



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la actividad antioxidante, carotenoides totales, rendimiento global y perfil de extractos obtenidos a partir de cáscaras de camarón mediante propano subcrítico y Soxhlet

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Articulado al proyecto de investigación “Obtención de extractos ricos en astaxantina a partir de residuos de crustáceos: camarón (*Litopenaeus vannamei*) y cangrejo rojo (*Ucides occidentalis*), mediante fluidos sub y supercríticos CO₂ y Butano/Propano” aprobado mediante la Resolución Nro. UTA-CONIN-2025-0140-R.

Autor: Victor Mateo Naranjo Carrillo

Tutor: Ing. Santiago Esmiro Cadena Carrera

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ing. Santiago Esmiro Cadena Carrera

CERTIFICA

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 19 de junio 2025



Ing. Santiago Esmiro Cadena Carrera

1715602593

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Victor Mateo Naranjo Carrillo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Victor Mateo Naranjo Carrillo

18050337815

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Victor Mateo Naranjo Carrillo

18050337815

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

1804148086



Mg. Alex Fabián Valencia Silva

1803121084

Ambato, 02 de Julio de 2025

DEDICATORIA

*A mis padres **Víctor Naranjo** y **Jenny Carrillo**, por darme la vida, una familia amorosa, valores, consejos y un apoyo incondicional. Gracias por impulsarme siempre a seguir mis metas, sin importar lo difíciles que parezcan. De ustedes aprendí que, por más adversa que se torne la vida, siempre se puede encontrar una solución*

*A mi hermano **Pablo Naranjo**, por su cariño, ayuda y apoyo constante en cada uno de mis proyectos. Ha sido uno de los pilares fundamentales en mi vida, brindándome sabios consejos cuando más los he necesitado. Gracias por ser mi ejemplo a seguir y enseñarme que nunca hay que rendirse en la búsqueda de los sueños.*

*A mis tías **Janeth Naranjo** y **Mariela Carrillo**, de quienes siempre he recibido un cariño similar al de una madre. Han sabido apoyarme en todo momento, sin pedir nada a cambio, ya sea con sus consejos, su compañía o incluso su ayuda económica cuando lo he necesitado.*

A todos mis amigos, quienes me han acompañado a lo largo de la carrera y han sido una fuente constante de inspiración y alegría. Gracias por motivarme a crecer no solo académicamente, sino también como persona. Han llenado mi camino universitario de experiencias memorables e invaluable.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres y a mi hermano por todo el apoyo que he recibido a lo largo de mi vida, nunca me he visto limitado por sus deseos personales y me han impulsado a seguir mi propio camino.

A mis tías que siempre han creído en mí y me han brindado consejo y apoyo cuando lo he requerido, gracias por todo el cariño que me han brindado.

A mi tutor Ing. Santiago Cadena, por su apoyo durante todo este proceso y por confiar en mí desde el principio. Muchas gracias por su guía y enseñanza.

A todos los docentes que he tenido durante la carrera, han sabido inspirar en mí el deseo de seguir aprendiendo más y principalmente me han enseñado a cuestionar las cosas y desarrollar un pensamiento crítico.

A mis amigos de la carrera con quienes he compartido mucho tiempo, Sebastián Pérez, Jennifer Pinto, Valeria Acosta, Jennifer Luzuriaga, Joselyne Rodríguez Angel Puruncajas, Erika Orozco, Madeleine Pérez, Ricardo Altamirano, Jael Galarza, Fernando Minuche, Nicole Vázconez, Camila Pacheco, Angie Avalos y principalmente Madeline Guachi, Johanna Paredes quienes siempre han estado para mí y son las personas con las que más he compartido y espero sigan en mi vida a futuro.

A Paola Grefa quien ha sido una gran amiga y compañera durante el desarrollo de la tesis, siendo alguien siempre muy amable y dispuesta a ayudar.

A María Acosta quien me ha demostrado que no se necesita ver a una persona muy seguido para apreciarla y que ha sabido dar apoyo incondicional en las situaciones adversas.

A mis amigos más cercanos del team tap Mateo Salinas, Martin González, Andrés Rivas, Jonathan Flores, Pablo Hidalgo y Mateo Verdezoto, quienes me han acompañado a lo largo de los años en momentos buenos y malos.

ÍNDICE GENERAL DE LOS CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE LOS CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ECUACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 Importancia económica del camarón en el Ecuador	2
1.1.3 Compuestos de interés presentes en la cáscara de camarón	2
1.1.4 Astaxantina	3
1.1.5 Métodos de extracción.....	4
1.1.5.1 Extracción con Soxhlet	5
1.1.5.2 Extracción con propano subcrítico.....	7
1.1.6 Especies reactivas con el oxígeno (ROS)	7
1.1.7 Métodos para determinar la capacidad antioxidante	8
1.1.7.1 Método DPPH	8
1.1.8 Cromatografía de capa fina (TLC)	9

1.2	Objetivos.....	9
1.2.1	Objetivo general.....	9
1.2.2	Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		11
2.1	Materiales.....	11
2.1.1	Recursos institucionales.....	11
2.1.2	Material fungible y de laboratorio	11
2.1.3	Equipos	12
2.1.4	Reactivos.....	12
2.2	Métodos:	13
2.2.1	Obtención de los extractos mediante propano subcrítico y Soxhlet.	13
2.2.2	Estimación de carotenoides totales y capacidad antioxidante de los extractos.	15
2.2.3	Comparación cualitativa del perfil de los extractos mediante cromatografía de capa fina (TLC).	18
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		20
3.1	Análisis y discusión de resultados.....	20
3.1.1	Obtención de los extractos mediante propano subcrítico y Soxhlet.....	20
3.1.2	Estimación de carotenoides totales y capacidad antioxidante.	23
3.1.3	Comparación cualitativa del perfil de los extractos obtenidos mediante TLC.....	27
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		31
MATERIALES DE REFERENCIA		33
ANEXOS		42

ÌNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material fungible y de laboratorio.	11
Tabla 2. Equipos de laboratorio.	12
Tabla 3. Reactivos de laboratorio	12
Tabla 4. Análisis proximal de la materia prima	21
Tabla 5. Rendimiento global de las extracciones.....	21
Tabla 6. Resumen estadístico del rendimiento de extracciones (prueba t de Student)	22
Tabla 7. Carotenoides totales	23
Tabla 8. Resumen estadístico de carotenoides totales (prueba t de Student).....	24
Tabla 9. Capacidad antioxidante	25
Tabla 10. Resumen estadístico de la capacidad antioxidante (prueba t de Student).....	25
Tabla 11. Principales factores de retención del TLC	2825

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la astaxantina.	3
Figura 2. Diagrama de funcionamiento del extractor con propano subcrítico.....	14
Figura 3. Comparación de los extractos mediante TLC	28
Figura 4. Comparación de los extractos mediante TLC	29

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula del rendimiento de la extracción.....	15
Ecuación 2. Fórmula para carotenoides totales.....	16
Ecuación 3. Fórmula para carotenoides por gramo de materia prima	16
Ecuación 4. Fórmula del porcentaje de inhibición DPPH	17
Ecuación 5. Factor de retención.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 A. Valores de porcentaje de inhibición obtenidos para la curva de calibración de Trolox.....	42
Anexo 1 B. Curva de calibración de concentración de Trolox.....	42
Anexo 2. Resultados de la cromatografía de capa fina de astaxantina comercial.	42
Anexo 3. Gráfico de barras de comparación del rendimiento global entre los métodos de extracción.....	43
Anexo 4. Gráfico de barras de comparación de carotenoides totales entre los métodos de extracción.....	43
Anexo 5. Gráfico de barras de comparación de la actividad antioxidante entre los métodos de extracción.....	44
Anexo 6. Fotografías	45
Anexo 6 A. Lavado de la materia	45
Anexo 6 B. Secado de la materia prima.....	45
Anexo 6 C. Triturado de la materia prima.....	45
Anexo 6 D. Extracción mediante Soxhlet.....	45
Anexo 6 E. Concentración del extracto	46
Anexo 6 F. Pesaje del extracto obtenido	45
Anexo 6 G. Secado del extracto	46
Anexo 6 H. Recuperación del extracto	46
Anexo 6 I. Extracción con propano	46
Anexo 6 J. Recuperación del extracto de propano	46
Anexo 6 K. Ensayo DPPH.....	47
Anexo 6 L. Estimación de carotenoides	47
Anexo 6 M. Ensayo TLC.....	47
Anexo 7. Tablas	47
Anexo 7 A. Valores crudos del rendimiento de extracción	47
Anexo 7 B. Valores crudos de la estimación de carotenoides totales.....	48
Anexo 7 C. Valores crudos de absorvancia y resultados del ensayo DPPH.....	48
Anexo 7 D. Factores de retención de la cromatografía de capa fina de astaxantina comercial.....	49
Anexo 7 E. Resumen completo de las pruebas estadísticas para rendimiento.....	49

Anexo 7 F. Resumen completo de las pruebas estadísticas para carotenoides totales.....	50
Anexo 7 G. Resumen completo de las pruebas estadísticas para actividad antioxidante.....	50
Anexo 8. Análisis proximal realizado por la LACONAL	51

RESUMEN EJECUTIVO

Ecuador es uno de los principales productores de camarón (*Litopenaeus vannamei*) a nivel mundial, produciendo aproximadamente 1,2 millones de toneladas anuales, de las cuales cerca del 40 por ciento corresponde a residuos como cáscaras y cabezas. Este estudio tuvo como objetivo valorizar dichos residuos mediante la extracción de compuestos bioactivos, especialmente astaxantina, utilizando dos métodos: Soxhlet, considerado un procedimiento estándar para la extracción de compuestos bioactivos, y propano subcrítico, una alternativa respetuosa con el ambiente. Se determinaron los rendimientos globales, se evaluó la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH, se estimaron los carotenoides totales por espectrofotometría y se analizó cualitativamente la composición mediante cromatografía en capa fina (TLC). Los resultados mostraron que Soxhlet presentó rendimiento de 2,55 por ciento siendo mayor al de propano subcrítico que presentó un rendimiento de 0,15 por ciento de rendimiento, respecto a la concentración de carotenoides totales Soxhlet presentó 44,53 microgramos por cada gramo de materia prima, superior a los 1,48 microgramos por cada gramo de materia prima. No obstante, el propano subcrítico generó extractos con mayor capacidad antioxidante presentando una capacidad antioxidante del 68,48 por ciento respecto a Soxhlet que presentó un 51,85 por ciento, además se observó una mejor migración en TLC, lo que sugiere una mayor pureza, atribuible a la selectividad del solvente.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, Soxhlet, propano subcrítico, antioxidantes, carotenoides, TLC.

ABSTRACT

Ecuador is one of the main producers of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) worldwide, producing approximately 1,2 million tons per year, of which around 40 percent corresponds to waste such as shells and heads. This study aimed to valorize this waste through the extraction of bioactive compounds, particularly astaxanthin, using two methods: Soxhlet extraction, considered a standard procedure for obtaining bioactive compounds, and subcritical propane extraction, an environmentally friendly alternative. The global yields were determined, the antioxidant capacity was evaluated using the DPPH assay, the total carotenoids were estimated by spectrophotometry, and the qualitative composition was analyzed by thin-layer chromatography (TLC). The results showed that Soxhlet extraction reached a yield of 2,55 percent, which was higher than the 0,15 percent obtained with subcritical propane extraction. Regarding the concentration of total carotenoids, Soxhlet extraction presented 44,53 micrograms per gram of raw material, which was superior to the 1,48 micrograms per gram obtained with subcritical propane. However, subcritical propane extraction produced extracts with greater antioxidant capacity, showing a value of 68,48 percent compared to 51,85 percent for Soxhlet extraction. Additionally, a better migration was observed in TLC analysis, suggesting greater purity, attributable to the selectivity of the solvent.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, extraction, Soxhlet, subcritical propane, antioxidants, carotenoids, TLC

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

El Ecuador es uno de los principales productores de camarón a nivel mundial, produciendo en el 2023 1 499,11 millones de dólares según datos de la **Corporación Financiera Nacional [CFN] (2023)** mismo que involucra la producción de más de 1,2 millones de toneladas de camarón, sin embargo, esta elevada producción trae consigo una elevada carga de desechos producidos, siendo estos desechos entre el 40 % de la porción no comestible del camarón misma que corresponde a la cabeza y cáscara (**Gallardo, 2023**).

Parte de este desperdicio es localmente empleado como sazónador, sin embargo, las cáscaras de camarón desechadas poseen un amplio potencial para su utilización en diferentes áreas, ejemplo de ello es el uso de quitina/quitosano proveniente de las cáscaras de camarón como agente de control de enfermedades de las plantas como bactericida y fungicida, incluso siendo empleado como antitranspirante y muchas más aplicaciones (**Rkhaila et al., 2021**), sin embargo, la quitina no es el único compuesto de interés presente en la cáscara de camarón, además está presente la astaxantina la cual es un carotenoide con una amplia gama de aplicaciones debido a su capacidad como antioxidante, poseyendo una actividad antioxidante superior a una gran cantidad de carotenoides, motivo por el cual es empleada en la industria cosmética, acuicultura, productos farmacéuticos, nutraceuticos y terapéuticos (**Patel et al., 2022**).

