



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**MÉTODO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ASTAXANTINA EN RESIDUOS DE CAMARÓN
FERMENTADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA

RAÚL ENRIQUE MORALES RODRÍGUEZ

Dedicatorias

A Dios.- Por dejar disfrutar de todas las personas que quiero y por permitirme lograr mis metas.

A mis padres.- Raúl Enrique y Faly, por su cariño y por todo su amor incondicional, y por todo lo que dejaron de comprarse por dármelo a mí los quiero mucho.

A mis hermanos.- Daniel, Ruth y Natalia, por todos los momentos divertidos que pasamos juntos.

A mis tíos.- Por su comprensión y apoyo que me han brindado y por su cariño incondicional que tienen hacia mí.

Agradecimientos

Al ITSON por darme la oportunidad de crecer como profesionalista y como persona.

A mis asesores Dr. Jaime López C. y Dra. Dalia I. Sánchez M. por su apoyo y por darme confianza y consejos para realizar este proyecto.

A mis revisores M.C. Laura Gassos y M.C. Jorge Cabrera. Por su apoyo en la terminación de este proyecto.

A mis maestros por su apoyo y por su contribución para lograr mi formación como profesionalista.

A mis amigos y compañeros de tesis, Oliviert, Jesús Alfredo, Karina, Lilian, Sayda, Patty, Tere y Berenice.

A mis amigos por todos los momentos divertidos y frustrantes que pasamos como alumnos y a mis amigos de cananea los cuales fueron muy divertidos. Portado lo que les pude aprender y saber cual es la importancia que tiene un amigo.

ÍNDICE

	Pag.
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Justificación.....	3
1.2 Planteamiento del problema.....	5
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Hipótesis.....	7
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	
2.1 Aspectos generales de los residuos del camarón.....	8
2.1.1 Camarón.....	8
2.1.2 Fermentación láctica de los residuos de camarón.....	11
2.2 Astaxantina.....	14
2.2.1 Carotenoides.....	14
2.2.2 Estructura química.....	15
2.2.3 Fuentes.....	16
2.2.4 Extracción de astaxantina de residuos de camarón.....	17
2.2.4.1 Usos.....	18
2.3 Cromatografía.....	19
2.3.1 Aspectos teóricos.....	19
2.3.2 Tipos de cromatografía líquida (LC).....	20
2.3.3 Columnas.....	21
2.3.4 Detectores.....	22
2.3.5 Validación de técnicas analíticas.....	24
2.4 Metodología de cromatografía líquida propuestas para la cuantificación de astaxantina.....	26
2.4.1 Preparación de muestras.....	26

2.4.2 Métodos de extracción por solventes.....	27
2.4.3 Identificación.....	28
2.4.3 Condiciones cromatográficas.....	28
III. MÉTODO Y MATERIALES	
3.1 Patrones y reactivos.....	30
3.2 Localización del experimento y material biológico.....	30
3.2.1 Preparación de la muestra.....	31
3.2.2 Fermentación láctica.....	31
3.3 Desarrollo del proceso.....	32
3.4 Análisis y equipo HPLC.....	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Preparación de la muestra.....	34
4.2 Condiciones cromatográficas.....	35
4.3 Identificación.....	35
4.4 Validación del método.....	37
4.4.1 Linealidad.....	37
4.4.2 Precisión.....	39
4.4.3 Recuperación.....	39
CONCLUSIÓN	42
LITERATURA CITADA	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Composición química del camarón.....	10
2	Composición del cefalotórax o cabeza de camarón.....	11
3	Tratamientos para la recuperación de la muestra.....	27
4	Metodología para la extracción de pigmentos con solventes....	28
5	Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de astaxantina.....	29
6	Condiciones cromatográficas para la cuantificación de astaxantina.....	35
7	Recta patrón de astaxantina.....	38
8	Valores de precisión del método.....	39
9	Valores de recuperación del método para astaxantina.....	40
10	Contenido de astaxantina en las muestras.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Partes del camarón.....	9
2	Estructura química de la astaxantina.....	15
3	Tratamiento de residuos de camarón y extracción astaxantina	32
4	HPLC cromatograma de una solución del estándar de astaxantina (A) y una muestra de la fracción lipídica del hidrolizado de residuos de camarón (B). Pico principal: astaxantina	36
5	Espectro de absorción de astaxantina.....	37
6	Grafica de la recta patrón para astaxantina.....	38

