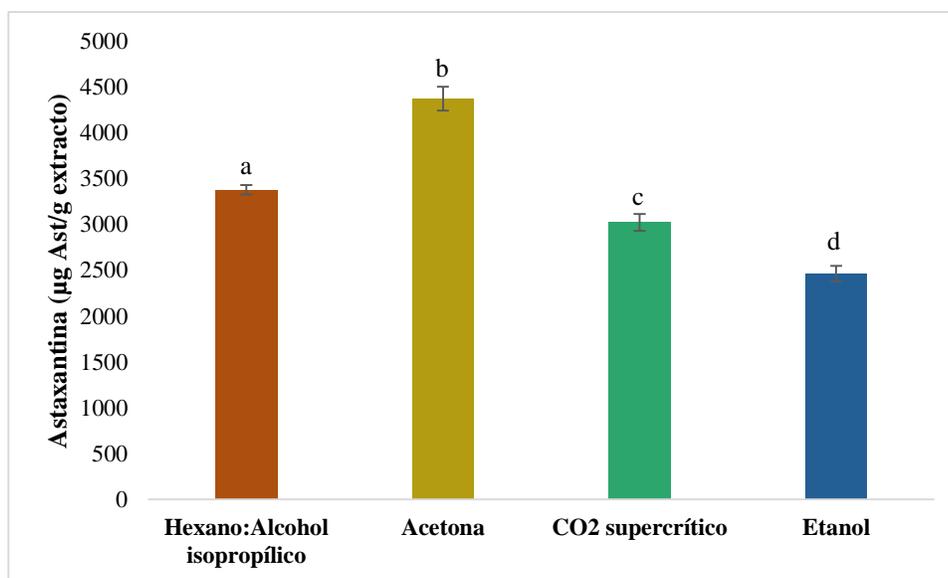


Figura 13. Contenido de astaxantina de los extractos oleosos obtenidos con hexano:alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO₂ supercrítico. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

El mayor contenido de astaxantina se encontró en el extracto oleoso obtenido con acetona, seguido por el obtenido por hexano:alcohol isopropílico, CO₂ supercrítico y etanol. Los diferentes resultados pueden deberse a la polaridad de la molécula de astaxantina, la cual es más polar en comparación que a otros carotenoides, por lo que los solventes polares son generalmente un buen medio de extracción, mientras que los solventes no polares no son recomendados (Dalei & Sahoo, 2015); resultados similares han sido reportados por Gimeno *et al.* (2007), Dalei & Sahoo (2015) y Xie *et al.* (2017), quienes obtuvieron mayor contenido de astaxantina en extractos oleosos obtenidos con acetona que con etanol en diferentes

muestras de crustáceos, esto es debido a que la acetona tiene la polaridad más baja que el etanol, siendo el solvente más apropiado para disolver las moléculas solubles en grasa como la astaxantina, debido a la presencia de grupos carbonilos en la acetona, los cuales facilitan la solubilidad de la astaxantina por presentar grupos carbonilos (Ruen-ngam *et al.*, 2010).

Asimismo, se encontró diferencia significativa en el contenido de astaxantina de los extractos expresados por gramo de muestra seca obtenido en los diferentes solventes ($p < 0,05$) (Anexo 13).

Según Morales & Calvo (1987) en su investigación con la especie *Solenocera agassizzi* obtuvo 1042 μg astaxantina/g por gramo de extracto, siendo inferior a lo encontrado en esta investigación.

Los contenidos de astaxantina por gramo de muestra seca de mayor a menor siguieron el siguiente orden: extracción con acetona, hexano:alcohol isopropílico, CO_2 supercrítico y etanol (Tabla 6 y Figura 14).

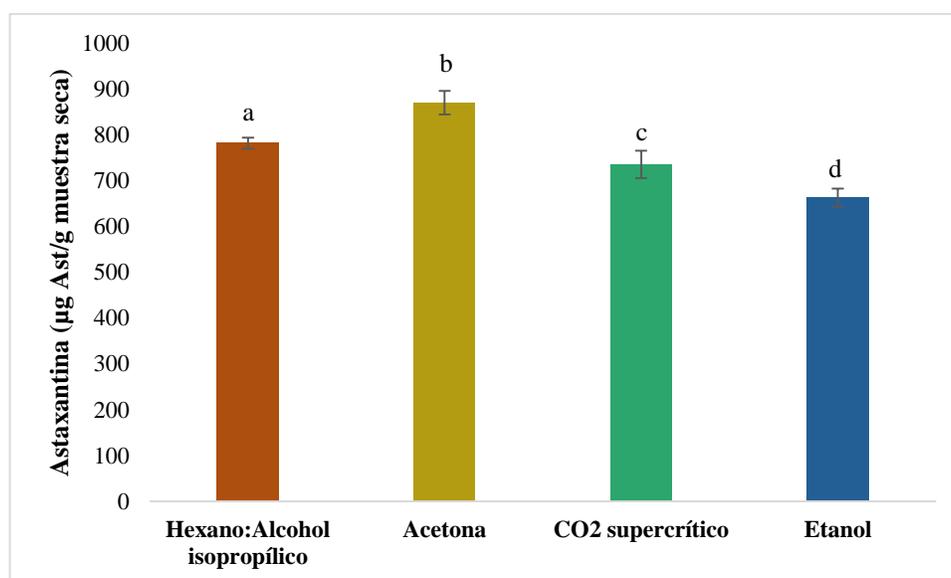


Figura 14. Contenido de astaxantina por gramo de muestra seca obtenidos con hexano:alcohol isopropílico, acetona, etanol y CO_2 supercrítico.

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia.

Se tiene referencias de estudios realizados a otras especies los cuales arrojan un valor superior como es el caso Bustamante, Roberts, Aravena & Del Valle; Aravena (2011) para Microalga (*Haematococcus pluvialis*) en un rango de (1 814 - 1 169 μg de astaxantina/g de muestra seca), sin embargo, para Molino *et al.* (2018) encontró un valor inferior para la misma especie, Sánchez-Camargo *et al.* (2011) reportaron para *Litopenaeus vannamei* un valor de 70,2 μg de astaxantina/g de muestra seca, valor inferior según lo obtenido en la investigación para *P. monodon*.

5.3. Comparación de los contenidos de plomo y cadmio

5.3.1. Contenido de plomo y cadmio en MF y RM

En la Tabla 8 y la Figura 15 se observa la cantidad de plomo para la munida fresca la cual se encuentra por debajo del contenido máximo aceptado en crustáceos según la legislación de la unión europea de contaminantes químicos en productos alimentarios (UE, 2014; 2015). Sin embargo, el contenido de cadmio se encuentra por encima del límite aceptable para el consumo humano.