Si bien la astaxantina puede ser sintetizada de manera química, esta no presenta la misma capacidad antioxidante que la astaxantina obtenida de fuentes naturales (**Kumar et al., 2022**). Siendo necesario la optimización del proceso de obtención de dicho caroteno. Existen diferentes métodos de extracción de este caroteno como lo son: solventes orgánicos, método alcalino, maceración o uso de aceites de origen vegetal asistidos por ultrasonido (**Panagiotakopoulos et al., 2023**). Si bien los métodos previamente mencionados pueden extraer astaxantina de manera efectiva, conllevan ciertas desventajas, entre las cuales se encuentran la contaminación ambiental por el uso de solventes orgánicos, requerimiento de grandes cantidades de solventes, tiempo y costos relativamente elevados.

En búsqueda de optimizar el proceso de extracción, se ha considerado emplear propano subcrítico, una técnica de extracción caracterizada por ser amigable con el medio ambiente y de bajo coste, siendo altamente empleada en la extracción de compuestos liposolubles y

lipofílicos como es el caso de la astaxantina, método que por sus condiciones de extracción amenas como son bajas de temperaturas, permite conservar de mejor manera las características antioxidantes, además de presentar una alta capacidad para reciclar el solvente (**Zhang et al., 2024**). Dados los puntos previamente descritos, se plantea evaluar la actividad antioxidante, carotenoides totales y perfil de los extractos obtenidos a partir de cáscaras de camarón empleando para ello propano subcrítico y el método tradicional Soxhlet.

1.1.2 Importancia económica del camarón en el Ecuador

El Ecuador es uno de los principales productores de camarón a nivel mundial siendo la producción camaronera uno de los sectores más importantes para la economía interna representando más del 40% de las exportaciones ecuatorianas (**Gonzabay et al., 2021**), las condiciones climáticas del país favorecen la producción camaronera, permitiendo así competir en el mercado global lo que ha convertido a Ecuador en el segundo país que más exporta camarón, únicamente superado por India, la elevada comercialización posee un papel fundamental dentro de la economía ecuatoriana, generando una gran cantidad de empleos directos e indirectos (**Prado et al., 2024**).

En el año 2023 en el Ecuador la industria camaronera contaba con 1 061 empresas pertenecientes al sector camaronero, mismas que produjeron más de 1,22 millones de toneladas de camarón, generando así 1 499,11 millones de dólares de valor agregado bruto esto según datos de la **Corporación Financiera Nacional [CFN] (2023)**.

Esta elevada producción significa aproximadamente 488 000 toneladas de desechos al año, mismos que de no ser tratados correctamente pueden llegar a ser fuente de contaminación ambiental, sin embargo, dichos desechos pueden ser fuente de diferentes compuestos de interés.

1.1.3 Compuestos de interés presentes en la cáscara de camarón

La cáscara de camarón comúnmente tratada como un desecho de la industria camaronera, posee compuestos de interés que pueden ser aprovechados para las diferentes industrias, entre los principales compuestos de interés presentes se puede encontrar quitina, a partir de la cual se obtiene el quitosano, mismo que tiene una amplia variedad de aplicaciones siendo ejemplos de ello su uso en el campo biomédico, procesamiento de alimentos, tratamientos de agua, entre otros (**Gao et al., 2024**).

Además de la quitina presente en la cáscara de camarón se puede encontrar otro compuesto con un elevado interés comercial como lo es la astaxantina, un carotenoide que ha presentado propiedades físicas, características bioquímicas y efectos fisiológicos extraordinarios, por lo que su uso se ha extendido a una gran cantidad de industrias, destacando principalmente en el ámbito de la salud donde se destaca por su elevada capacidad antioxidante, antiinflamatoria y anti apoptótica (**Kohandel et al., 2022**).

1.1.4 Astaxantina

La astaxantina es un pigmento de color rojizo anaranjado pertenece al grupo de carotenoides llamados xantofilas, posee una estructura molecular similar a la del β -caroteno, sin embargo, sus grupos de oxígeno distinguen a la astaxantina de otros subtipos de carotenoides, la estructura de la astaxantina, Figura 1, posee una región polar en cada extremo de los anillos de ionona que va a neutralizar los radicales libres, además, su zona no polar central está formada por 13 enlaces poliinsaturados dobles carbono-carbono lo que permite la eliminación de electrones de alta energía y las fracciones hidroxilo y cetona de los anillos mejoran la capacidad de este caroteno para atravesar con mayor facilidad la membrana celular, dichas propiedades químicas le confieren a la astaxantina una actividad antioxidante y antiinflamatoria elevada (**Si & Zhu, 2022**). Destaca su capacidad antiinflamatoria para el tratamiento de enfermedades neurológicas, diabetes, enfermedades gastrointestinales, renales y hepáticas, afecciones cutáneas y trastornos oculares, entre otras, siendo de gran interés en la industria médica (**Nair et al., 2023**).

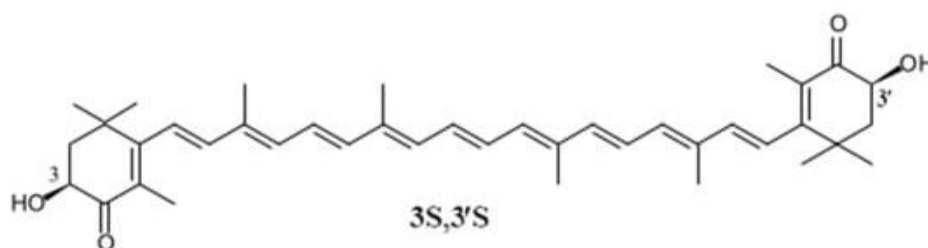


Figura 1. Estructura de la astaxantina.

Nota. Representación de la estructura de la astaxantina. Fuente: **Stachowiak & Szulc (2021)**.

Los usos comerciales de la astaxantina son extensos, además de su aplicación farmacéutica llega a ser imprescindible en otras industrias, destacando en industria acuícola en la cual es empleada para dar coloración del salmón o la salud del mismo, calidad de los huevos, eclosión desarrollo y crecimiento de los alevines, además, de ser aplicada en la industria avícola y ganadera para mejorar la calidad de la carne debido a que mejora el crecimiento y fertilidad tanto de los pollos como del ganado (**Nishida et al., 2023**). Dentro de la industria cosmética se ha convertido en un compuesto de interés debido a su potencial para reducir el fotoenvejecimiento de la piel (**Donoso et al., 2021**).

La astaxantina puede ser sintetizada de manera química a partir de petroquímicos, siendo mucho más barata que la natural pero a su vez menos efectiva, poseyendo la astaxantina natural entre 20 y 50 veces más capacidad antioxidante en relación a la sintética, además, la astaxantina sintética a diferencia de la natural no está aprobada para su uso en seres humanos debido a los residuos químicos considerados poco seguros (**Nair et al., 2023**).

Es por ello esencial la búsqueda de nuevas fuentes y nuevos métodos de extracción que permitan reducir el costo que implica obtener astaxantina de origen natural, misma que por su naturaleza principalmente apolar implica el uso de solventes orgánicos que generalmente son contaminantes, ejemplos de ello según mencionan **Sánchez et al. (2011)** son los solventes clorados, *n*-hexano, *n*-heptano, acetona, metanol, éter de petróleo, entre otros. Por lo que se buscan alternativas más amigables con el ambiente como lo es el uso de propano o butano en condiciones subcríticas (**Sun et al., 2018**), mismas que han demostrado eficiencia para la extracción de compuestos apolares y a su vez representan un menor riesgo en comparación con técnicas que emplean solventes en condiciones supercríticas como es el uso de CO₂ (**Liu et al., 2020**).

1.1.5 Métodos de extracción

La astaxantina al ser un carotenoide lipofílico puede ser extraído por diferentes métodos, siendo los más comunes la extracción mediante solventes orgánicos, método alcalino y maceración o el uso de componentes subcríticos, sin embargo, los métodos convencionales de extracción presentan ciertas desventajas, entre las cuales están los elevados costos de extracción, implicaciones ambientales serias, altas temperatura y tiempos de extracción muy largos, siendo necesario adoptar nuevas metodologías de extracción más respetuosos con el ambiente pero

que a su vez reduzcan los tiempos de extracción y mejoren la cantidad y calidad del extracto **(Kim et al., 2022)** .

Un ejemplo de método de extracción convencional según **Pok et al. (2023)** es el uso de aceites de origen vegetal como el aceite de oliva, girasol, soja y linaza, para una maceración, estos que actúan como disolvente de la astaxantina, sin embargo, este método de extracción involucra temperaturas elevadas, lo que incrementa la oxidación de la astaxantina obteniendo de esta manera un producto de baja calidad. Si bien este método puede ser combinado con técnicas no convencionales para mejorar el proceso como el uso de ultrasonido, como se evidencia en el estudio de **Panagiotakopoulos et al. (2023)**, las temperaturas elevadas provocan una degradación de la astaxantina.

Las extracciones con solventes orgánicos es una de las técnicas de extracción convencionales más empleadas, requiere una previa trituración de la muestras para posteriormente ser sometida a una combinación entre solventes orgánicos, ejemplo de ello es el uso de solventes tanto polares como no polares que son empleados durante para la extracción, siendo los solventes más empleados el éter de petróleo, n-hexano, etanol, acetona y agua, mismos que pueden ser empleados como mezcla o individualmente **(Sharayei et al., 2021)**. En la extracción con solventes se destaca el método Soxhlet en el cual mediante diferentes combinaciones de solventes que recirculan el sistema, permiten gastar una menor cantidad de solvente durante la extracción en un tiempo relativamente menor en comparación con métodos como la maceración, sin embargo, requiere elevadas temperaturas, así como de fases posteriores para la separación del solvente.

Entre los métodos de extracción de astaxantina también existen métodos no tradicionales como el uso de solventes combinados con microondas como se puede apreciar en el estudio de **Mussagy et al. (2025)** donde emplean solventes eutécticos que son expuestos a microondas mejorando su eficiencia de extracción. Otro ejemplo de combinación con técnicas no convencionales de extracción es el uso de líquidos iónicos, solventes eutécticos y ultrasonido para extraer astaxantina evidenciado en el estudio de **Cheng et al. (2025)** mismos que requieren mejoras en la eficiencia y sostenibilidad ambiental.

1.1.5.1 Extracción con Soxhlet

En la extracción con solventes el método de extracción Soxhlet desarrollado por Franz von Soxhlet en el año 1870, es el método de lixiviación estándar más empleado hasta el momento debido a su capacidad para extraer más masa de extracto que la mayoría de alternativas **(Liao**

et al., 2025). La extracción con el método Soxhlet consiste en la recirculación del solvente, misma que se da cuando el solvente llega al nivel de rebose y el sifón aspira el soluto del portadetal y lo descarga nuevamente en matraz de destilación transportando los compuestos extraídos al líquido completando así un ciclo, esta recirculación hace que la muestra entre repetidamente en contacto con porciones frescas del solvente, facilitando la alteración del equilibrio de transferencia (**Luque & Priego, 2010**).

El método de extracción por Soxhlet ha ido evolucionando con el tiempo, llegando a tener diferentes variaciones como es el caso de la extracción con Soxhlet de alta presión en el cual se emplean solventes que no alcanzan condiciones supercríticas, el Soxhlet automatizado en el cual se combina la ebullición por reflujo y la extracción Soxhlet para realizar dos etapas de extracción, el Soxhlet asistido por ultrasonido aprovecha los efectos del ultrasonido, generalmente empleado para extracción de grasas de semillas oleaginosas y por último el Soxhlet asistida por microondas, siendo la técnica que ha demostrado un mayor éxito (**Luque & Priego, 2010**).

Al realizar extracciones con Soxhlet es importante escoger los solventes adecuados dependiendo del compuesto de interés, en el caso de la extracción de muestras de camarón, generalmente se encontrará astaxantina y para ello pueden ser empleados diferentes solventes con afinidad por compuestos no polares, ejemplo de ello es lo mencionado por **Hai et al. (2024)** donde reportan el uso de etanol absoluto como disolvente único en la extracción de astaxantina, evidenciando su efectividad en condiciones específicas. No obstante, también se han documentado combinaciones de disolventes que mejoran la eficiencia del proceso. **Phadtare et al. (2021)** describen el uso de una combinación de solventes como los es el hexano : acetona en una proporción (2:3 v/v) siendo esta combinación una de las más comúnmente empleadas a nivel industrial, sin embargo, dichos solventes llegan a presentar un rendimiento bajo, esto debido a que su eficacia depende principalmente de temperaturas altas (**Mezzomo et al., 2011**) , lo cual representa una limitación debido a que la astaxantina es un compuesto altamente termosensible. Ante esta problemática, una alternativa viable es el uso de propano o butano en condiciones subcríticas, que permite una extracción más eficiente y con menor degradación del compuesto.

1.1.5.2 Extracción con propano subcrítico

La extracción mediante propano subcrítico es una técnica eficaz para la extracción de compuestos lipofílicos y terpenos, siendo principalmente empleada para la extracción de aceites esenciales, esta extracción está caracterizada por ser respetuosa con el medio ambiente y tener un costo relativamente bajo, además, el uso de temperaturas bajas permite obtener productos termosensibles que pueden verse afectados o degradados por el uso de elevadas temperaturas empleadas en otras técnicas de extracción (Wang et al., 2021).

Las condiciones subcríticas proporcionan al propano propiedades físicas que lo hacen ideal para la extracción, proporcionando una viscosidad y densidad reducidas mientras que la difusividad y solubilidad mejoran (Li et al., 2024), además el proceso de separación del solvente se facilita gracias a su bajo punto de ebullición siendo el punto de ebullición del propano de -42,1 °C temperatura que permite una fácil evaporación del solvente de la fase de oleosa, estas condiciones hacen posible que el solvente sea fácilmente reciclado y por ende su costo sea menor (Zhang et al., 2024).