RESUMEN

Este trabajo presenta un método HPLC para la identificación y cuantificación de astaxantina en residuos de camarón fermentado. Para la extracción de astaxantina, se utilizó metanol sin saponificación. La separación y cuantificación se llevó a cabo en una columna analítica de 5 μm SS Exil ODS C18 (250 mm x 4.6 mm), a 25 °C y detección a $\lambda = 476$ nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de solvente (agua:metanol:diclorometano:acetonitrilo, 4.5:28:22:45.5 v/v/v/v), a una velocidad de 1 ml/min. Con las condiciones cromatográficas óptimas se validó el método a través de parámetros como precisión (% de desviación estándar relativa, 1.7), linealidad (0.9991) y recuperación (100.8 %). El contenido promedio de astaxantina en la fase lipídica del residuo de camarón fermentado fue 2.65 ± 0.40 mg/g de materia seca, lo cual justifica su utilización en la producción acuícola.

I. INTRODUCCIÓN

En la región sur de Sonora en el Noroeste de México la pesca y el cultivo de camarón son fuente importante de trabajo para las personas que viven principalmente en los municipios costeros. En los últimos años se han capturado alrededor de 80,000 toneladas de camarón por año, y aproximadamente del 43 al 45 % del peso corresponde a la fracción no comestible en peso del camarón y se le denomina cabeza, cefalotórax o residuo (Cira *et al.*, 2002).

La riqueza del cefalotórax o cabeza de camarón en lo que respecta a sus componentes; quitina, proteína y pigmentos, lo convierten en una fuente susceptible de ser procesada para obtener subproductos útiles en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Cañipa y Duran, 1995; Gildberg, 2001). Actualmente la fermentación láctica es utilizada para el tratamiento y reducción de los desechos de camarón, de la cual adicionalmente se pueden recuperar productos de alto valor agregado tales como quitina, pigmentos y proteína (Cira *et al.*, 2002).

La astaxantina es un pigmento que da el característico color rojo-naranja a los crustáceos, debido al complejo entre proteína y la astaxantina, éste se encuentra unido a una proteína lo que determina la coloración. Además debido a la importancia que tiene la coloración en la industria alimentaría es porque se podrían utilizar a los residuos de crustáceos como fuente de pigmentación.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Actualmente la demanda del camarón de bahía de granjas camaronícolas ha presentado un incremento en el mercado nacional e internacional, lo cual implica la generación de una gran cantidad de desperdicios como son las cáscaras y la cabeza de camarón, los cuales representan problema de contaminación a nivel regional y nacional. Actualmente, se ha propuesto la fermentación láctica de estos residuos como una alternativa para la recuperación de sus componentes principales tales como quitina, proteína y pigmentos (astaxantina), lo cual implica dar un valor agregado a estos subproductos.

Los pigmentos carotenoides obtenidos del camarón son utilizados de diferentes formas en la industria alimentaría ya que en particular pueden proporcionar una coloración rojo-anaranjada, mientras que en la industria farmacéutica se comercializan por su función como un antioxidante. La astaxantina tiene un gran valor agregado en el mercado debido a que imparten el color característico a la carne de los salmones.

Mediante esta investigación se pretende desarrollar y validar un método HPLC para la separación y cuantificación de la astaxantina presente en los residuos de camarón, y a su vez generar beneficios económicos y reducir la contaminación ambiental.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una herramienta analítica que puede ser utilizada en la determinación del contenido de astaxantina en extractos obtenidos del residuo de camarón fermentado.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general:

Desarrollar un método de cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar la astaxantina en la fase lipídica obtenida por fermentación láctica de los residuos de camarón.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Proponer la metodología adecuada para la extracción de astaxantina de la fase lipídica del residuo de camarón fermentado.
- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de la astaxantina.
- Validar el método HPLC propuesto.
- Cuantificar la astaxantina en la fase lipídica.