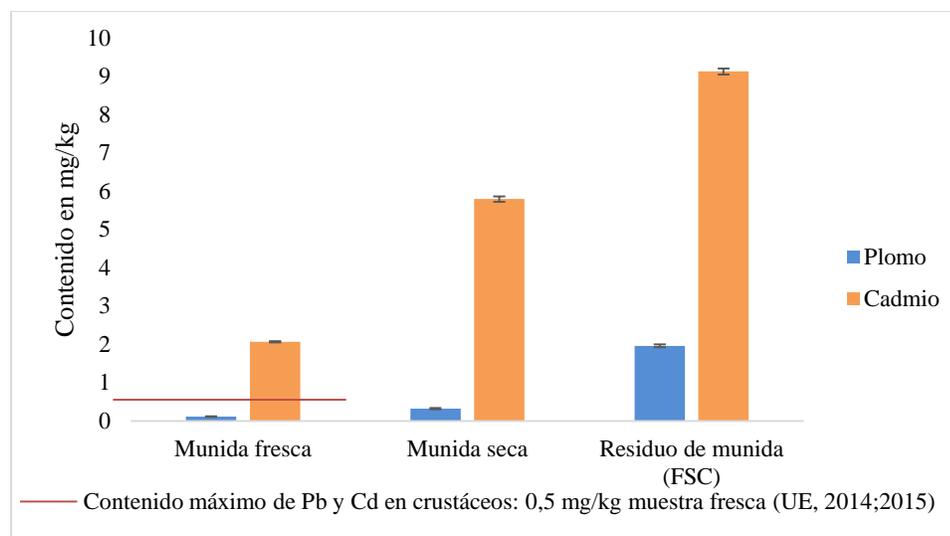


Figura 15. Contenido de plomo y cadmio en MF, MS y RM.
Fuente: Elaboración propia.

Espinoza-García (2016) reportó contenidos de cadmio y plomo de 3,67 y 0,38 mg/kg en *P. planipes*, respectivamente. Estos valores son inferiores a los reportados en la presente investigación para *P. monodon*, sin embargo, las dos especies superan el límite máximo permitido por la CE (2014, 2015) para muestra fresca.

5.3.2 Contenido de plomo y cadmio de los extractos de munida

En la Tabla 8 y la Figura 16 se observa la cantidad de plomo y cadmio en los extractos oleosos obtenidos por las extracciones con solventes orgánicos y CO₂ supercrítico (Anexo 14).

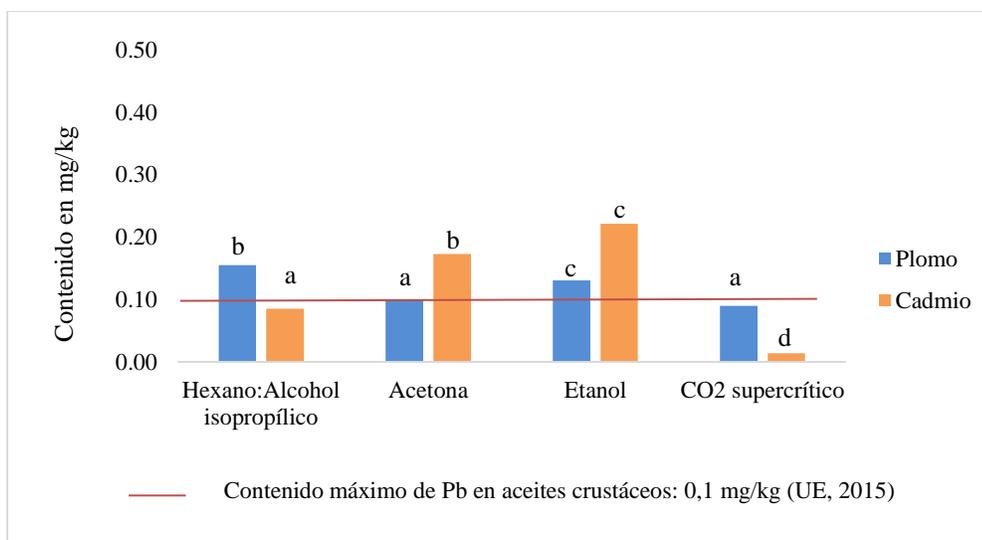


Figura 16. Contenido de plomo y cadmio en los extractos oleosos obtenidos con diferentes solventes. Fuente: Elaboración propia.

Según los análisis estadísticos realizados (Anexo 14) se demuestra que existe diferencia significativa entre los extractos oleosos obtenidos. En todos los extractos oleosos los valores de cadmio se encontraron por debajo del contenido máximo aceptado en crustáceos y en sus derivados según la legislación de la Unión Europea de contaminantes químicos en productos alimentarios (UE, 2014).

El extracto oleoso obtenido por fluidos supercríticos evidencia un menor contenido de plomo y cadmio, lo cual concuerda con el resultado obtenido según la Figura 15, el cual muestra un mayor contenido de plomo y cadmio en el residuo de munida, mostrando una ventaja del uso de los fluidos supercríticos en la obtención de pigmentos.

5.4. Perfil de ácidos grasos

En la Tabla 10 se puede apreciar el perfil de ácidos grasos de los extractos oleosos, siendo el palmítico el ácido graso predominante en todos los extractos.

Respecto a los ácidos grasos omega 3, el extracto oleoso obtenido con CO₂ supercrítico presentó diferencia significativa ($p < 0,05$) en los contenidos de ácidos α -Linolénico y docosahexaenoico, con respecto a los otros extractos. En el caso del ácido graso estearidónico no presentó diferencia significativa entre los extractos, para el ácido graso eicosatrienoico el mayor valor fue de los extractos oleosos obtenidos por hexano:alcohol isopropílico y etanol, y en el ácido graso eicosapentaenoico el mayor valor fue del extracto oleoso obtenido con etanol (Anexos 15 y 16).

El extracto oleoso obtenido mediante la extracción con CO₂ supercrítico presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados que los demás extractos oleosos, respecto a los ácidos grasos monoinsaturados no presentó diferencia significativa ($p > 0,05$) con los extractos obtenidos con etanol y acetona, y a pesar de no presentar diferencia significativa en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados con los demás extractos oleosos, presentó un mayor contenido de EPA y DHA que los extractos obtenidos con hexano y acetona, lo cual es muy favorable, debido a que al ser incluido en dietas para salmónidos elevaría el valor nutritivo del producto y no se utilizaría solventes orgánicos en la obtención del extracto (Anexos 17, 18 y 19). De igual manera es beneficioso para el ser humano ya que se ha demostrado que el EPA y el DHA son eficaces en el tratamiento y prevención de variadas enfermedades, tales como cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, inflamatoria intestinal y artritis reumatoidea (Valenzuela *et al.*, 2011).

El contenido de EPA y DHA obtenido para *P. monodon* fue de 30,64 %, valor superior a los obtenidos por Xie *et al.* (2017) en aceite de krill (28,66 %) y al reportado por Salas, Ayala y Albrecht (2003) en aceite de anchoveta (*Engraulis ringens*) (29,1 %).

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

- Se afirmó que la especie utilizada es *Pleuroncodes monodon* y a su vez la munida hembra presentó mayor medida de largo total que el macho.
- La munida (*Pleuroncodes monodon*) tiene un mayor contenido de grasa que de otras especies del mismo género según las referencias bibliográficas.
- El mayor contenido de astaxantina fue 4 373,31 μg de astaxantina/g extracto oleoso obtenido con acetona; y al expresarlo en gramo de muestra seca fue 869,55 μg de astaxantina/g muestra seca.
- La extracción con CO_2 supercrítico da un valor de 735,03 μg de astaxantina/g muestra seca, el cual es inferior a las extracciones con hexano: alcohol isopropílico y acetona, pero superior a la extracción con etanol absoluto.
- En la munida fresca el contenido de plomo estuvo por debajo del límite máximo para crustáceos establecido por la Unión Europea (UE), en cambio el contenido de cadmio se encontró por encima del límite.
- El extracto oleoso obtenido con extracción CO_2 supercrítico presentó contenido de plomo por debajo del límite máximo para aceites, en cambio los extractos obtenidos con extracción por hexano: isopropílico, acetona y etanol absoluto estuvieron por encima al límite.
- El extracto obtenido con CO_2 supercrítico presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos omega 3, siendo los más representativos el DHA y EPA.