Para la extracción de astaxantina proveniente de cáscara de camarón se ha reportado el uso de bajas presiones, de acuerdo con lo mencionado por Shi et al. (2015) al trabajar con propano subcrítico a presiones de entre 5-10 bares se logra la extracción de los aceites presentes en la materia prima, mismos que contendrán astaxantina debido a la naturaleza lipofílica de la misma.

El uso de esta técnica permite realizar extracciones a bajas temperatura, mismas que, son requeridas debido a la naturaleza termosensible de la astaxantina, buscando así preservar sus propiedades biológicas (Athira & Krishnakumar, 2025), ya que dichas propiedades son sensibles a factores como la temperatura, luz y oxígeno mismos que ocasionan una degradación de la astaxantina (Martínez et al., 2020), misma que destaca principalmente por su capacidad antioxidante misma que permite combatir a las especies reactivas con el oxígeno (ROS).

1.1.6 Especies reactivas con el oxígeno (ROS)

Las especies reactivas con el oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y los radicales libres son los factores relacionados con el estrés oxidativo que induce daño celular al interferir con lípidos, proteínas y ADN. El estrés oxidativo está relacionado con una gran cantidad de enfermedades, entre las cuales se destaca el cáncer, envejecimiento celular, arterioesclerosis, entre otras (Athira & Krishnakumar, 2025). Los llamados antioxidantes son aquellos

componentes que reaccionan con los (ROS) permitiendo al cuerpo mantener un equilibrio entre la producción de estos y su neutralización (**Pachuta-Stec, 2021**). Su papel protector puede atribuirse principalmente a dos mecanismos relacionados con la estructura del polieno conjugado: la desactivación del oxígeno singlete y las reacciones de neutralización de radicales libres (**Czett et al., 2025**).

Dado el impacto negativo que las ROS tienen sobre la salud humana, se ha incrementado el interés por identificar compuestos con capacidad para contrarrestar dichos efectos. En este contexto, resulta fundamental evaluar la actividad antioxidante de estos compuestos, para lo cual existen diversas metodologías analíticas. Estas técnicas se basan en diferentes principios fisicoquímicos, entre los que se incluyen la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), la transferencia de electrones y protones (SET), la reducción de iones metálicos, y la reducción de iones férricos, entre otros (**Rumpf et al., 2023**).

1.1.7 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Entre los métodos de determinación de la capacidad antioxidante podemos encontrar una amplia variedad de métodos como lo menciona **Gulcin (2020)** los principales son, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), poder antioxidante reductor férrico (FRAP), iones cúpricos (Cu^{2+}) que reducen el poder antioxidante, Capacidad de absorción de radicales (ORAC), entre otros. Sin embargo, uno de los más comúnmente empleados es el método DPPH debido a la amplia estandarización, simplicidad, rapidez y costo (**Munteanu & Apetrei, 2021**), además, este método es comúnmente empleado para compuestos cromofóricos como es el caso de los carotenoides, ya que además la absorbancia máxima que se emplea es muy cercana a la de la mayoría de carotenoides (**Pérez et al., 2020**).

1.1.7.1 Método DPPH

Este es un método espectrofotométrico en el cual se utiliza el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) ya que se evalúa la capacidad de los compuestos antioxidantes de eliminar los radicales libres del DPPH, este reactivo en un principio presenta una coloración violeta intensa que al mezclarse con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrogeno va causar que el color violeta vaya desapareciendo debido a que resulta de una forma reducida del radical

DPPH, la intensidad de color de esta reacción se puede registrar mediante espectroscopia UV-vis (**Gulcin & Alwasel, 2023**).

La capacidad antioxidante de extractos obtenidos mediante diferentes técnicas varía en función de los compuestos que han sido arrastrados durante la extracción, por lo que, además de determinar la actividad antioxidante, frecuentemente se emplean técnicas que permitan identificar dichos compuestos que poseen actividad antioxidante. Entre las muchas técnicas de identificación de compuesto, la cromatografía de capa fina (TLC) destaca por su simplicidad y facilidad de uso (**Kowalska & Sajewicz, 2022**).

1.1.8 Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina (TLC) es un tipo de cromatografía líquida es una técnica de separación utilizada ampliamente en la identificación de compuestos presentes en mezclas complejas en la que se emplea una fase móvil líquida y una fase estacionaria compuesta por una fina capa de material adsorbente sobre una placa plana. La fase estacionaria se conoce como sorbente, mientras que la fase móvil, también llamada disolvente de revelado, es la responsable de transportar los solutos a través de la fase estacionaria. Durante el proceso, las moléculas de los solutos se desplazan de manera intermitente, ya que son adsorbidas y desorbidas repetidamente por la fase estacionaria. Solo una pequeña fracción del soluto se encuentra en movimiento en un momento dado, pero cada componente recorrerá una distancia media característica. Las sustancias con mayor afinidad por el sorbente se moverán más lentamente, pues permanecerán más tiempo retenidas en la fase estacionaria, mientras que aquellas con menor afinidad migrarán más rápidamente con la fase móvil (**Santiago & Strobel, 2013**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante, carotenoides totales, rendimiento global y perfil de extractos obtenidos a partir de cáscaras de camarón mediante propano subcrítico y Soxhlet.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos a partir de cáscara de camarón mediante propano subcrítico a presión de 5 bares a temperatura ambiente y Soxhlet a presión atmosférica.
- Estimar la cantidad carotenoides totales mediante espectrofotometría UV-Vis y la capacidad antioxidante por medio de la técnica DPPH de los extractos obtenidos.
- Comparar cualitativamente el perfil de los extractos obtenidos mediante las diferentes técnicas empleando para ello cromatografía de capa fina (TLC).

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Recursos institucionales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios académicos y de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.2 Material fungible y de laboratorio

En la Tabla 1 se mencionan los materiales de laboratorio y materia prima empleada empleado en el proyecto.

Tabla 1.

Material fungible y de laboratorio.

Material	Cantidad
Cáscara de camarón	1000 g
Espátula	1
Frasco ámbar de 1000 mL	1
Frasco ámbar de 500 mL	1
Frascos ámbar 60 mL	8
Micropipetas	2
Papel aluminio	1
Papel filtro	1
Papel industrial	1
Pinzas para soporte universal	2
Placa de 96 micropocillos	1
Probeta volumétrica 500 mL	1
Probeta volumétrica de 100 mL	1
Soporte universal	1
Vaso de precipitación 1000 mL	1
Vaso de precipitación 250 mL	1
Vaso de precipitación de 500 mL	1

2.1.3 Equipos

En la Tabla 2 se mencionan los equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Tabla 2.

Equipos de laboratorio.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	Citizen	CX220
Balanza de precisión	Radwag	Ps10100R2
Balanza halógena	Citizen	MB200
Espectrofotómetro	Fisher Scientific	ACCUSKA N GO
Estufa de calentamiento	VELP	AREC
Extractor subcrítico	-	-
Licuada	Oster	4655
Refrigerador	Indurama	N2BE8U
Rotavapor	EYELA	OSB-2100
Soxhlet	-	-

2.1.4 Reactivos

En la Tabla 3 se listan los reactivos y soluciones usadas en el desarrollo del proyecto

Tabla 3.

Reactivos de laboratorio

Reactivo	Cantidad
Acetona	200 mL
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	1 g
Hexano	300 mL
Metanol	1000 mL
Propano	32 oz
Trolox	1 g

2.2 Métodos:

2.2.1 Obtención de los extractos mediante propano subcrítico y Soxhlet.

2.2.1.1 Obtención de la materia prima

Se empleó residuos de camarón fresco (*Litopenaeus vannamei*) provenientes de piscinas productoras de la provincia de Guayas (2°24'22.3"S 80°12'44.0"W). Las cáscaras de camarón fueron colocadas en fundas plásticas con hielo para proteger las muestras y evitar contaminación, posteriormente fueron trasladadas a los laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato para ser procesadas. Las cáscaras eran frescas y no se encontraban en proceso de descomposición por lo que se almacenaron en condiciones congelamiento en un refrigerador domestico a -10 °C (Indurama, N2BE8U, Cuenca, Azuay, Ecuador).

2.2.1.2 Preparación de la materia prima

Se empleó un cuchillo para poder separar la cabeza y patas, únicamente se conservó las cáscaras del camarón, se siguió la metodología empleada por **Panagiotakopoulos et al. (2023)**, las cáscaras se lavaron con agua destilada, posteriormente fueron secadas empleando una estufa de aire caliente (Kalstein, YR02565, Montpellier, Paris, Francia) a una temperatura de 40 °C durante 72 h, posteriormente fueron trituradas con una licuadora (Oster, 4655, Cuenca, Azuay, Ecuador). Las cáscaras molidas fueron colocadas en bolsas Ziploc y almacenadas en un congelador a -10 °C hasta su posterior uso (Indurama, N2BE8U, Cuenca, Azuay, Ecuador).

2.2.1.3 Análisis proximal de la muestra.

Para él un análisis proximal de la muestra se envió 100 gramos de muestra seca y triturada al laboratorio certificado Laconal de la Universidad Técnica de Ambato, de la muestra se determinó, cenizas por gravimetría (AOAC Ed. 22, 2023 923.03), proteínas totales mediante el método de Kjeldahl (AOAC Ed. 22, 2023 2001.11), y grasa también se realizó mediante gravimetría (AOAC Ed. 22, 2023 2003.06). La humedad se determinó empleando una balanza alógena (Citizen, MB200, Edison, Nueva Jersey, USA) para lo cual se empleó 2,114 g de muestra que fue homogenizada antes de ser tomada para el análisis.

2.2.1.4 Extracción empleando propano subcrítico

Se pesó 50 gramos de cáscara de camarón triturada para cada una de las réplicas realizadas, posteriormente se selló el equipo de extracción subcrítica (ver Figura 2) con rango de presión 0-10 bares y se adicionó el propano (LG products, Quito, Pichincha, Ecuador) hasta llegar a una presión de 5 bares, se esperó durante una hora para posteriormente recuperar el extracto en frascos de vidrio ámbar de 60 mL, mismos que posteriormente fueron cubiertos por papel aluminio y almacenados en el congelador a -10 °C hasta su posterior uso (Indurama, N2BE8U, Cuenca, Azuay, Ecuador).

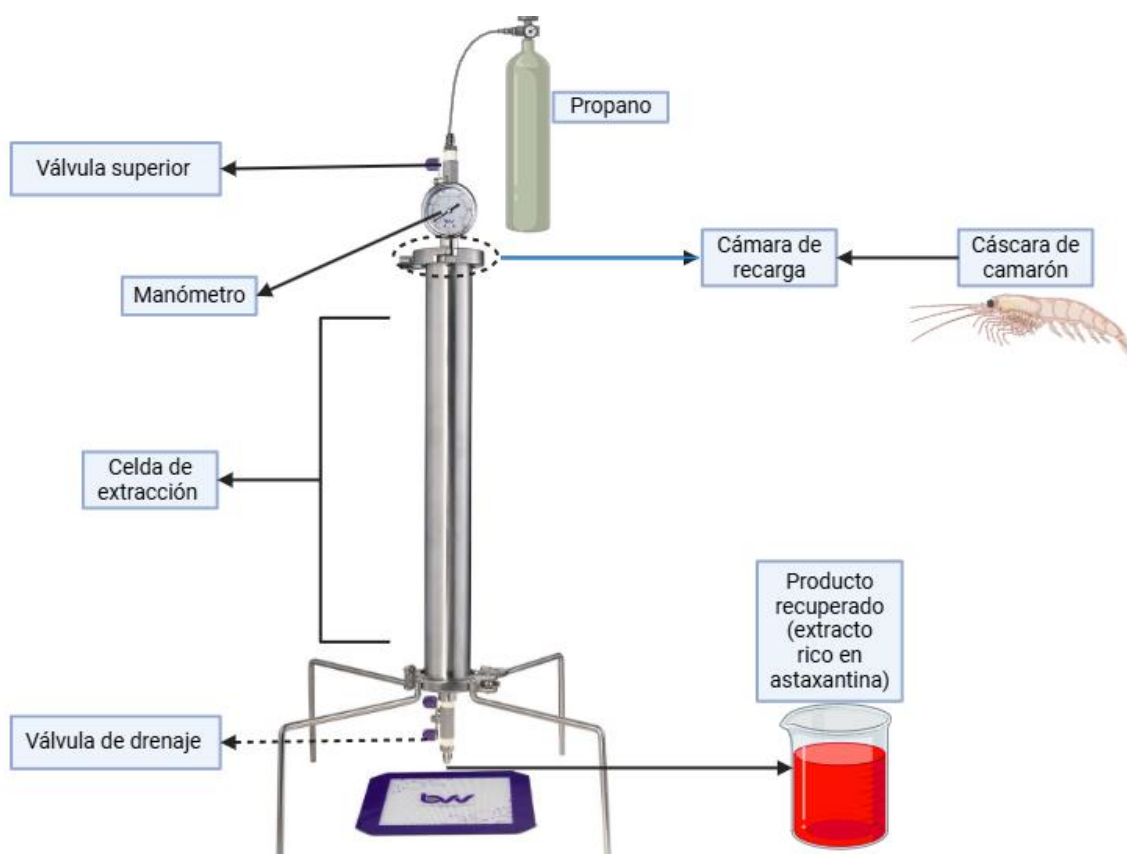


Figura 2. Diagrama de funcionamiento del extractor con propano subcrítico

Nota. Elaboración propia.