1.4 HIPÓTESIS

Es posible la extracción por solventes de astaxantina de los residuos de camarón para su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Aspectos generales de los residuos del camarón

2.1.1 Camarón

El camarón (*Penaeus sp.*) es un crustáceo que pertenece a la orden Decapoda al igual que los cangrejos de río, langostas y cangrejos de mar, e incluye a los crustáceos más grandes y algunos más altamente especializados. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes, cefalotórax y abdomen, comercialmente conocidos como cabeza y cola, respectivamente (Barnes, 1977). El cefalotórax, una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón que contiene a la cabeza, los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. La cresta en la parte superior es rígida, dentada y termina en un rostro alargado por delante de la cabeza. El abdomen se divide en seis segmentos. El último de ellos termina en una punta fina llamada telson y por debajo está la cola que le sirve para nadar (figura 1). Por dentro del abdomen están los intestinos (Dore y Frimodt, 1987).

Presenta como característica principal un esqueleto de origen quitinoso, secretado de la epidermis como calcificación. En su exoesqueleto se evidencia más la segmentación del cuerpo, el cual se divide en tres regiones principales: cefalotórax, abdomen y telson (Muncy, 1984).

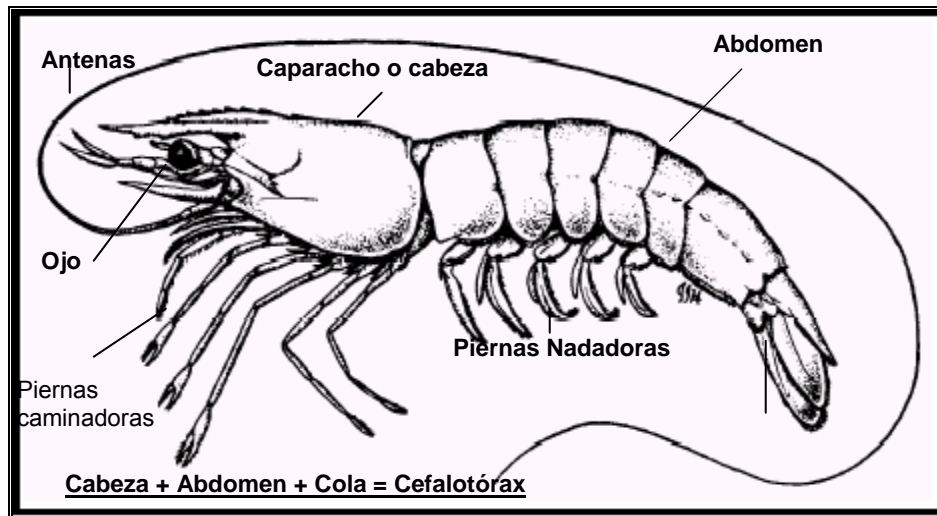


Figura 1. Partes del camarón (*Penaeus sp.*).

Fuente: Muncy, 1984.

Todos los colores y combinaciones de colores producidos por pigmentos en el exoesqueleto y por cromóforos se encuentran en los decapodos. Muchos camarones pueden adaptar la coloración de su cuerpo al terreno en que viven. También, la superficie corporal y la coloración de algunos decapodos está especialmente adaptada para ciertos hábitat (Barnes, 1977).

El camarón es excepcionalmente nutritivo. Es un alimento con alto contenido de proteínas y bajo en grasas, en la tabla 1 se presenta la composición química de la porción comestible del camarón. En general su valor calorífico es de 4.5 kJ/ g; además contiene entre 75 y 80 % de agua, de 18-20 % de proteínas y cerca de 1 % de grasa. También es una fuente importante de minerales,

especialmente calcio, vitaminas tales como tiamina, niacina y riboflavina, y pigmentos.

Tabla 1. Composición química del camarón.

Componente	Cantidad (100 g de porción comestible)
Agua	78.20%
Proteína	18.1 g
Grasa	0.8 g
Carbohidratos	1.5 g
Calorías	91.0 Kcal
Calcio	63.0 mg
Fósforo	166.0 mg
Hierro	1.60 mg
Tiamina	0.02 mg
Niacina	3.20 mg
Riboflavina	0.03 mg

Fuente: Charley, 2000.

En los últimos años se han capturado alrededor de 80,000 toneladas de camarón por año, y aproximadamente del 43 al 45 % del peso corresponde a la fracción no comestible, y se le denomina cabeza, residuo o basura de camarón (Cira *et al.*, 2002). Este residuo contiene aproximadamente 25% de sólidos, de los cuales 22 a 43% son proteína y el 20 a 57% es quitina. La quitina contiene aproximadamente 6.9% de nitrógeno y constituye la materia nitrogenada proteica. Los componentes minerales, principalmente carbonato de calcio, representan del 15 al 35% (Stephens *et al.*, 1976). Además, contiene pequeñas cantidades de astaxantina, pigmento carotenoide que determina el color característico de los camarones (Armenta *et al.*, 2002).