- Los extractos oleosos obtenidos utilizando CO₂ supercrítico mostraron diferencias significativas en los análisis realizados en comparación con las extracciones con solventes orgánicos, siendo mayor en su contenido de astaxantina y ácidos grasos (omega 3); y menor respecto al contenido de metales pesados, además se demuestra que la munida (*P. monodon*) es un recurso que se puede aprovechar para la extracción del pigmento astaxantina y de ser incluida en las dietas de trucha arcoíris, se lograría explorar nuevos mercados con un producto totalmente orgánico.

CAPITULO VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con estudios de investigación aplicada para incorporar el extracto oleoso de munida en la formulación de dietas de salmónidos, por ejemplo, en truchas arcoíris.

CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht-Ruiz, M., y Cueto, M. (2006). Ensilaje de munida (*Pleuroncodes monodon*) para la obtención de pigmentos liposolubles. *Boletín de Investigación Instituto Tecnológico Pesquero del Perú*.7, 121-125.
- Ambati, R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. *Marine drugs*, 12(1), 128-152.
- Aravena, R. (2011). Extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* usando CO₂ supercrítico. *Santiago de Chile, Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile*.
- Armenta, R. (2002). Obtención de astaxantina a partir de residuos de camarón fermentados. *México: Universidad Autónoma Metropolitana*.
- Ayón, P.; Swartzman, G.; Espinoza, P.; Bertrand, A. (2011). Long-term changes in zooplankton size distribution in the Peruvian Humboldt Current System: conditions favouring sardine or anchovy. *Marine Ecology Progress Series*. 422:211–222.
- Boonnoun, P., Kurita, Y., Kamo, Y., Machmudah, S., Okita, Y., Ohashi, E., & Goto, M. (2014). Wet extraction of lipids and astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by liquefied dimethyl ether. *J. Nutr. Food Sci*, 4(5), 1000305.
- Britton, G. (1982). *Carotenoids*. In: *Actual food colorants*. Hendry G.A.F. and Houghton, J.D. Eds. Blakie. London pp. 141-182.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*, 67(1-2), 21-33.

- Bustamante, A., Roberts, P., Aravena, R., & Del Valle, J. M. (2011). Supercritical extraction of astaxanthin from *H. pluvialis* using ethanol-modified CO₂. Experiments and modeling. In Proceedings of the 11th International Conference of Eng Food, Athens, Greece (pp. 22-26).
- Bustamante, P. (2012). Extracción con CO₂ supercrítico de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* y cinética de su deterioro oxidativo en dos matrices lipídicas de distinto grado de instauración antes y después de su microencapsulación. *Universidad de Chile*.
- Capelli, B., & Ding, L. (2018). Natural Astaxanthin: The Supplement You Can Feel. ISBN-13, 978-0.
- Castro-González, M. I., Carillo-Domínguez, S., Pérez-Gil Romo, F. y Calvo-Carrillo, C. 1995a Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos, en La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C., pp 163-177.
- Chavez, F.; Bertrand A.; Guevara-Carrasco R., Soler P. & Csirke J. (2008). The northern Humboldt Current System: brief history, present status and a view towards the future. *Progress in Oceanography*, 79, 95-105.
- Chirichigno Fonseca, N. (1970). Lista de crustáceos del Perú: decápoda y stomatopoda con datos de su distribución geográfica. Instituto del Mar el Perú.
- Civera, R., Goytortúa, E., Rocha, S., Nolasco, H., Vega-Villasante, F., Balart, E., Amador E, Ponce, G., Colado, G., Lucero, J., Solano, J., Flores-Tom, A & Rodríguez, C. (1998). Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, La Paz, BCS, México*, 349-365.

- Cornejo Ojeda, D. A. (2011). Extracción, identificación, cuantificación y determinación de la actividad antioxidante de los carotenoides presentes en las flores de *Senna Multiglandulosa* a través de cuatro métodos de extracción, Ecuador, Sede SANGOLQUÍ – *Universidad Nacional de las Fuerzas Armadas EPSE*.
- Dahlstrom, D. A., Bennett, R. C., Emmett, R. C., Harriott, P., Laros, T., Leung, W. & Silverblatt ChE, S. J. (1997). Liquid-solid operations and equipment. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 60-125.
- Dalei, J., & Sahoo, D. (2015). Extraction and characterization of astaxanthin from the crustacean shell waste from shrimp processing industries. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(6), 2532-2537.
- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.
- Erkey, C. (2011). Fundamental aspects of supercritical fluids. In: *Supercritical fluids and organometallic compounds: from recovery of trace metals to synthesis of nanostructured materials*. Ámsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V. v. 1, p. 11-19.
- Escobedo Oblitas, R. M. D. C. (2018). Índice de abundancia para munida (*Pleuroncodes monodon*) a partir de datos de su captura incidental en la pesca industrial de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) desde 1997 a 2014, Universidad Nacional Cayetano Heredia.
- Espinoza-García, S. (2016). *Bioacumulación y biomagnificación de Cd, Hg y Pb en Mustelus henlei (Gill 1863) de la costa suroccidental de Baja California Sur* (Doctoral dissertation, Dissertation, CICIMAR-IPN).

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (1986). *Manuals of Food Quality Control: 7. Food analysis: general techniques, additives, contaminants, and composition (Vol. 7)*. Food & Agriculture Org.
- Fassett, R. G., & Coombes, J. S. (2011). Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine drugs*, 9(3), 447-465.
- Fisher, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (1995). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental. Vol. I*. 1- 646. Roma, Italia.
- FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. Actualizado 14 September 2017. Recuperado: <http://www.fao.org/fishery/>
- Flores A., Queirolo D., Tomasoni M. (2017). Estimating fecundity using image analysis in *Cervimunida johni* and *Pleuroncodes monodon*; *Fisheries Research* 190 34–42.
- Franco-Meléndez, M. T. (2012). Comportamiento reproductivo y variación de la proporción sexual de *Pleuroncodes monodon* (Crustacea: Galatheidae) en la costa peruana. *Ciencias marinas*, 38(2), 441-457.
- Frías-Espericueta, M. G., Osuna-López, J. I., Aguilar-Juárez, M., & Voltolina, D. (2010). Cadmio y plomo en organismos de importancia comercial de la zona costera de Sinaloa, México: 20 años de estudios. *CICIMAR Océánides*, 25(2), 101-110.
- Gil, P. E., y Sáez, V. A., (2005). Evaluación a escala piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía cero emisiones. *Universidad de Eafit. Medellín* 3-11.