2.2.1.5 Extracción con método convencional (Soxhlet)

Para la extracción con el equipo Soxhlet se pesó 15 gramos de la cáscara de camarón triturada empleando para ello la balanza de precisión (Radwag, Ps10100R2 Radom, Mazovia, Polonia), esta cantidad fue utilizada para cada una de las tres repeticiones, la cantidad de muestra empleada permitió conservar la proporción 10:1 de solvente: muestra, posteriormente las

muestras pesadas se colocaron en los dedales de extracción que fueron elaborados con papel filtro, los dedales fueron colocados en el equipo Soxhlet, siguiendo la metodología de **Aguado et al. (2022)**, se preparó 150 mL de solvente que consistía de hexano: metanol 1:2 (v/v), para lo cual se utilizó 50 mL de hexano y 100 mL de metanol, el solvente se colocó en equipo Soxhlet y se comenzó con la extracción, el tiempo de extracción en el equipo Soxhlet fue de 5 horas durante las cuales se cumplieron 4 ciclos, posteriormente el extracto obtenido fue llevado al evaporador rotativo (EYELA, OSB-2100, Bohemia, New York, USA) en el cual se empleó una temperatura de 45°C y una presión de 150 hPa para de esta manera eliminar y recuperar el solvente, adicionalmente se empleó una plancha de calentamiento (VELP, AREC, Usmate Velate, Italia) a 60 °C para eliminar por completo la humedad del extracto, se recuperó el extracto y fue almacenado en frascos de vidrio ámbar de 60 mL recubiertos con papel aluminio, y posteriormente fueron almacenados en el congelador (Indurama, N2BE8U, Cuenca, Tungurahua, Ecuador) a una temperatura de -10 °C.

2.2.1.6 Evaluación del rendimiento de las extracciones realizadas.

Para evaluar el rendimiento obtenido de la extracción con propano subcrítico y el método Soxhlet, se pesó la materia prima inicial empleada (cáscara de camarón), en la extracción con equipo Soxhlet se empleó 15 g en cada replica, en el caso del propano subcrítico se empleó 50 g en cada replica, además se pesó el extracto obtenido en cada extracción tras ser eliminados los solventes, se empleó para ello la balanza de alta precisión (Citizen, CX220, Edison, Nueva Jersey, USA). Posteriormente, se calculó el rendimiento empleando la Ecuación 1.

Ecuación 1. Fórmula del rendimiento de la extracción

$$Y(\%) = \frac{m_{extracto}}{m_{materia\ prima}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

El cálculo permitió determinar el porcentaje de extracto recuperado en relación con la materia prima empleada.

2.2.2 Estimación de carotenoides totales y capacidad antioxidante de los extractos.

2.2.2.1 Estimación de carotenoides totales

Para estimar los carotenoides totales, se empleó la metodología propuesta por **Scott (2001)** en los *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Se diluyó el extracto obtenido en etanol al 96 % hasta obtener una concentración de 10 mg/mL, y se realizó diluciones hasta que los

valores de absorbancia sean de entre 0,3 a 0,7 UA medidos en un espectrofotómetro a λ_{max} , siendo necesario un factor de dilución de 4 para Soxhlet y 2 para propano, como blanco se empleó etanol. Para las mediciones se empleó el espectrofotómetro (Fisher Scientific, ACCUSKA N GO, Pittsburgh, Pensilvania, USA), a una longitud de onda de 450 nm. Finalmente, los carotenoides totales fueron calculados empleando la Ecuación 2, tomando en cuenta un coeficiente de absorción de 2500.

Ecuación 2. Fórmula para carotenoides totales

$$\text{Carotenoides totales} = \frac{A \cdot V}{A^{1\%}} * C^{1\%} = \mu\text{g} / \text{mL} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

A: Absorbancia medida empleando una longitud de onda de 450 nm, longitud en la que la mayoría de los carotenoides totales presentan su pico máximo de absorbancia.

V: Factor de dilución

$A^{1\%}$: Coeficiente de extinción mencionado por **Scott (2001)** en los *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2500 $A^{1\%}_{1\text{cm}}$, siendo definido $A^{1\%}$ como la absorbancia de un carotenoide al 1% (g/L) en un disolvente en una cubeta de 1 cm de trayectoria óptica.

$C^{1\%}$ = Concentración de la solución al 1 % (10 mg/mL)

Posteriormente se expresó el valor en $\mu\text{g/g}$ de materia prima para lo cual se empleó la Ecuación 3

Ecuación 3. Fórmula para carotenoides por gramo de materia prima

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{C_{\text{carotenoides}} * V}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$C_{\text{carotenoides}}$: Es la concentración de carotenoides en μmL

V: Es el volumen total del extracto

m: masa de la muestra seca utilizada en la extracción

2.2.2.2 Construcción de la curva de calibración

Se preparó una solución de 150 µM de DPPH en metanol: agua (80:20 v/v) misma que posteriormente se cubrió de papel aluminio y se dejó reposar durante 35 minutos. Posteriormente se preparó una solución madre de Trolox de 500 µM a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500 µM de Trolox, posteriormente se añadió 20 µL de cada una de las disoluciones de Trolox en los distintos pocillos de una microplaca de 96 pocillos y se añadió en cada uno de estos 180 µL de la solución de DPPH previamente preparada y reposada. Para el control se empleó 180 µL de la solución DPPH con 20 µL de agua destilada, en el caso del blanco se empleó 180 µL de una solución metanol: agua (80:20 v/v) a la que se añadió 20 µL de agua destilada.

La microplaca se cubrió con papel aluminio y se dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente, la medición espectrofotométrica se realizó en el espectrofotómetro (Fisher Scientific, ACCUSKA N GO, Pittsburgh, Pensilvania, USA) donde se empleó una longitud de onda de 515 nm, posteriormente se empleó la Ecuación 4 para determinar el % de inhibición:

Ecuación 4. Fórmula del porcentaje de inhibición DPPH

$$\% \text{inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

A_{muestra} = Absorbancia de las muestras (Trolox + 180 µL de DPPH)

A_{control} = Absorbancia de agua destilada + 180 µL de DPPH

A_{blanco} = Absorbancia de agua destilada + 180 µL solución metanol: agua

% de inhibición = Cantidad de DPPH neutralizado

A partir de los datos (ver Anexo 1A) se construyó la curva de calibración.

2.2.2.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Siguiendo la metodología descrita por **Herald et al. (2012)**, se elaboró la curva de calibración de Trolox previamente descrita. Se depositó 20 µL de los extractos obtenidos en los pocillos

de la microplaca de 96 pocillos, posteriormente se añadió 180 µL de la solución de DPPH, Para el control se empleó 180 µL de la solución DPPH con 20 µL de agua destilada, en el caso del blanco se empleó 180 µL de una solución metanol: agua (80:20 v/v) a la que se añadió 20 µL de agua destilada.

La microplaca se cubrió con papel aluminio y se dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente, la medición espectrofotométrica se realizó en el espectrofotómetro (Fisher Scientific, ACCUSKA N GO, Pittsburgh, Pensilvania, USA) donde se empleó una longitud de onda de 515 nm, posteriormente se empleó la Ecuación 4 para determinar el % de inhibición.

Posteriormente empleando la curva de calibración (ver apartado 2.2.2.2) se obtuvo la equivalencia de los extractos con respecto al Trolox.

2.2.3 Comparación cualitativa del perfil de los extractos mediante cromatografía de capa fina (TLC).

2.2.3.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

Se siguió la metodología de **Tan et al. (2021)**. Con la ayuda de un capilar, se depositaron los extractos obtenidos sobre placas de sílice gel 60 F₂₅₄ de dimensiones 2,5 cm × 7,5 cm. Para la fase móvil, se prepararon 20 mL de una solución de n-hexano: acetona en proporción 7:3 (v/v) utilizando 14 mL de hexano y 6 mL de acetona. Una vez aplicado el extracto, las placas fueron colocadas dentro de la cámara de desarrollo, previamente saturada con la fase móvil, y esta se mantuvo cerrada durante el proceso. El factor de retención (R_f) fue calculado mediante la Ecuación 5.

Ecuación 5. Factor de retención

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}} \quad \text{Ecuación 5}$$

En este caso, los factores de retención permitirán comparar cualitativamente los extractos obtenidos por las diferentes técnicas.

2.2.3.2 Análisis estadístico

Debido a que no se planteó un diseño experimental y a que únicamente se evaluaron dos métodos, se optó por realizar únicamente una prueba T de Student para muestras independientes, misma que permite evaluar diferencias significativas entre las medias de ambos tratamientos de una forma más directa y eficiente, para ello se empleó el software estadístico R (versión 4.4.1), se aplicó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos de cada método de extracción (Propano subcrítico y Soxhlet), posteriormente se analizó la homogeneidad de las varianzas utilizando la prueba de Levene, en base a la misma se determinó si se aplicaba la prueba t clásica o la t de Welch, debido a que la primera se emplea en caso de tener varianzas homogéneas mientras que la segunda es empleada en caso de que no exista igualdad de varianzas, además se generó un gráfico de barras con las medias y errores estándar de cada método para facilitar la visualización comparativa de cada método, cabe destacar que todos los análisis se realizaron empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y que además por cada proceso experimental se empleó tres replicas para mejorar la fiabilidad de los datos obtenidos.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Obtención de los extractos mediante propano subcrítico y Soxhlet

3.1.1.1 Análisis proximal

En la Tabla 4 se reportan los resultados obtenidos de la composición proximal de la materia prima seca y triturada correspondiente a cáscara de camarón. Donde se puede destacar que sus componentes mayoritarios son proteína total, cenizas, y carbohidratos.

Dichos valores podrían deberse a que se empleó como materia prima, exclusivamente a las cáscaras del camarón, por lo que se retiraron las cabezas y patas que contienen mayor contenido de proteínas y grasas, siendo la cabeza del camarón la parte que más almacena grasas (**Gulzar et al., 2020**). Sin embargo, los resultados obtenidos fueron bajos en comparación con otros estudios como los realizados por **Douglas et al. (2018)** donde se observa que *L. vannamei* presenta valores superiores tanto de proteína como de grasa respecto a los de la muestra empleada para el estudio, además los estudios de **Liu et al. (2021)** reportan que *L. vannamei* presenta en su cáscara una menor cantidad de proteína y grasa respecto a otras especies de camarón.

El contenido de cenizas es elevado, sin embargo, es similar a valores reportados por **Salas et al. (2015)** y **Mao et al., (2017)** quienes obtuvieron valores de cenizas de entre el 27-29 % lo que indica que el contenido de cenizas es normal para la especie, las cenizas reflejan la presencia de compuestos inorgánicos en las muestras, indicando que es rico en minerales. Lo que a su vez significa que la proporción orgánica de la materia prima empleada es menor, siendo este un factor que influye directamente en el rendimiento de las extracciones.

La humedad de la muestra es elevada, misma que puede interferir con los procesos de extracción ya que según **Feng et al. (2020)** la presencia de agua en sistemas de extracción de lípidos restringe el contacto entre el solvente no polar y los lípidos lo que llega a disminuir la eficiencia de transferencia de masa, la cantidad de humedad presente puede deberse a la dificultad para eliminar agua intracelular en materias primas lipídicas.

Tabla 4.

Análisis proximal de la materia prima

Ensayos/Técnica	Métodos	Resultados (%)
Cenizas, Gravimetría	AOAC Ed. 22,2023 923.03	29,6
Proteína total, Kjeldahl	AOAC Ed. 22,2023 2001.11	32,7
Humedad, Gravimetría	Uso de balanza halógena	13,87
Grasa, Gravimetría	AOAC Ed. 22,2023 2003.06	0,225

Nota. Con excepción de la humedad, todos los análisis fueron realizados por el laboratorio de Control y Análisis de Alimentos (LACONAL).

3.1.1.2 Evaluación del rendimiento

En la Tabla 5 se presentan los rendimientos obtenidos mediante los métodos de extracción convencional (Soxhlet) y no convencional (propano subcrítico). El método Soxhlet mostró un rendimiento mayor ($2,55 \pm 0,22$ %) en comparación con el obtenido mediante propano subcrítico ($0,152 \pm 0,0097$ %). Se analizaron las medias de los dos grupos mediante la prueba *t* de Student descrita en la Tabla 6, obteniendo un valor de *t* de -18,39 y un *p* valor de $5,14 \times 10^{-5}$, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa a favor del método Soxhlet, misma que se ve reflejada visualmente en el gráfico de barras en el que se compara las medias de los grupos (revisar Anexo 3).

Tabla 5.

Rendimiento global de las extracciones.

Método de extracción	<i>Y</i> (%)	<i>S</i> (%)	<i>CV</i> (%)
Soxhlet	2,55	0,222	8,74
Propano subcrítico	0,152	0,0097	0.064

Nota. *Y* (%): rendimiento promedio, *S* (%): desviación estándar, *CV* (%) Coeficiente de variación.

Tabla 6.