- Gimeno, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García-Arrazola, R., Bárzana, E., & Shirai, K. (2007). One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(25), 10345-10350.
- Gutiérrez, J. y Zúñiga, O. (1977). *Pleuroncodes monodon* H. Milne Edwards en la bahía de Mejillones del sur, Chile (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Rev. Biol. Mar*, 16(2), 161-169.
- Gutiérrez, M., Ramirez, A., Bertrand, S., Móron, O., & Bertrand, A. (2008). Ecological niches and areas of overlap of the squat lobster 'munida' (*Pleuroncodes monodon*) and anchoveta (*Engraulis ringens*) off Peru. *Progress in Oceanography*, 79(2-4), 256-263.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of natural products*, 69(3), 443-449.
- Instituto del mar del Perú (2016). Crucero 1603 – 04 *Evaluación hidroacústica de recursos pelágicos*.
- Instituto del mar del Perú (2017a). Crucero 1703 – 04 *Evaluación hidroacústica de recursos pelágicos*.
- Instituto del mar del Perú (2017b). Crucero 1709 – 11 *Evaluación hidroacústica de recursos pelágicos*.
- Instituto Tecnológico de la Producción (1998). Aceites y Grasas: Cromatografía de gases. Callao, Perú.
- Instituto Tecnológico de la Producción (2009). Análisis Instrumentales. Callao, Perú.

- López, M., Arce, L., Garrido, J., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2004). Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 64(3), 726-731.
- Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., & Cases, M. V. (1993). Extracción fluidos supercríticos proceso analítico. Reverté.
- Mamani Loayza, R. M. (2019). Sistema de depuración natural de Metales Pesados, Cadmio, Plomo y Mercurio; para el Choro (*Aulacomya atra*), en el puerto de Ilo.
- Mamidipally, P. K., & Liu, S. X. (2004). First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), 122-125.
- Instituto Tecnológico de la Producción (2009). Manual de Métodos acreditados LABS-ITP-FQ,
- Mendes, R. L.; Nobre, B. P.; Cardoso M. T.; Pereira, A. P.; & Palavra, A. F.; (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 356-328.
- Meyers, S. P. (2000). Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. In *Avances en nutrición acuícola. Memorias del IV Symposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 15-18).
- Miki W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chem.* 63(1):141-146.
- Milne-Edwards, H. (1837). *Histoire naturelle des crustacés: comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux* (Vol.2). Librairie encyclopédique de Roret.
- Ministerio de la Producción (2013). Resolución Ministerial N ° 264-2013.

- Ministerio de la Producción (2018a). *Acuicultura de la Trucha Arcoiris – Importación de ovas embrionadas y su comercialización a nivel nacional*.
- Ministerio de la Producción (2018b). Resolución Ministerial N ° 487- 2018.
- Molino, A., Mehariya, S., Iovine, A., Larocca, V., Di Sanzo, G., Martino, M. Casella P, Chianese, S, & Musmarra, D. (2018). Extraction of Astaxanthin and Lutein from Microalga *Haematococcus pluvialis* in the Red Phase Using CO₂ Supercritical Fluid Extraction Technology with Ethanol as Co-Solvent. *Marine drugs*, 16(11), 432.
- Morales, D., & Calvo, M. A. (1987). Extracción del pigmento astaxantina de desechos de crustáceos. *Uniciencia*, 4(1-2), 51-56. Universidad Nacional de Heredia, Costa Rica.
- Paredes, F., Elliott, W. (1997). Estudio biológico pesquero del "camaroncito rojo" o "munida" *Pleuroncodes monodon* frente a Pucusana, Lima. IMARPE, Informe progresivo N° 57:21-34.
- Rodríguez Banguera, F. A. (2013). *Cuantificación de cadmio, plomo y níquel en agua superficial, sedimento y organismo (Mytella guyanensis) en los puentes Portete y 5 de Junio del Estero Salado Guayaquil*. Universidad de Guayaquil. Ecuador
- Rodríguez, C. F., y Solera, F. C. (2017). Composición proximal en algunas especies de pescado y mariscos disponibles en el pacífico costarricense. *Uniciencia*, 31(1), 23-28.- Universidad Nacional Puntarenas, Costa Rica.
- Routray, W., Dave, D., Cheema, S. K., Ramakrishnan, V. V., & Pohling, J. (2019). Biorefinery approach and environment-friendly extraction for sustainable production of astaxanthin from marine wastes. *Critical reviews in biotechnology*, 39(4), 469-488.
- Rozzi, N. L., & Singh, R. K. (2002). Supercritical fluids and the food industry. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1(1), 33-44.

- Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., & Pavasant, P. (2010). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 46(1), 64-70.
- Salas-Durán, C., Chacón-Villalobos, A., & Zamora-Sánchez, L. (2015). La harina de cefalotórax de camarón en raciones para gallinas ponedoras. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 333-343. *Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias*.
- Sslas, A., Alaya, M.E., Albrecht, M. (2003). Cuantificación de ácidosgrasos Omega 3 en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante los años 1996 al 2000. *Boletín de Investigación Instituto Tecnológico Pesquero del Perú*.5, 1-11.
- Saldarriaga, M. S. (2015) Análisis de la captura incidental en la pesquería industrial de cerco anchovetera en el litoral peruano durante el periodo 2003-2011. *Universidad Nacional Agraria La Molina*.
- Salomons, W., Kerdijk, H., Van Pagee, H., Klomp, R., & Schreur, A. (1988). Behaviour and impact assessment of heavy metals in estuarine and coastal zones. In *Metals in coastal environments of Latin America* (pp. 157-198). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sánchez-Camargo, A. P., Martínez-Correa, H. A., Paviani, L. C., Cabral, F. A. (2011). Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*); *The Journal of Supercritical Fluids*, 56:164-173.
- Segovia-Zavala, J. A., Delgadillo, F., Muñoz-Barbosa, A., & Gutiérrez-Galindo, E. A. (2004). Cadmium and silver in *Mytilus californianus* transplanted to an anthropogenic influenced and coastal upwelling *Marine pollution bulletin*, 48, 458-464.

- Shahidi, F. & Brown J. A. (1998). Carotenoids pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science* 38(1): 1-67.
- Sinnott, R. (1989). Keep them in the pink to stay competitive. *Fish Farmer*, 12(5), 23-26.
- Torrissen, O. J., R. W. Hardy, & K. D. Shearer. 1989. Pigmentation of salmonids Carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 209-225.
- Turner, C., Whitehand, L. C., Nguyen, T. & McKeon, T. 2004. *Optimization of a supercritical fluid extraction/reaction methodology for the analysis of castor oil using experimental design. Journal of Agricultural Food Chemistry.* 52:26-32.
- Unión Europea (UE). (2014). REGLAMENTO (UE) No 488/2014 DE LA COMISIÓN de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 138, 5.
- Unión Europea (UE). (2015). REGLAMENTO (UE) 2015/1005 DE LA COMISIÓN de 25 de junio de 2015 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 161, 5.
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., de la Barra, F., y Morales, G. (2014). Fosfolípidos de origen marino: una nueva alternativa para la suplementación con ácidos grasos omega-3. *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 433-438.
- Valenzuela, A., y Sanhueza, J. (2009). Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 36(3), 246-257.

- Valenzuela, R., Tapia, G., González, M., y Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*, 38(3), 356-367.
- Vallejos, G. M. (2015). Contaminación de alimentos marinos por cadmio en Lima, 2015. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 5(2), 1.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., y Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.
- Walpole, R., Myers, R., Myers, S., y Ye, K. (2012). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 9ª.
- Wu, H., Niu, H., Shao, A., Wu, C., Dixon, B., Zhang, J. & Wang, Y. (2015). Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases. *Marine drugs*, 13(9), 5750-5766.
- Xie, D., Jin, J., Sun, J., Liang, L., Wang, X., Zhang, W., Wang, X., & Jin, Q. (2017). Comparison of solvents for extraction of krill oil from krill meal: Lipid yield, phospholipids content, fatty acids composition and minor components. *Food chemistry*, 233, 434- 441.
- Zarnowski, R., & Suzuki, Y. (2004). Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food composition and Analysis*, 17(5), 649-663.
- Zavalaga, F., Santamaría Espinoza, J., y Palacios León, J. (2019). Guía Ilustrada para el reconocimiento de invertebrados capturados en la pesquería de arrastre. Instituto del Mar del Perú, Perú.

CAPITULO IX. ANEXOS

ANEXO 1: EQUIPOS



Analizador de mercurio Instituto Tecnológico de la Producción (ITP).
Fuente: Elaboración propia.



Cronógrafo de gases del instituto tecnológico de la producción (ITP).
Fuente: Elaboración propia.



Equipo extractor multisolvente (modelo 2802.0000, Top Industrie, Francia) del instituto tecnológico de la producción (ITP).
Fuente: Elaboración propia.



Equipo de absorción atómica del instituto tecnológico de la producción (ITP).
Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2: BIOMETRIA DE LA MUNIDA

A



B



A y B. Munida fresca (*Pleuroncodes monodon*) y Biometría
Fuente: Elaboración propia.

C



D



C y D. Munida hembra y macho (derecha e izquierda en cada foto).

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3: Determinación de humedad

Se pesó 3 g de muestra (munida seca en polvo) en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 h a 130 °C). Se secó la muestra en la estufa por 8 h a 101 °C (tiempo en el que la pérdida de peso fue constante). Posteriormente, se retiró el pesafiltro de la estufa y se dejó enfriar en un desecador por 30 min para finalmente ser pesado. El porcentaje de humedad fue determinado según la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(M - m)}{M} \times 100$$

En la que:

M = Peso inicial en gramos de la muestra.

m = Peso en gramos del producto seco.

Fuente: FAO (1986).

ANEXO 4: Determinación de grasa

Utilizando un solvente orgánico (éter de petróleo) en el equipo Soxhlet. Se pesó entre 4 a 5 g de la muestra (munida seca en polvo) sobre un papel filtro, el cual fue introducido en un dedal de celulosa con algodón, y fue colocado en el extractor Soxhlet durante 6 horas, se evaporó el éter del balón y se llevó hasta peso constante.

El porcentaje de grasa fue determinado según la siguiente fórmula:

$$Grasa (\%) = \frac{(P1 - P2)}{P} \times 100$$

P1= Peso en gramos del matraz con el extracto etéreo.

P2= Peso en gramos del matraz vacío.

P = Peso en gramos de la muestra empleada.

Fuente: FAO (1986).

ANEXO 5: Determinación de proteína

Para la etapa de digestión se pesó 1 g de muestra con precisión de 0,1 mg en papel libre de nitrógeno, se colocó en un tubo digestor, se agregó 5 g de catalizador (sulfato de cobre:sulfato de sodio 1:9) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se digirió la muestra en un digestor hasta que la solución se encontró de un color verde claro. Se dejó enfriar, se transfirió a una fiola de 100 mL y se enrazó con agua destilada.

Para la etapa de destilación se llevó el tubo digestor al destilador, en el cual se colocó un matraz de 125 mL que contenía ácido sulfúrico 0,1 N y 6 gotas de indicador Tashiro (1 g de rojo de metilo, 0,25 g de azul de metileno en 1 L de etanol). Se digesto por 5 min, tiempo en el cual se recolectó por lo menos 50 mL de solución en un matraz.

Para la etapa de titulación, el ácido sulfúrico remanente en el matraz de destilado se tituló con NaOH 0,02 N hasta viraje incoloro. Se realizó un blanco que contenía ácido sulfúrico, catalizador y papel. Finalmente, se anotaron los gastos de la titulación y el porcentaje de proteínas fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{((B - S) \times N \times F \times 0,014 \times 20)}{M} \times 100 \times Fc$$

Donde:

B: Gasto (mL) de solución de hidróxido de sodio usado para el blanco

S: Gasto (mL) de solución de hidróxido de sodio usado para la muestra

N: Normalidad de NaOH

F: Factor de NaOH

0,014: meq-g de nitrógeno

20: Factor de dilución (5 mL de muestra digerida llevado a 100 mL)

M: Peso de la muestra (g)

Fc: Factor de conversión de proteínas

Los factores de conversión de proteínas utilizados fueron 6,25 para la muestra.

Fuente: FAO (1986).

ANEXO 6: Determinación de ceniza

Se pesó 5 g de muestra (munida seca en polvo), se llevó a una hornilla de plancha dentro de una campana de extractora, y se incrementó la temperatura gradualmente hasta que la muestra quede carbonizada. Posteriormente, se colocó en una mufla a una temperatura de 550 °C con suministro de aire adecuado y por 4 h. Finalmente, el crisol fue colocado en un desecador por 1 h para luego ser pesado.

El porcentaje de ceniza fue determinado según la siguiente fórmula:

$$Ceniza (\%) = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

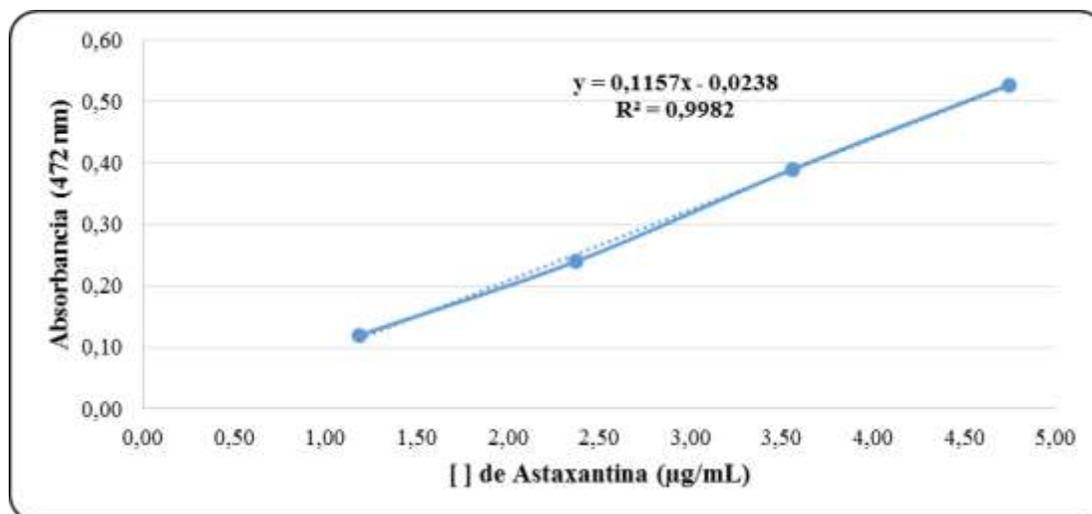
Donde:

m₀: Peso del crisol vacío (g)

m₁: Peso del crisol más la muestra (g)

m₂: Peso del crisol después de la mufla (g)

Fuente: FAO (1986).