Resumen estadístico del rendimiento de extracciones (prueba t de Student)

t-test clásico			
Variable	t	gl	p-valor
Comparación del rendimiento global	-18,39	4	5,14e-5

Nota. t = estadístico t, gl = grados de libertad, p = valor de p de la prueba

Esta diferencia puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, el tiempo de extracción fue considerablemente mayor en Soxhlet (5 horas), mientras que en el propano subcrítico la extracción se realizó en 1 hora. Además, el uso de temperaturas elevadas en el método Soxhlet favoreció la extracción, ya que, según **Efthymiopoulos et al. (2018)**, el aumento de temperatura mejora la eficiencia de extracción de lípidos al debilitar las fuerzas cohesivas entre las moléculas de aceite y su matriz, favoreciendo su difusión. Otro aspecto relevante fue el tipo de solvente empleado: la combinación de solventes de diferente polaridad utilizada en Soxhlet permitió arrastrar una mayor cantidad de compuestos, mientras que el propano subcrítico, por su naturaleza apolar, extrajo principalmente compuestos lipofílicos. Finalmente, debe considerarse el contenido lipídico de la muestra, el cual, según el análisis proximal (ver apartado 3.1.1.1), fue bajo mismo que podría explicar el bajo rendimiento obtenido al utilizar el propano subcrítico.

El mayor rendimiento obtenido con Soxhlet puede ser debido a que se realizó utilizando una combinación de solventes polares y no polares, como metanol y hexano, respectivamente. Esta mezcla permite arrastrar compuestos lipídicos en los que se encuentran solubilizados carotenoides como la astaxantina. Además, el metanol favorece la desestabilización de las carotenoproteínas, mejorando el rendimiento de extracción. **Pattanaik et al. (2020)** mencionan las carotenoproteínas que son complejos estables formados por la unión de carotenoides a sitios hidrófobos de proteínas, con una alta concentración de astaxantina. Se ha reportado que el empleo de métodos enzimáticos para hidrolizar estas proteínas podría incrementar significativamente el rendimiento de extracción (**Dayakar et al., 2023**).

Por otra parte, el método de extracción con propano subcrítico presenta bajo rendimiento en relación con Soxhlet, esto principalmente por sus características fisicoquímicas, ya que este compuesto solubiliza principalmente lípidos neutros y carotenoides limitando la recuperación de otros compuestos (Feller et al., 2018; Su et al., 2024) ;. Sin embargo, Sun et al. (2018) reportan que el porcentaje de recuperación de lípidos presentes en muestras de crustáceos con la técnica de propano subcrítico es de entre el 68,94% y el 81,33 % de los lípidos totales, dependiendo de las condiciones de extracción principalmente presión empleada, si se considera el porcentaje de lípidos presentes en la materia prima empleada (ver apartado 3.1.1.1) se recuperó un total de 66,7 % de los lípidos presentes, lo que es relativamente bajo, esto sugiere la necesidad de optimizar las condiciones de extracción, esto en caso de que únicamente se haya extraído compuestos lipídicos.

3.1.2 Estimación de carotenoides totales y capacidad antioxidante.

3.1.2.1 Estimación de carotenoides totales.

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de la estimación de carotenoides totales presentes en los extractos obtenidos por medio del método Soxhlet y el método propano subcrítico. Donde el método de extracción Soxhlet presentó un contenido mayor de carotenoides totales ($8,552 \pm 0,154 \mu\text{g/mL}$) en relación con el método de propano subcrítico ($3,73 \pm 0,107 \mu\text{g/mL}$). Se analizaron las medias de los dos grupos mediante la prueba t de Student descrita en la Tabla 8, obteniendo un valor de t de -42,93 y un p valor de $1,76 \times 10^{-6}$, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa a favor del método Soxhlet, misma que se ve reflejada visualmente en el gráfico de barras en el que se compara las medias de los grupos (revisar Anexo 4).

Tabla 7.

Carotenoides totales

Extracto	Carotenoides totales ($\mu\text{g/mL}$)	Carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$)	<i>S</i> (%)	<i>CV</i> (%)
Soxhlet	8,552	44,53	0,154	1,807
Propano subcrítico	3,73	1,48	0,107	2,911

Nota. Se empleó diluciones con etanol para poder estimar los carotenoides totales.

Tabla 8.

Resumen estadístico de carotenoides totales (prueba t de Student)

t-test clásico			
Variable	t	gl	p-valor
Comparación de carotenoides totales	-42.93	4	1,76e-6

Nota. t = estadístico t, gl = grados de libertad, p = valor de p de la prueba

El principal factor que pudo influenciar dicha diferencia es el uso de los solventes empleados ya que, si bien el propano principalmente solubiliza a los lípidos y carotenoides, solventes como el metanol empleado en Soxhlet ayudan a debilitar los enlaces de las carotenoproteínas aumentando así la cantidad de carotenoides presentes en los extractos.

Los resultados obtenidos mediante Soxhlet presentan una cantidad superior de carotenoides totales con relación a lo que se ha reportado en bibliografía, ya que **Sachindra et al. (2006)** reportan valores a partir de una matriz similar en la cual obtuvo valores máximos de hasta 43,9 µg/g empleando una mezcla de alcohol isopropílico y hexano, además, evidencia la influencia del solvente con respecto a la cantidad de carotenoides presentes, reportando que el rendimiento con hexano fue el más bajo que obtuvo siendo este de 13,1 µg/g, mientras que el rendimiento del metanol fue de 29 µg/g, lo que sugiere que la combinación de solventes polares y no polares aumentó la extracción de carotenoides totales, mismos que principalmente podrían venir de las carotenoproteínas presentes en la cáscara del camarón (**Dayakar et al., 2023**).

Por otro lado, la técnica de propano subcrítico presentó un rendimiento bajo en la extracción de carotenoides, esto puede ser debido a su afinidad por compuestos no polares, ya que extrae principalmente compuestos lipídicos y carotenoides disueltos en los mismos, mas no puede solubilizar a los carotenoides contenidos en las carotenoproteínas, en comparación con estudios donde se emplean otras matrices como algas, **Feller et al., (2018)** reportan que el propano tiene una alta recuperación de carotenoides siendo de hasta 1,03 mg/g valor que es superior al obtenido en la presente investigación, esto podría deberse a las condiciones de extracción ya que las presiones empleadas son superiores a las utilizadas durante este estudio, lo que sugiere

una optimización en dichas condiciones para mejorar el rendimiento ya que el mismo está asociado principalmente a la presión y el tiempo de extracción (Pessoa et al., 2015).

3.1.2.2 Capacidad antioxidante.

La Tabla 9 muestra los resultados del ensayo DPPH para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante los dos métodos evaluados, expresados como porcentaje de inhibición de radicales libres y sus equivalentes en Trolox, calculados a partir de la curva de calibración. El extracto obtenido con propano subcrítico presentó una capacidad antioxidante mayor ($71,51 \pm 2,55 \%$) en comparación con el obtenido mediante Soxhlet ($57,16 \pm 1,40 \%$). Se analizaron las medias de los dos grupos mediante la prueba t de Student descrita en la Tabla 10, obteniendo un valor de t de 9,76 y un p valor de 0,0006, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa a favor del método de propano, misma que se ve reflejada visualmente en el gráfico de barras en el que se compara las medias de los grupos (revisar Anexo 5).

Tabla 9.

Capacidad antioxidante

Extracto	Porcentaje de inhibición promedio.	Equivalentes Trolox
Propano subcrítico	71,51	400
Soxhlet	57,16	320,53

Nota. Los porcentajes presentados son el promedio de las repeticiones realizadas, los equivalentes Trolox se calcularon en base a la curva de calibración (Ver anexo 1B).

Tabla 10.

Resumen estadístico de la capacidad antioxidante (prueba t de Student)

t-test clásico			
Variable	t	gl	p-valor
Comparación de la actividad antioxidante	9.76	4	0,0006

Nota. t = estadístico t, gl = grados de libertad, p = valor de p de la prueba

La Tabla 11 presenta el resultado de la prueba t para actividad antioxidante, donde se presentó un valor de t de 9,76 con un p valor de 0,0006, lo que indica que existió una diferencia altamente significativa a favor del método propano subcrítico, misma que se ve reflejada visualmente en el gráfico de barras en el que se compara las medias de los grupos (revisar Anexo 5).

Esta diferencia podría atribuirse a las condiciones de extracción, particularmente a la temperatura. La astaxantina, principal carotenoide presente en los crustáceos es altamente sensible a la degradación inducida por calor, luz y oxígeno (**Dang et al., 2024**), dado que el método Soxhlet opera a temperaturas considerablemente más altas que el método con propano subcrítico, es probable que parte del compuesto se haya degradado durante el proceso, disminuyendo su capacidad antioxidante.

Además, aunque el extracto obtenido con Soxhlet presentó un mayor contenido de carotenoides totales (ver apartado 3.1.2.1), este valor no se reflejó en una mayor capacidad antioxidante. Esto sugiere que no toda la fracción carotenoide contribuyó efectivamente a la actividad antioxidante, posiblemente debido a una mayor degradación térmica de la astaxantina. Otra posible explicación es la forma en la que se encuentra la astaxantina en cada extracto. En Soxhlet, una proporción significativa de la astaxantina podría permanecer unida a carotenoproteínas, las cuales presentan menor biodisponibilidad y actividad antioxidante en comparación con la astaxantina libre o disuelta en lípidos (**Nishida et al., 2023**), en este sentido, el uso de propano subcrítico habría favorecido la extracción de formas más bioaccesibles de astaxantina, a pesar de obtenerse menores concentraciones totales de carotenoides.

Al comparar estos resultados con los reportados en la literatura **Hai et al. (2024)**, informaron una inhibición del 96,4 % mediante extracción asistida por ultrasonido, lo que sugiere una mayor eficiencia de dicha técnica para liberar compuestos bioactivos y evitar su degradación térmica. De forma similar, **Luo et al. (2024)** reportaron inhibiciones del 90 % utilizando combinaciones de solventes polares y no polares, y **Sila et al. (2013)** informaron inhibiciones de hasta el 100 %. En comparación, los resultados obtenidos en este estudio fueron más bajos, lo que podría indicar una pérdida significativa del compuesto bioactivo durante la extracción o el almacenamiento.

Uno de los factores que podría haber contribuido a esta diferencia es el proceso de eliminación del solvente en el método Soxhlet, que implicó un calentamiento prolongado del extracto. Además, no se descarta un posible fallo en las condiciones de almacenamiento de las muestras,

ya que la temperatura o la calidad de los frascos ámbar utilizados podría no haber sido adecuada, facilitando la exposición al oxígeno y favoreciendo la degradación de los compuestos antioxidantes.

A pesar de ello, el uso de propano subcrítico representa una alternativa más segura y ambientalmente amigable, aprobada para su uso en alimentos (**Prameela et al., 2017**). , y cuya eliminación es sencilla. Esto minimiza la exposición del extracto a condiciones que promuevan la degradación (**Turola Barbi et al., 2019**). Aunque los valores obtenidos en este estudio no fueron óptimos en comparación con otras metodologías, los resultados sugieren que, con una adecuada optimización de las condiciones de extracción y almacenamiento, el uso de propano subcrítico podría permitir la obtención de extractos con alta calidad antioxidante.

La concentración de los diferentes compuesto presentes en los extractos dependerá de diversos factores, ya que según **Yerlikaya et al. (2013)** estas varían dependiendo de la temporada, especie y profundidad de crianza, presentando una mayor cantidad de carotenoides aquellos que poseen un mayor contenido lipídico, principalmente aquellos que han sido criados a mayor profundidad.

3.1.3 Comparación cualitativa del perfil de los extractos obtenidos mediante TLC

Se realizó una comparación de los perfiles de los extractos obtenidos tanto por el método Soxhlet como por propano subcrítico empleando TLC, además de compararlos con astaxantina comercial (ver anexo 2), a partir de los cuales se calculó los factores de retención presentados en la Tabla 8, para la cromatografía se empleó como fase estacionaria gel de sílice un compuesto polar mismo que es adecuado para compuestos lipídicos (**Santiago & Strobel, 2013**), como fase móvil se empleó un solvente mayoritariamente apolar como lo fue una combinación de hexano: acetona 7:3 comúnmente empleado para extractos de camarón como en el estudio de (**Tan et al., 2021**) mismo que permitió una separación de los extractos como se puede apreciar en la Figura 3 y Figura 4 .

Tabla 11.

Principales factores de retención del TLC

Núm. de banda	Factor de retención (Rf)				
	Soxhlet 1	Propano 1	Soxhlet 2	Propano 2	Comercial
1	-	-	-	-	0,20
2	0,43	-	0,49	-	0,46
3	-	-	-	-	0,61
4	0,69	0,71	0,81	0,79	0,80
5	0,95	0,95	0,94	0,96	0,91

Nota. Los Rf se agruparon por filas a las manchas con Rf similares.

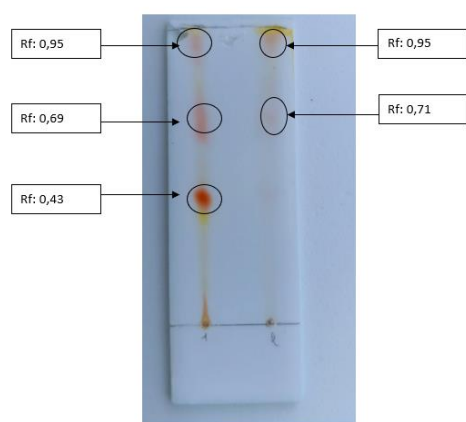


Figura 3. Comparación de los extractos mediante TLC

Nota. El extracto de la izquierda (número 1) corresponde al método Soxhlet mientras que el de la derecha (número 2) corresponde a la extracción con propano subcrítico.