ANEXO 7: Curva estándar para cuantificación de Astaxantina

ANEXO 8: Procedimiento para la obtención de munida seca

A



B



A y B. Recepción y pesado de la munida fresca.
Fuente: Elaboración propia.

C



D



C y D. Secado en frío de la munida fresca, luego de llegar a la humedad requerida es retirada y colocada en una caja hermética para su trituración.
Fuente: Elaboración propia.

E



F



E y F. Molido y tamizado de la munida seca.
Fuente: Elaboración propia.

G



H

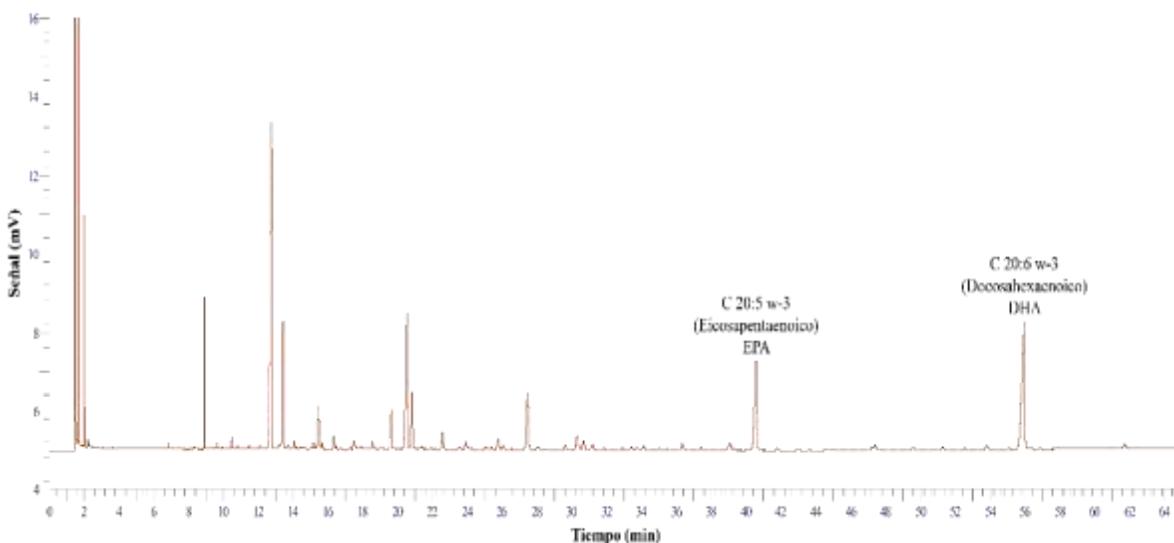


G y H. Munida sellada al vacío y almacenada en congelación.

Fuente: Elaboración propia.

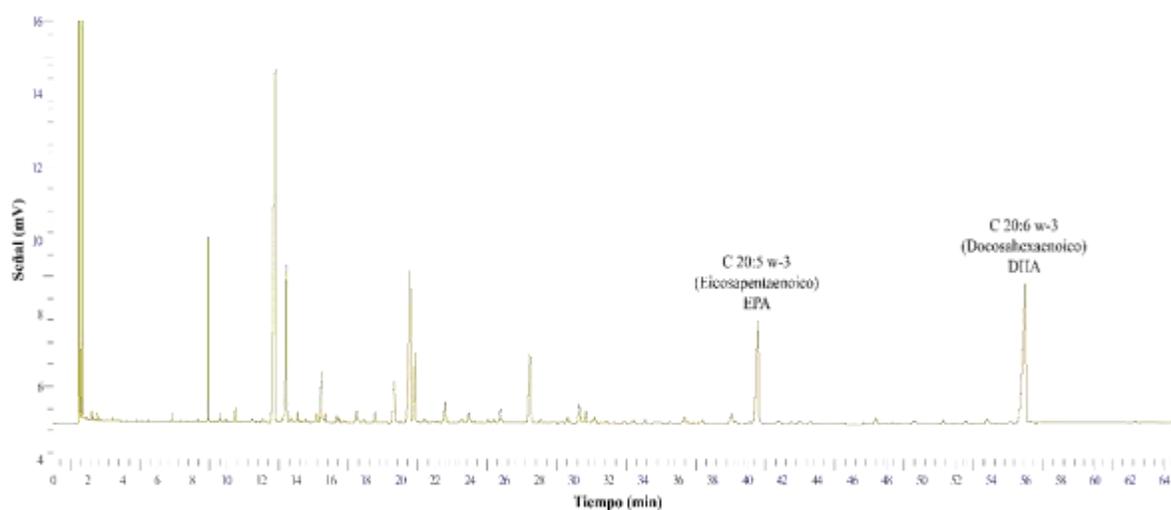
ANEXO 9: Cromatogramas de los extractos oleoso obtenido con A: Hexano :Alcohol Isopropilico, B: Acetona, C: CO₂ supercrítico, D:Etanol absoluto.

A.



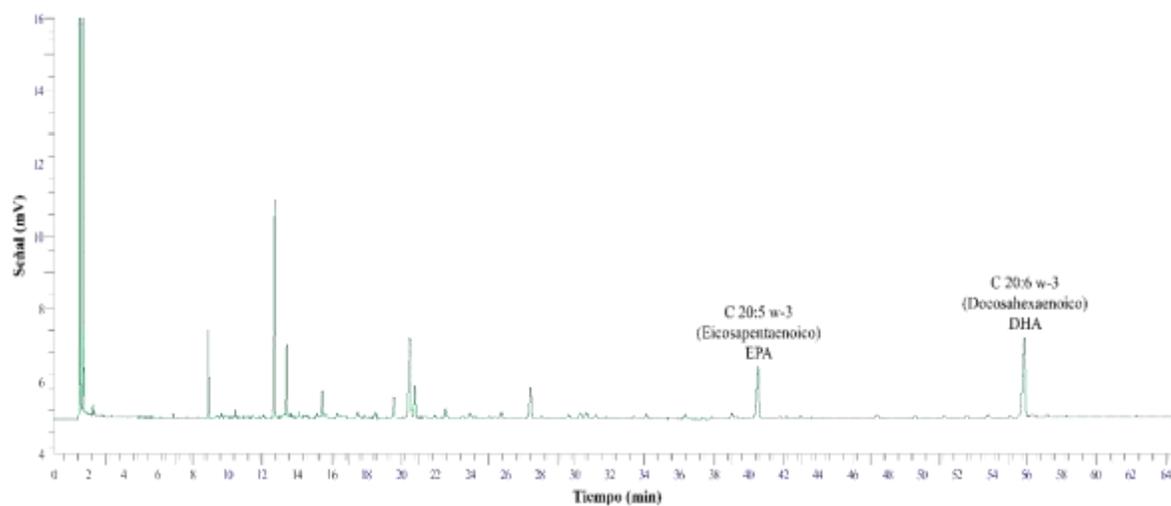
Fuente: Elaboración propia; realizado en: LABS- ITP 2019.

B.