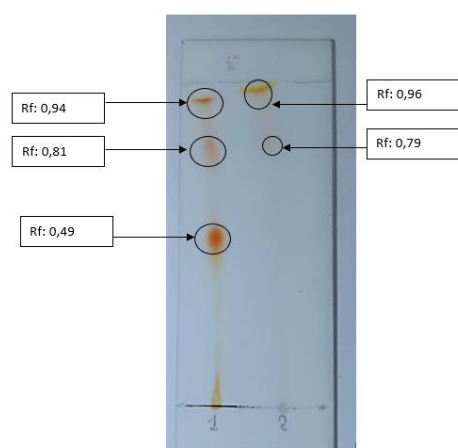


Figura 4. Comparación de los extractos mediante TLC

Nota. El extracto de la izquierda (número 1) corresponde al método Soxhlet mientras que el de la derecha (número 2) corresponde a la extracción con propano subcrítico.

Si bien los extractos obtenidos van a presentar una amplia variedad de carotenoides ya que según reporta **Gulzar et al., (2020)** encontrará principalmente Astaxantina (86-89%), β -caroteno (3.6%) y zeaxantina (1.5%) en extractos de camarón, además, de otros en menor medida como la cantaxantina, equinenona, y licopeno (**Seeger et al., 2023**). Se puede asumir que la mayor parte de carotenoides recuperados corresponden a la astaxantina al igual que en otras matrices de crustáceos (**Sachindra et al., 2005**).

Se ha podido observar la presencia de una mayor cantidad de compuestos presentes en la muestra cuya extracción se realizó con Soxhlet en relación con la muestra de propano, sin embargo, ambas muestras comparten Rf muy similares mismos que según lo reportado por **Tan et al. (2021)** y **Kobayashi & Sakamoto, (1999)**, se tratarían de diversas formas de la astaxantina entre las cuales estarán AST libre, AST monoéster y AST diéster. Que podrían estar presentes en las extracciones con Soxhlet los tres tipos, similar a lo obtenido por **Sila et al. (2013)**, mientras que en propano, podría únicamente estar presente AST monoéster y la AST diéster. En comparación con la astaxantina comercial (Anexo 2) se evidenció que esta podría contener los tres tipos de astaxantina al igual que la muestra de Soxhlet, sin embargo, en base a la intensidad de las manchas se puede estimar que en Soxhlet como en la muestra comercial, existe una mayor cantidad de astaxantina libre, mientras que en las muestras de propano aquella que predomina podría ser la astaxantina diéster.

La posible ausencia de astaxantina libre en la extracción con propano podría explicarse debido a que este tipo de astaxantina no se encuentra unida a lípidos a diferencia de la AST monoéster

y la AST diéster, esta AST diéster puede explicar además la capacidad antioxidante más elevada del extracto con propano ya que esta es más estable que la astaxantina libre misma que es más susceptible a degradación (**Miao et al., 2006; Todorović et al., 2021**).

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Utilizando desechos provenientes de la industria camaronera (cáscaras de camarón) proveniente de *Litopenaeus vannamei* como matriz de extracción se obtuvo dos extractos mediante las técnicas convencional Soxhlet y la técnica no convencional basado en la utilización de propano subcrítico. Donde la extracción con el método Soxhlet alcanzó un rendimiento del $2,55 \pm 0,22$ % mientras que el rendimiento para el extracto con propano subcrítico alcanzo un rendimiento del $0,15 \pm 0,009$ %, evidenciando una diferencia estadísticamente significativa a favor del método Soxhlet, los rendimientos en especial para la extracción están relacionados con la composición proximal de la matriz especialmente con el contenido de lípidos que fue 0,225 % y las proteínas que fue de 32,7 %.
- De los extractos obtenidos mediante ambos métodos de extracción, se evaluó los carotenoides totales presentes mediante espectrofotometría. El método convencional Soxhlet presentó $8,552 \pm 0,154$ µg/mL en relación con el método no convencional de propano subcrítico que presentó $3,73 \pm 0,107$ µg/mL, evidenciando una diferencia estadísticamente significativa a favor del método Soxhlet, esto relacionado con la capacidad de los solventes empleados para romper los enlaces existentes en las carotenoproteínas y extraer carotenos que no se encuentren únicamente disueltos en los lípidos.
- El análisis de la capacidad antioxidante de ambos métodos de extracción se realizó mediante el ensayo DPPH, a partir del cual se determinó el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH, registrando para el método de propano subcrítico un porcentaje del $(71,51 \pm 2,55$ %) en relación con el método Soxhlet $(57,16 \pm 1,40$ %), evidenciando una diferencia estadísticamente significativa a favor del método de propano subcrítico, esto asociado a la degradación del extracto durante el proceso de extracción y su posterior almacenamiento.
- El análisis cualitativo realizado mediante TLC reveló que la composición de los extractos obtenidos era diferente, evidenciando que la extracción mediante la metodología Soxhlet extrajo una mayor cantidad de compuestos entre los que se encontró manchas cuyo factor de retención se asemeja al de la astaxantina libre, astaxantina monoéster y astaxantina diéster, en comparación con el método de propano subcrítico en el que no se evidenció la posible presencia de astaxantina libre.

4.2 Recomendaciones

- Implementar pretratamientos sobre la matriz antes de la extracción, que permitan hidrolizar las carotenoproteínas, favoreciendo así una mayor liberación y recuperación de carotenoides en el extracto final.
- Optimizar las condiciones del proceso de extracción con propano subcrítico, explorando el efecto de variables como presión, temperatura y tiempo de extracción, especialmente en matrices ricas en carotenoides, como los crustáceos.
- Investigar el uso de co-solventes polares compatibles con el propano subcrítico, con el objetivo de mejorar la solubilización y recuperación de compuestos bioactivos durante el proceso de extracción.
- Identificar cualitativa y cuantitativamente los compuestos presentes en los extractos mediante técnicas analíticas más robustas, como cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a fin de obtener un perfil más detallado de los metabolitos recuperados.
- Realizar estudios de estabilidad y biodisponibilidad de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de almacenamiento, para evaluar su funcionalidad y posible aplicación en matrices alimentarias o farmacéuticas.
- Aumentar el número de réplicas en futuros ensayos experimentales, con el fin de fortalecer la validez estadística de los resultados, incrementar la robustez de las conclusiones y mejorar la confiabilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos.

MATERIALES DE REFERENCIA

- Aguado, H. C. C., Rojas, G. V. C., & Pérez, T. I. (2022). Irradiación infrarroja: un método novedoso para asistir la extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 7(1), 96–105.
<https://doi.org/10.57737/BIOTECNOLOGIAYSUST.V7I1.1646>
- Athira, C. U., & Krishnakumar, K. (2025). Antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory potential of carotenoids produced by green microalga *Asterarcys quadricellulare* (K.Behre) E. Hegewald & A. W. F. Schmidt. *Pharmacological Research - Natural Products*, 7, 100190. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2025.100190>
- Cheng, W., Yu, Q., Huang, H., Hu, K., & Gao, J. (2025). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* utilizing acidic deep eutectic solvents: A comparison with ionic liquids and organic solvents. *Microchemical Journal*, 210, 113005.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2025.113005>
- Corporación Financiera Nacional (CFN). (2023). *Ficha Sectorial*. 1(1), 5.
<https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2021/fichas-sectoriales-3-trimestre/Ficha-Sectorial-Alimentos-preparados-para-animales.pdf>
- Czett, D., Nagy, V., Kurtán, T., Király, S. B., Szabó, P., Agócs, A., Deli, J., & Böddi, K. (2025). Effect of aggregation behaviour on the antioxidant capacity of carotenoids. *Journal of Molecular Liquids*, 421, 126870.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.126870>
- Dang, Y., Li, Z., & Yu, F. (2024). Recent Advances in Astaxanthin as an Antioxidant in Food Applications. *Antioxidants*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13070879>,
- Dayakar, B., Xavier, M., Ngasotter, S., Dhanabalan, V., Porayil, L., Balange, A. K., & Nayak, B. B. (2023). Extraction, optimization, and functional quality evaluation of carotenoproteins from shrimp processing side streams through enzymatic process. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(53), 62315–62328.
<https://doi.org/10.1007/S11356-023-30232-1/METRICS>
- Donoso, A., González-Durán, J., Muñoz, A. A., González, P. A., & Agurto-Muñoz, C. (2021). Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials. *Pharmacological Research*, 166, 105479.
<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105479>

- Douglas, M., Orozco, S., Rosa, M., Peñaranda, A., Ortiz, D. A., Luis, O., & Rosas, A. (2018). Harina de subproductos de camarón como oportunidad de inclusión en dietas para alimentación animal. *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 5(1). <https://doi.org/10.23850/RAA.V5I1.4749>
- Efthymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo-Profil, A., Eveleigh, A., Aliev, A., Kay, A., & Mills-Lamprey, B. (2018). Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops and Products*, 119, 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.04.008>
- Feller, R., Matos, Â. P., Mazzutti, S., Moecke, E. H. S., Tres, M. V., Derner, R. B., Oliveira, J. V., & Junior, A. F. (2018). Polyunsaturated ω -3 and ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 437–443. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2017.11.015>
- Feng, W., Xiong, H., Wang, W., Duan, X., Yang, T., Wu, C., Yang, F., Wang, T., & Wang, C. (2020). A facile and mild one-pot process for direct extraction of lipids from wet energy insects of black soldier fly larvae. *Renewable Energy*, 147, 584–593. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.08.137>
- Gallardo, C. G. V. (2023). Aprovechamiento de los subproductos del camarón (*Litopenaeus Vannamei*) para el desarrollo de un sazón de mariscos. *Izote Journal*, 2(1), 47–58. <https://investigacion.ujmd.edu.sv/index.php/investigacionesujmd/article/view/48>
- Gao, M., Tang, H., & Zhu, H. (2024). Advances in extraction, utilization, and development of chitin/chitosan and its derivatives from shrimp shell waste. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(5). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70008>
- Gonzabay, Á., Vite, H., Garzón, V., & Quizhpe, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Polo Del Conocimiento*, 6(9), 1040–1058. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3093>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 2020 94:3, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02689-3>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* 2023, Vol.

11, Page 2248, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/PR11082248>

- Gulzar, S., Raju, N., Chandragiri Nagarajarao, R., & Benjakul, S. (2020). Oil and pigments from shrimp processing by-products: Extraction, composition, bioactivities and its application- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 307–319. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.04.005>
- Hai, T. C., Van Man, P., & Hong Anh, L. T. (2024). Optimization of ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shells using deep eutectic solvent and ethanol as a co-solvent. *LWT*, 212, 116965. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.116965>
- Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2326–2331. <https://doi.org/10.1002/JSFA.5633>
- Kim, B., Youn Lee, S., Lakshmi Narasimhan, A., Kim, S., & Oh, Y. K. (2022). Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: Recent advances. *Bioresource Technology*, 343, 126124. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126124>
- Kobayashi, M., & Sakamoto, Y. (1999). Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 21(4), 265–269. <https://doi.org/10.1023/A:1005445927433/METRICS>
- Kohandel, Z., Farkhondeh, T., Aschner, M., Pourbagher-Shahri, A. M., & Samarghandian, S. (2022). Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 145, 112179. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112179>
- Kowalska, T., & Sajewicz, M. (2022). Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules*, 27(19), 6607. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196607>
- Kumar, S., Kumar, R., Kumari, A., & Panwar, A. (2022). Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1064–1082. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202100391>

- Li, F., Muhmood, A., Tavakoli, S., Park, S., Kong, L., Zhu, H., Wei, Y., & Wei, Y. (2024). Subcritical low temperature extraction of bioactive ingredients from foods and food by-products and its applications in the agro-food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(23), 8218–8230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2198009>
- Liao, J., Wang, J., Lu, H., Sheng, G., Peng, P., & Hsu, C. S. (2025). Solvent effect in Soxhlet extraction of source rocks. *Organic Geochemistry*, 200, 104917. <https://doi.org/10.1016/J.ORGGEOCHEM.2024.104917>
- Liu, H. M., Yao, Y. G., Ma, Y. X., & Wang, X. De. (2020). Ultrasound-assisted desolventizing of fragrant oil from red pepper seed by subcritical propane extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104943. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2019.104943>
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, D., Wei, S., Sun, Q., Xia, Q., Shi, W., Ji, H., & Liu, S. (2021). Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods*, 10(11), 2603. <https://doi.org/10.3390/FOODS10112603>
- Luo, F., Wang, S., Zhang, X., Liu, Z., Zhu, R., & Xue, W. (2024). Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and Preparation of Astaxanthin Liposomes. *Molecules*, 29(14), 3320. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29143320>
- Luque, M. D., & Priego, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.11.027>
- Mao, X., Guo, N., Sun, J., & Xue, C. (2017). Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. *Journal of Cleaner Production*, 143, 814–823. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.12.042>
- Martínez, Ó., Calvo, M. M., & Gómez-Estaca, J. (2020). Recent advances in astaxanthin micro/nanoencapsulation to improve its stability and functionality as a food ingredient. *Marine Drugs*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/MD18080406>,
- Mezzomo, N., Maestri, B., Dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383–1391.