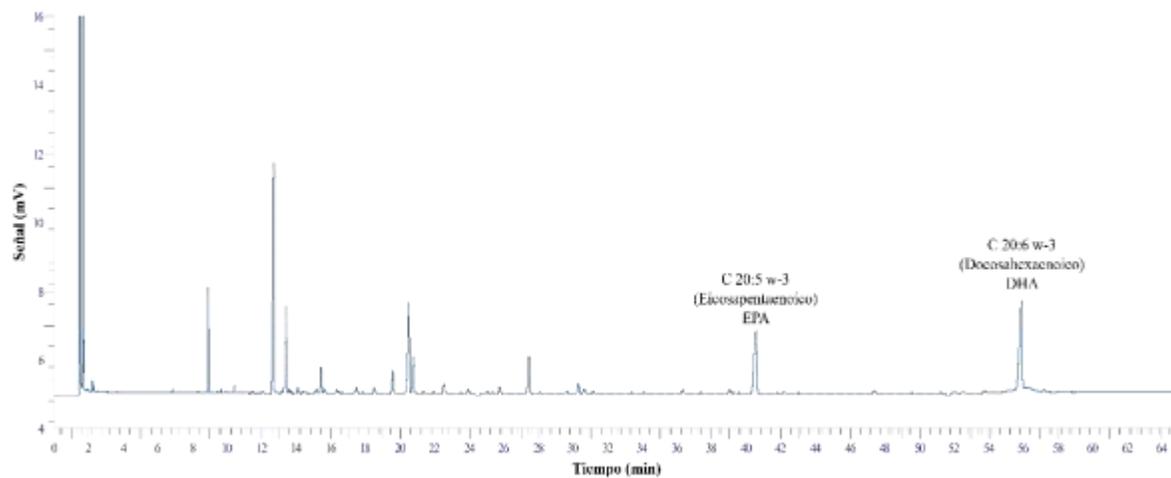
Fuente: Elaboración propia; realizado en: LABS- ITP 2019.

C.



Fuente: Elaboración propia; realizado en: LABS- ITP 2019.

D.



Fuente: Elaboración propia; realizado en: LABS- ITP 2019.

ANEXO 10: Pruebas A: Normalidad, B: Homogenidad de varianza, C: Comparación de medias de las mediciones del Ancho, largo de cefalotórax y longitud total de la munida.

A.- Prueba de normalidad - Kolmogorov-Smirnov

Ho: Los datos de las medidas de AC, LC y LT para las munidas macho y hembra siguen una distribución normal.

Ha: Los datos de las medidas de AC, LC y LT para las munidas macho y hembra no siguen una distribución normal.

	Ancho de cefalotórax		Largo de cefalotórax		Largo Total	
	Estadístico	Valor-p	Estadístico	Valor-p	Estadístico	Valor-p
Macho	0,1866	0,0019	0,1515	0,0203	0,0877	0,4322
Hembra	0,2117	0,0003	0,1611	0,0112	0,1126	0,1584

Fuente: Elaboración propia.

Debido a que el valor p es menor a 0,05 se rechaza la idea de que los datos de las mediciones de AC, LC y LT para munida macho y hembra siguen una distribución normal. Sin embargo, debido al tamaño de los datos ($n = 100$) se puede aceptar que los datos se aproximan a una distribución normal según el teorema del límite central (Walpole, Myers, Myers y Ye, 2012); lo cual es necesario para poder realizar la prueba t.

B.- Prueba de homogeneidad de varianzas para AC, LC y LT - Prueba de Levene

Ho: $\sigma^2_1 = \sigma^2_2$

Ha: $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$

	Ancho de cefalotórax	Largo de cefalotórax	Largo Total
F	1,670	0,176	0,608
p	0,198	0,675	0,437

Fuente: Elaboración propia.

Se acepta la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas para las medidas del ancho de cefalotórax, largo de cefalotórax, largo total de las munidas macho y hembra.

C.- Prueba t para comparación de medias para AC, LC y LT

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

Varianzas iguales

	Ancho de cefalotórax	Largo de cefalotórax	Largo Total
t	-1,2739	0,2052	-2,5597
p	0,2042	0,8376	0,0112

Fuente: Elaboración propia.

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$. La medición del largo total si presenta diferencia significativa para las munidas macho y hembra, sin embargo las mediciones del ancho de cefalotórax, largo de cefalotórax no presentan diferencia significativa.

ANEXO 11: Longitud de cefalotórax de la munida

Longitud de cefalotórax (mm)					
Lugar	Machos		Hembras		Referencia u observación
	Rango	Moda	Rango	Moda	
Perú	11 a 28	17	13 a 23	16 y 17	Paredes y Elliot (1997)
	7 a 30	13	7 a 23	10	IMARPE (2016)
	5 a 24	10	5 a 27	10	IMARPE (2017a)
	12 a 20	17	11 a 26	17	Costas de Tacna
Sur de Chile	14 a 45,6	25 y 31	14 a 49	23 y 27	Paredes y Elliot (1997)

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 12: A: Prueba de normalidad, B: Prueba de homogeneidad de varianza de los valores de astaxantina expresados en $\mu\text{g Ast/g}$ extracto y $\mu\text{g Ast/g}$ muestra seca contenido con hexano: alcohol isopropílico, acetona, CO_2 Supercrítico, etanol absoluto.

A.- Prueba de normalidad $\mu\text{g Ast/g}$ extracto y $\mu\text{g Ast/g}$ muestra seca - Shapiro-Wilk

Ho: Los valores de astaxantina de los extractos oleosos y muestra seca obtenidos por las extracciones con hexano:alcohol isopropílico, acetona, CO_2 supercrítico y etanol siguen una distribución normal.

Ha: Los valores de astaxantina de los extractos oleosos y muestra seca obtenidos por las extracciones con hexano:alcohol isopropílico, acetona, CO_2 supercrítico y etanol no siguen una distribución normal.

Solvente	Valor-p	
	$\mu\text{g Ast/g}$ extracto	$\mu\text{g Ast/g}$ muestra seca
Hexano:Alcohol isopropilico	0,6286	0,6291
Acetona	0,4056	0,4056
CO_2 supercrítico	0,6064	0,6066
Etanol	0,7456	0,7459

Fuente: Elaboración propia.

Debido a que el valor p es mayor a 0,05 se acepta la Ho, el contenido de astaxantina en los extractos oleosos y muestra seca obtenidos por las extracciones con hexano:alcohol isopropílico, acetona, CO_2 supercrítico y etanol siguen una distribución normal.

B.- Prueba de Homogeneidad de Varianza para $\mu\text{g Ast/g}$ extracto y $\mu\text{g Ast/g}$ munida seca -

Prueba de Levene

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

	$\mu\text{g Ast/g}$ extracto	$\mu\text{g Ast/g}$ munida seca
F	3,3310	2,1160
P	0,0564	0,1516

Fuente: Elaboración propia.

Se acepta la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas para las medidas de los datos de cuantificación de astaxantina en los extractos oleoso y muestra seca obtenida por las extracciones con hexano:alcohol isopropílico, acetona, CO_2 supercrítico y etanol.

ANEXO 13: Análisis de varianza y prueba de múltiple de los valores de astaxantina de astaxantina expresados en $\mu\text{g Ast/g}$ extracto y $\mu\text{g Ast/g}$ munida seca contenido con hexano: alcohol isopropilico, acetona, CO_2 Supercrítico, etanol absoluto.