<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.06.018>

- Miao, F., Lu, D., Li, Y., & Zeng, M. (2006). Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 352(2), 176–181.
<https://doi.org/10.1016/J.AB.2006.03.006>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
<https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Mussagy, C. U., Caicedo Paz, A. V., Cornejo, P., Santander, C., González, F., Voloua, R. G., Besoain, X., Larach, A., Salinas, A., Godoy, K., & Sangaré, D. (2025). CFD insights into microwave- assisted deep eutectic solvent for the recovery of astaxanthin from bacteria *Paracoccus carotinifaciens*: From extraction to agricultural applications. *Separation and Purification Technology*, 360, 131212.
<https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2024.131212>
- Nair, A., Ahirwar, A., Singh, S., Lodhi, R., Lodhi, A., Rai, A., Jadhav, D. A., Harish, D. A., Varjani, S., Singh, G., Marchand, J., Schoefs, B., & Vinayak, V. (2023). Astaxanthin as a King of Ketocarotenoids: Structure, Synthesis, Accumulation, Bioavailability and Antioxidant Properties. *Marine Drugs*, 21(3), 176. <https://doi.org/10.3390/MD21030176>
- Nishida, Y., Berg, P., Shakersain, B., Hecht, K., Takikawa, A., Tao, R., Kakuta, Y., Uragami, C., Hashimoto, H., Misawa, N., & Maoka, T. (2023). Astaxanthin: Past, Present, and Future. *Marine Drugs*, 21(10), 514. <https://doi.org/10.3390/md21100514>
- Pachuta-Stec, A. (2021). Antioxidant Activity of 1,2,4-Triazole and its Derivatives: A Mini-Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(7), 1081–1094.
<https://doi.org/10.2174/1389557521666210401091802>
- Panagiotakopoulos, I., Karantonis, H. C., Kartelias, I. G., & Nasopoulou, C. (2023). Ultrasonic-Assisted Extraction of Astaxanthin from Shrimp By-Products Using Vegetable Oils. *Marine Drugs*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/MD21090467>
- Patel, A. K., Tambat, V. S., Chen, C. W., Chauhan, A. S., Kumar, P., Vadrade, A. P., Huang, C. Y., Dong, C. Di, & Singhanian, R. R. (2022). Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 364, 128030.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.128030>

- Pattanaik, S. S., Sawant, P. B., Xavier, K. A. M., Dube, K., Srivastava, P. P., Dhanabalan, V., & Chadha, N. K. (2020). Characterization of carotenoprotein from different shrimp shell waste for possible use as supplementary nutritive feed ingredient in animal diets. *Aquaculture*, 515, 734594. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734594>
- Pérez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060505>
- Pessoa, A. S., Podestá, R., Block, J. M., Franceschi, E., Dariva, C., & Lanza, M. (2015). Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. *The Journal of Supercritical Fluids*, 101, 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.03.006>
- Phadtare, I., Vaidya, H., Hawboldt, K., & Cheema, S. K. (2021). Shrimp oil extracted from shrimp processing by-product is a rich source of omega-3 fatty acids and astaxanthin-esters, and reveals potential anti-adipogenic effects in 3T3-L1 adipocytes. *Marine Drugs*, 19(5), 259. <https://doi.org/10.3390/MD19050259/S1>
- Pok, P. S., Stefanini, M. I., & Calvo, N. S. (2023). Sustainable production of astaxanthin from *Dilocarcinus pagei* crab and optimisation of its extraction with edible oils. *Heliyon*, 9(6), e17381. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E17381>
- Prado, E., Valarezo, C., Rimbaldo, C., & Carvajal, H. (2024). Vista de Análisis de la Producción y Exportación del Sector Camaronero en Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1
- Prameela, K., Venkatesh, K., Immandi, S. B., Kasturi, A. P. K., Rama Krishna, C., & Murali Mohan, C. (2017). Next generation nutraceutical from shrimp waste: The convergence of applications with extraction methods. *Food Chemistry*, 237, 121–132. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.097>
- Rkhaila, A., Chtouki, T., Erguig, H., Haloui, N. El, & Ounine, K. (2021). Chemical Properties of Biopolymers (Chitin/Chitosan) and Their Synergic Effects with Endophytic *Bacillus* Species: Unlimited Applications in Agriculture. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26041117>
- Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP,

- and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123470.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123470>
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *LWT - Food Science and Technology*, 38(3), 221–225.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2004.06.003>
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26(10), 1092–1098.
<https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2005.07.002>,
- Salas, C., Chacón, A., & Zamora, L. (2015). La harina de cefalotórax de camarón en raciones para gallinas ponedoras. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 333.
<https://doi.org/10.15517/AM.V26I2.19327>
- Sánchez, 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(2), 164–173.
<https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2010.12.009>
- Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. *Methods in Enzymology*, 533, 303–324. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>
- Scott, K. J. (2001). Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F2.2.1-F2.2.10. <https://doi.org/10.1002/0471142913.FAF0202S00>
- Seeger, J., Wendisch, V. F., & Henke, N. A. (2023). Extraction and Purification of Highly Active Astaxanthin from *Corynebacterium glutamicum* Fermentation Broth. *Marine Drugs*, 21(10), 530. <https://doi.org/10.3390/MD21100530/S1>
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S., & Ramaswamy, H. S. (2021). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105666.
<https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105666>
- Shi, Y., Ma, Y., Zhang, R., Ma, H., & Liu, B. (2015). Preparation and characterization of foxtail millet bran oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide

- extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3099–3104.
<https://doi.org/10.1007/S13197-014-1311-0/METRICS>
- Si, P., & Zhu, C. (2022). Biological and neurological activities of astaxanthin. *Molecular Medicine Reports*, 26(4), 300. <https://doi.org/10.3892/MMR.2022.12816>
- Sila, A., Ayed-Ajmi, Y., Sayari, N., Nasri, M., Martinez-Alvarez, O., & Bougatef, A. (2013). Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Astaxanthin Extracted from the Shell Waste of Deep-water Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *The Natural Products Journal*, 3(2), 82–89. <https://doi.org/10.2174/2210315511303020002>
- Stachowiak, B., & Szulc, P. (2021). Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules*, 26(9), 2666. <https://doi.org/10.3390/molecules26092666>
- Su, Y., Cai, Y., Chang, C., Li, J., Sun, Y., Zhao, Q., Huang, Z., Xiong, W., Gu, L., & Yang, Y. (2024). Comparative analysis on the properties of egg yolk lipids extracted by different extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 61(11). <https://doi.org/10.1007/S13197-024-05981-7>,
- Sun, D., Cao, C., Li, B., Chen, H., Li, J., Cao, P., & Liu, Y. (2018). Antarctic krill lipid extracted by subcritical n-butane and comparison with supercritical CO₂ and conventional solvent extraction. *LWT*, 94, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.04.024>
- Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M. F., Aadil, R. M., Tan, X., & Liu, Z. (2021). Comparison of Different Methods for Extracting the Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Chemical Composition and Biological Activity. *Molecules*, 26(12), 3569. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123569>
- Todorović, B., Grujić, V. J., Krajnc, A. U., Kranvogel, R., & Ambrožič-Dolinšek, J. (2021). Identification and Content of Astaxanthin and Its Esters from Microalgae *Haematococcus pluvialis* by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS after Extraction with Various Solvents. *Plants*, 10(11), 2413. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10112413>
- Turola Barbi, R. C., de Souza, A. R. C., Hamerski, F., Lopes Teixeira, G., Corazza, M. L., & Hoffmann Ribani, R. (2019). Subcritical propane extraction of high-quality inajá (*Maximiliana maripa*) pulp oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 153, 104576. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2019.104576>

- Wang, W. Y., Yan, Y. Y., Liu, H. M., Qi, K., Zhu, X. L., Wang, X. De, & Qin, G. Y. (2021). Subcritical low temperature extraction technology and its application in extracting seed oils. *Journal of Food Process Engineering*, 44(10), e13805.
<https://doi.org/10.1111/JFPE.13805>
- Yerlikaya, P., Topuz, O. K., Buyukbenli, H. A., & Gokoglu, N. (2013). Fatty Acid Profiles of Different Shrimp Species: Effects of Depth of Catching. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(3), 290–297. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.646388>
- Zhang, F., Wang, X. de, Li, K., Yin, W. ting, Liu, H. min, Zhu, X. liang, & Hu, P. (2024). Characterisation of flavourous sesame oil obtained from microwaved sesame seed by subcritical propane extraction. *Food Chemistry: X*, 21, 101087.
<https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2023.101087>

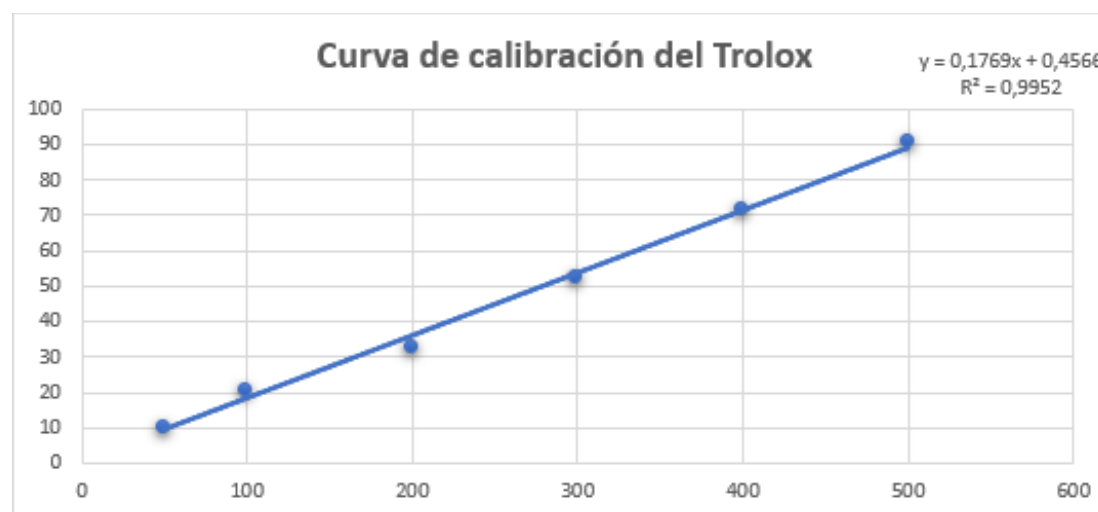
ANEXOS

Anexo 1 A. Valores de porcentaje de inhibición obtenidos para la curva de calibración de Trolox

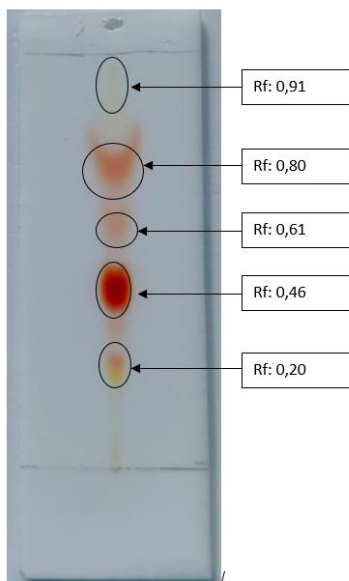
Concentración de Trolox (μM)	% Inhibición DPPH
50	10.09
100	20.52
200	32.41
300	51.96
400	71.51
500	90.39

Nota. Se empleó estos valores en un diagrama de dispersión para obtener una ecuación de regresión lineal.

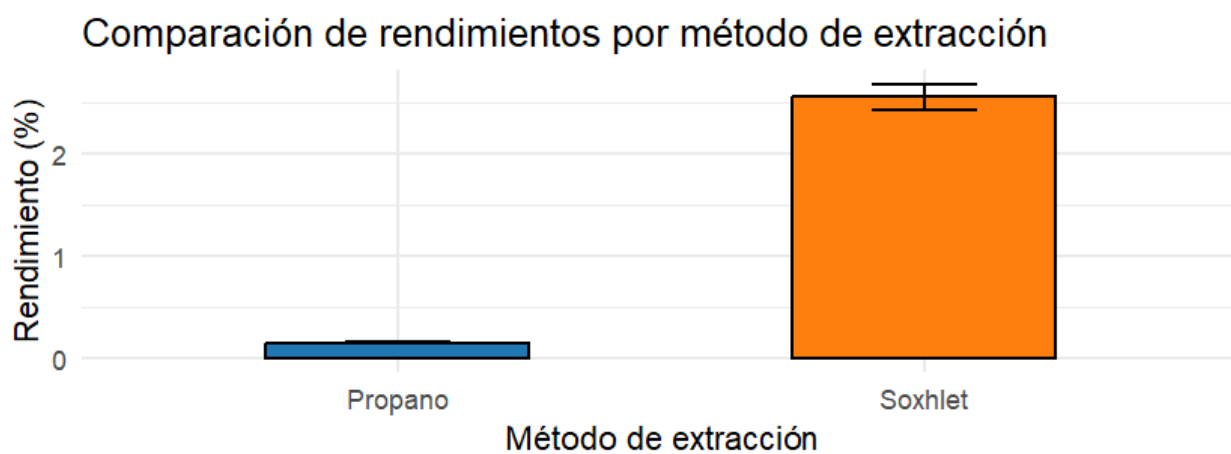
Anexo 1 B. Curva de calibración de concentración de Trolox



Anexo 1. Resultados de la cromatografía de capa fina de astaxantina comercial.