- Tabla ANOVA para Astaxantina por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
$\mu\text{g Ast/g}$ extracto	Entre grupos	$7,73 \times 10^6$	3	$2,58 \times 10^6$	337,96	0,0000
	Intra grupos	91526,20	12	7627,19		
	Total (Corr.)	$7,82 \times 10^6$	15			
	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
$\mu\text{g Ast/g}$ munida seca	Entre grupos	90283,00	3	30094,30	80,86	0,0000
	Intra grupos	4465,96	12	372,16		
	Total (Corr.)	94748,90	15			

Se rechaza la H_0 , por lo menos uno de los de los tratamientos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Pruebas de Múltiple Rangos para Astaxantina por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

		Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
μg Ast/g extracto		Etanol absoluto	4	2464,28	X
		CO ₂ supercrítico	4	3022,31	X
		Hexano:Alcohol isopropílico	4	3378,23	X
		Acetona	4	4373,31	X
		Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
μg Ast/g munida seca		Etanol absoluto	4	662,47	X
		CO ₂ supercrítico	4	735,03	X
		Hexano:Alcohol isopropílico	4	781,25	X
		Acetona	4	869,55	X

Se rechaza la Ho, por lo menos uno de los de loa tratamientos es diferente.
Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 14: Análisis de varianza y prueba de múltiple rango para Plomo y Cadmio contenido en los extractos con hexano: alcohol isopropílico, acetona, CO₂ Supercrítico, etanol absoluto.

- Tabla ANOVA para plomo y cadmio por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Metal pesado	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Cadmio	Entre grupos	0,05095	3	0,0169833	339,67	0,0000
	Intra grupos	0,0002	4	0,00005		
	Total (Corr.)	0,05115	7			
	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Plomo	Entre grupos	0,006	3	0,002	40,00	0,0019
	Intra grupos	0,0002	4	0,00005		
	Total (Corr.)	0,0062	7			

Se rechaza la H_0 , por lo menos uno de los extractos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para Plomo y Cadmio por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Metal pesado	Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Cadmio	CO ₂ supercrítico	2	0,015	X
	Acetona	2	0,095	X
	Hexano:Alcohol isopropilico	2	0,175	X
	Etanol absoluto	2	0,225	X

	Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
	CO ₂ supercrítico	2	0,095	X
Plomo	Acetona	2	0,105	X
	Hexano:Alcohol isopropilico	2	0,135	X
	Etanol absoluto	2	0,165	X

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 15: Análisis de varianza y prueba de múltiple rango de los contenidos de ácidos grasos omega 3

A: α -Linolénico (C 18:3 ω -3)

- Tabla ANOVA para C 18:3 ω -3 (α -Linolénico) por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,0094	3	0,0031	27,96	0,0038
Intra grupos	0,0005	4	0,0001		
Total (Corr.)	0,0099	7			

Se rechaza la H_0 , por lo menos uno de los de los ácidos grasos es diferente.

- Prueba de Múltiple Rangos para C 18:3 ω -3 (α -Linolénico) por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CO ₂ supercrítico	2	0,86	X
Acetona	2	0,93	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	0,94	X
Etanol absoluto	2	0,95	X

Fuente: Elaboración propia.

B,- Estearidónico (C 18:4 ω-3)

- Tabla ANOVA para C 18:4 ω-3 (Estearidónico) por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,1093	3	0,0364	1,15	0,4318
Intra grupos	0,1271	4	0,0318		
Total (Corr.)	0,2364	7			

Se acepta la H_0 , por lo tanto no existe diferencia significativa.

- Prueba de Múltiple Rangos para C 18:4 ω-3 (Estearidónico) por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CO ₂ supercrítico	2	5,17	X
Acetona	2	5,39	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	5,42	X
Etanol absoluto	2	5,48	X

Fuente: Elaboración propia.

C- Eicosatrienoico (C 20:3 ω -3)

- Tabla ANOVA para C 20:3 ω -3 (Eicosatrienoico) por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,0157	2	0,0079	26,17	0,0126
Intra grupos	0,0009	3	0,0003		
Total (Corr.)	0,0166	5			

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para C 20:3 ω -3 (Eicosatrienoico) por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	0,54	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	0,61	X
Etanol absoluto	2	0,66	X

Fuente: Elaboración propia.

D,- Eicosapentaenoico (C 20:5 ω -3)

- Tabla ANOVA para C 20:5 ω -3 (Eicosapentaenoico) por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,5425	3	0,1808	38,27	0,0021
Intra grupos	0,0189	4	0,0047		
Total (Corr.)	0,5614	7			

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para C 20:5 ω -3 (Eicosapentaenoico) por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	10,44	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	10,76	X
CO ₂ supercrítico	2	10,92	X
Etanol absoluto	2	11,15	X

Fuente: Elaboración propia.

E,- Docosahexaenoico (C 22:6 ω-3)

- Tabla ANOVA para C 22:6 ω-3 (Docosahexaenoico) por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	1,6116	3	0,5372	13,93	0,0139
Intra grupos	0,1543	4	0,0386		
Total (Corr.)	1,7659	7			

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para C 22:6 ω-3 (Docosahexaenoico) por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	18,50	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	18,83	X
Etanol absoluto	2	18,91	X
CO ₂ supercrítico	2	19,72	X

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 16: Análisis de varianza de los ácidos grasos saturados

- Tabla ANOVA para ácidos grasos saturados por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	4,4109	3	1,4703	20,95	0,0066
Intra grupos	0,2807	4	0,0702		
Total (Corr.)	4,6916	7			

Fuente: Elaboración propia.

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es diferente

- Prueba de Múltiple Rangos para ácidos grasos saturados por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	30,35	X
Etanol absoluto	2	30,67	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	30,77	X
CO ₂ supercrítico	2	32,27	X

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 17: Análisis de varianza para ácidos grasos monoinsaturados

- Tabla ANOVA para ácidos grasos saturados por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	0,3631	3	0,1210	17,60	0,0091
Intra grupos	0,0275	4	0,0068		
Total (Corr.)	0,3906	7			

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es diferente.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para ácidos grasos saturados por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol absoluto	2	24,52	X
Acetona	2	24,55	X
CO ₂ supercrítico	2	24,67	X
Hexano:Alcohol isopropilico	2	25,05	X

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 18: Análisis de varianza para ácidos grasos poliinsaturados

- Tabla ANOVA para ácidos grasos poliinsaturados por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	3,5395	3	1,1798	5,46	0,0674
Intra grupos	0,8651	4	0,2163		
Total (Corr.)	4,4046	7			

Se rechaza la H_0 , al menos uno de los ácidos grasos es igual.
Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para ácidos grasos poliinsaturados por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	37,82	X
Hexano:Alcohol isopropílico	2	39,16	X
Etanol absoluto	2	39,17	X
CO ₂ supercrítico	2	39,58	X

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 19: Análisis de varianza para EPA + DHA

- Tabla ANOVA para EPA + DHA por Solvente

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4$$

Ha: Al menos un σ^2_i es diferente, $i = 1, 2, 3, 4$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	3,1300	3	1,0434	15,03	0,0121
Intra grupos	0,2776	4	0,0694		
Total (Corr.)	3,4078	7			

Se rechaza la H_0 , al menos una de las extracciones es diferente en EPA Y DHA.

Fuente: Elaboración propia.

- Prueba de Múltiple Rangos para EPA + DHA por Solvente

Método: 95,0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Solvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Acetona	2	28,94	X
Hexano:Alcohol isopropílico	2	29,59	XX
Etanol absoluto	2	30,06	XX
CO ₂ supercrítico	2	30,64	X

Fuente: Elaboración propia.