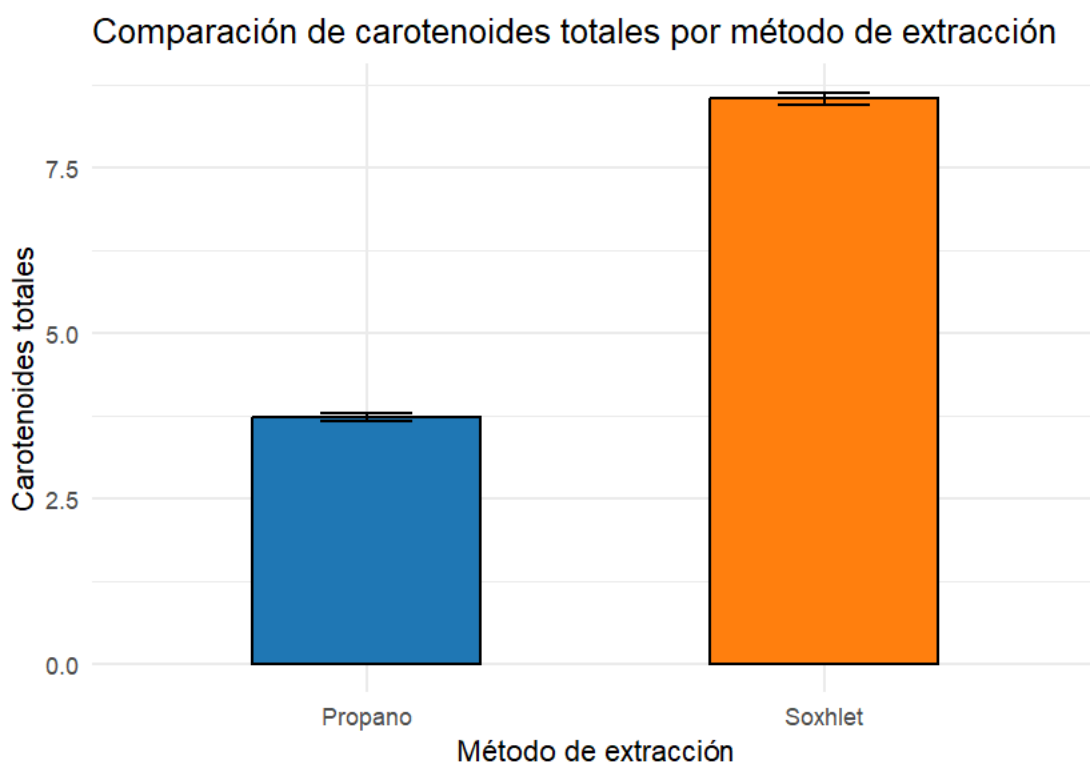


Anexo 2. Gráfico de barras de comparación del rendimiento global entre los métodos de extracción



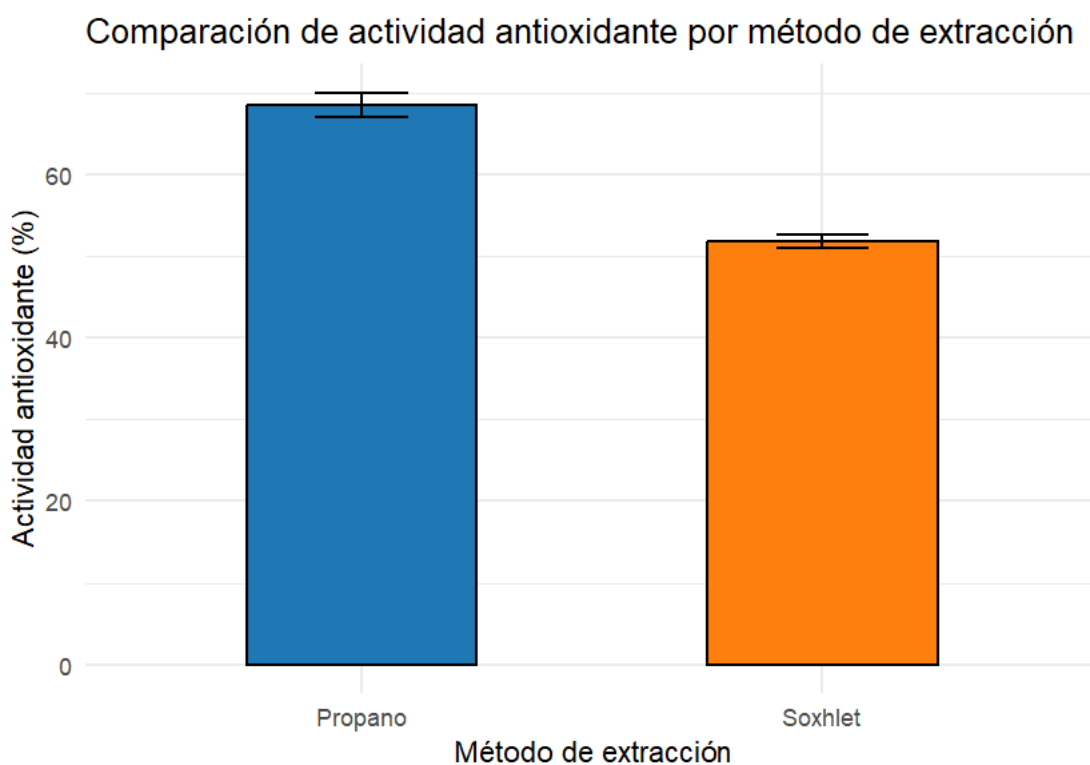
Nota. Las barras representan la media $\pm$ error estándar ($n = 3$). Soxhlet presentó un rendimiento significativamente mayor en comparación con Propano ($p < 0.05$, IC 95%).

Anexo 3. Gráfico de barras de comparación de carotenoides totales entre los métodos de extracción



Nota. Las barras representan la media $\pm$ error estándar ($n = 3$). Los carotenoides totales fueron significativamente más altos con Soxhlet ($p < 0.05$, IC 95%).

Anexo 4. Gráfico de barras de comparación de la actividad antioxidante entre los métodos de extracción



Las barras representan la media $\pm$ error estándar ($n = 3$). La actividad antioxidante fue significativamente mayor con Propano ($p < 0.05$, IC 95%).

Anexo 5. Fotografía

Anexo 6 A. Lavado de la materia



Anexo 6 B. Secado de la materia prima



Anexo 6 C. Triturado de la materia prima



Anexo 6 D. Extracción mediante Soxhlet



Anexo 6 E. Concentración del extracto

Anexo 6 F. Pesaje del extracto obtenido



Anexo 6 G. Secado del extracto



Anexo 6 H. Recuperación del extracto



Anexo 6 I. Extracción con propano propano

Anexo 6 J. Recuperación del extracto de



Anexo 6 K. Ensayo DPPH



Anexo 6 L. Estimación de carotenoides



Anexo 6 M. Ensayo TLC



Anexo 6. Tablas

Anexo 7 A. Valores crudos del rendimiento de extracción

Soxhlet				Propano subcrítico		
Réplicas	m _{MP}	m _{Ex}	Y(%)	m _{MP}	m _{Ex}	Y(%)
1	15,42	0,36	2,55	50	0,081	0,162

2	15,47	0,43	2,78	40	0,057	0,142
3	15,40	0,39	2,53	50	0,076	0,152
Promedio	15,43	0,39	2,55±0,22	46,6	0,071	0,152±0,009

Nota. m_{MP}: masa de la materia prima (g). m_{Ex}: masa del extracto. Y(%): rendimiento de extracción.

Anexo 7 B. Valores crudos de la estimación de carotenoides totales

Réplica	Absorbancia	Carotenoides µg/mL
Soxhlet 1	0,523; 0,548; 0,531	8,42
Soxhlet 2	0,548; 0,543; 0,545	8,72
Soxhlet 3	0,531; 0,535; 0,529	8,50
Promedio	-	8,55 ± 0,15
Propano 1	0,481; 0,479; 0,485	3,85
Propano 2	0,548; 0,543; 0,463	3,68
Propano 3	0,454; 0,456; 0,461	3,65
Promedio	-	3,73 ± 0,10
Blanco	0	

Anexo 7 C. Valores crudos de absorvancia y resultados del ensayo DPPH

Réplica	Absorbancia	%Inhibición	C_{Trolox}
Soxhlet 1	0,229; 0,234; 0,239	52,69	295,24
Soxhlet 2	0,239; 0,241; 0,238	51,41	288,02
Soxhlet 3	0,236; 0,246; 0,253	49,87	279,34
Promedio	-	51,32 ± 1,40	287,53 ± 7,96
Propano 1	0,181; 0,171; 0,175	67,77	380,54
Propano 2	0,179; 0,188; 0,189	65,22	366,09
Propano 3	0,163; 0,171; 0,161	70,33	395,00
Promedio	-	67,77 ± 2,55	380,54 ± 14,45
Blanco	0.444 ± 0.256		
Control	0.049 ± 0.003		

Nota. %Inhibición: porcentaje de inhibición de DPPH. C_{Trolox}: Concentración de Trolox en $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Anexo 7 D. Factores de retención de la cromatografía de capa fina de astaxantina comercial

Nº de mancha	Soxhlet		
	D_c (cm)	D_{fm} (cm)	Rf
1	1.1	5,4	0,20
2	2.5	5,4	0,46
3	3,3	5,4	0,61
4	4,3	5,4	0.80
5	4,9	5,4	0,91

Nota. D_c: distancia recorrida por el compuesto. D_{fm}: distancia recorrida por la fase móvil. Rf: factor de retención.

Anexo 7 E. Resumen completo de las pruebas estadísticas para rendimiento

Prueba	Resultado	Conclusión
Normalidad (Shapiro-Wilk)	Soxhlet: W = 0.9865, p = 0.8946	Cumple con una distribución normal en ambos grupos

Propano: W = 0.9889, p = 0.9183		
Homogeneidad de varianzas (Levene)	F = 3.515, p = 0.1341	Las varianzas son homogéneas
Prueba t (dos muestras)	t = -18.39, gl = 4, p = 5.14e-05	Existe una diferencia significativa
Promedios	Soxhlet: 2.55 % Propano: 0.15 %	Soxlet presenta un mayor rendimiento.

Nota. IC = intervalo de confianza del 95 %. W = estadístico de Shapiro-Wilk; F = estadístico de Levene; t = estadístico t de Student; gl = grados de libertad; p = nivel de significancia. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Anexo 7 F. Resumen completo de las pruebas estadísticas para carotenoides totales

Prueba	Resultado	Conclusión
Normalidad (Shapiro-Wilk)	Soxhlet: W = 0,932, p = 0,497 Propano: W = 0,859, p = 0,266	Cumple con una distribución normal en ambos grupos
Homogeneidad de varianzas (Levene)	F = 0,133, p = 0,7338	Las varianzas son homogéneas
Prueba t (dos muestras)	t = -44,14, gl = 4, p = 1,575e-6	Existe una diferencia significativa
Promedios	Soxhlet: 8,55 µg/mL Propano: 3,81 µg/mL	Soxlet presenta una mayor cantidad de carotenoides totales

Nota. IC = intervalo de confianza del 95 %. W = estadístico de Shapiro-Wilk; F = estadístico de Levene; t = estadístico t de Student; gl = grados de libertad; p = nivel de significancia. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Anexo 7 G. Resumen completo de las pruebas estadísticas para actividad antioxidante

Prueba	Resultado	Conclusión
Normalidad (Shapiro-Wilk)	Soxhlet: $W = 0,997$, $p = 0,899$ Propano: $W = 1$, $p = 0,997$	Cumple con una distribución normal en ambos grupos
Homogeneidad de varianzas (Levene)	$F = 0,620$, $p = 0,4749$	Las varianzas son homogéneas
Prueba t (dos muestras)	$t = 9,76$, $df = 4$, $p = 0,0006$	Existe una diferencia significativa
Promedios	Soxhlet: 51,85 % Propano: 68,48 %	Soxlet presenta un mayor rendimiento.

Nota. IC = intervalo de confianza del 95 %. W = estadístico de Shapiro-Wilk; F = estadístico de Levene; t = estadístico t de Student; gl = grados de libertad; p = nivel de significancia. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Anexo 7. Análisis proximal realizado por la LACONAL



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO DE CONTROL Y ANÁLISIS DE ALIMENTOS

01597

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No: 25-025		R01-7.8.03				
Solicitud N°: 25-025		Pág.: 1 de 1				
Fecha recepción:	15 de mayo de 2025	Fecha de ejecución de ensayos: 19 al 21 de mayo de 2025				
Información del cliente:						
Empresa:	C.I./RUC: 1850337815					
Representante:	VICTOR NARANJO	Tlf: 0998846807				
Dirección:	Ambato	Email: vnaranjo7815@uta.edu.ec				
Ciudad:	Ambato					
Descripción de las muestras:						
Producto:	Cáscara de camarón	Peso / Volumen: 200g				
Marca comercial:	n/a	Tipo de envase: funda plástica				
Lote:	n/a	No de muestras: una				
F. Elb.:	n/a	F. Exp.: n/a				
Conservación:	Ambiente: Refrigeración: X Congelación:	Almac. en Lab: 8 días				
Cierres seguridad:	Ninguno: X Intactos: Rotos:	Muestreo por el cliente: 08 de mayo de 2025				
RESULTADOS OBTENIDOS						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados/Técnica	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Cáscara de camarón	02525064	Ninguno	Cenizas, Gravimetría	AOAC Ed. 22, 2023 923.03	%	29,6
		Ninguno	Proteína total, Kjeldhal	AOAC Ed. 22, 2023 2001.11	%(Nx6,25)	32,7
		Ninguno	Grasa, Gravimetría	AOAC Ed. 22, 2023 2003.06	%	0,225
Conds. Ambientales: 21.1°C; 54,2%HR						
				Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad		
Autorización para transferencia electrónica de resultados: Si						
Fecha de emisión del certificado: 21 de Mayo de 2025						

Nota: La muestra fue suministrada por el cliente y los resultados se aplican a la muestra en las condiciones recibidas. El Laboratorio se responsabiliza exclusivamente de los resultados emitidos en base a la muestra entregada por el cliente.

El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".



Dir.: Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi, Av. Los chasquis y Río Payamino
Edificio Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología / Ambato - Ecuador
(593) 32400967 ext. 5517; 5518 <http://laconal.uta.edu.ec> laconal@uta.edu.ec