La riqueza del cefalotórax de camarón en lo que respecta a sus componentes; quitina, proteína y pigmentos, lo convierten en una fuente susceptible de ser procesada para obtener subproductos útiles en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Cañipa y Duran, 1995; Gildberg, 2001). En

la tabla 2 se puede ver la composición química del cefalotórax o cabeza de camarón.

Tabla 2. Composición de cefalotórax o cabeza de camarón.

Componente	% en base seca
Proteína cruda	41.93
Lípidos	10.2
Carbohidratos	2.47
Fibra cruda	15.17

Fuente: Oyedapo, 1996

Por otra parte, los residuos generados de la industrialización del camarón representan un problema ecológico en las zonas de captura debido a que son depositados al aire libre, donde sufren descomposición. La fermentación láctica se ha propuesto para la estabilización de este recurso y posteriormente la recuperación de sus principales constituyentes: quitina, proteína y astaxantina.

2.1.2 Fermentación láctica de los residuos de camarón

La fermentación es la transformación de sustancias orgánicas en compuestos simples por la acción de enzimas o microorganismos. La fermentación es un proceso de oxidación anaerobio o parcialmente anaerobia de carbohidratos (Desrosier, 1997).

Los microorganismos son usados para fermentar azúcar por oxidación completa, oxidación parcial, fermentación ácido láctico, fermentación butírica y otras acciones fermentadoras menores. El azúcar en el producto puede ser convertido a ácido láctico y otros productos finales en tales cantidades que el medio circundante es controlado sobre otros microorganismos, ésta es rápida y eficiente (Desrosier, 1997).

El ensilaje de residuos del camarón es susceptible a este tipo de fermentación, se produce mediante fermentación anaeróbica o acidificación directa. Por ensilaje de acidificación directa se entiende el producto resultante de la mezcla de residuos pesqueros con ácidos orgánicos e inorgánicos que reducen el pH lo suficiente como para prevenir el deterioro del residuo. Por su parte el ensilaje de fermentación anaeróbica, es el resultado de la degradación de una fuente de carbohidratos (azúcar), por bacterias ácido lácticas, resultando en la producción de ácidos orgánicos, mayormente el láctico, que reducen el pH, preservando así la masa ensilada. La utilización de residuos de pescadería mediante la producción de ensilados aumenta el aprovechamiento de la proteína animal y a la vez que minimiza los efectos de la contaminación ambiental (León, 2003).

La eficiencia de fermentación que utiliza bacterias ácidas lácticas depende de los factores tales como la cantidad de inóculo, la glucosa, pH inicial y pH durante fermentación, la cantidad y el tipo del ácido utilizado, y del tiempo de fermentación. Para que la fermentación láctica se lleve a cabo de manera eficiente los principales parámetros que se deben de tener en cuenta son los siguientes:

- **Cantidad inicial de bacterias lácticas:** Las fermentaciones tradicionales dependen de la cantidad de microorganismos que se encuentran en forma natural en el sustrato o en su caso agregar inóculo, seguido del suministro de las condiciones necesarias para la proliferación del tipo de bacteria deseada.

- **Cantidad inicial de microorganismos competidores:** Antes de que los microorganismos contaminantes o peligrosos alcancen poblaciones peligrosas ocasionando cambios indeseables o produciendo poblaciones infecciosas o toxigénicas, su multiplicación debe ser suprimida por el crecimiento y actividad metabólica de las bacterias lácticas.

- **Fuente de carbohidratos:** En pescados y crustáceos frescos es muy baja la cantidad de carbohidratos libres, por lo tanto es necesario agregar alguna otra fuente de carbono para la buena producción de ácido en la fermentación.
- **Factores orgánicos de crecimiento:** Las vitaminas, aminoácidos y otros factores orgánicos de crecimiento son requeridos para el crecimiento de las bacterias lácticas, estos factores están disponibles en cantidades adecuadas a partir de los músculos del pescado y crustáceos.
- **Condiciones anaerobias:** Es necesario el mantenimiento de las condiciones anaerobias, especialmente en la superficie, para impedir el crecimiento de microorganismos aerobios, como hongos y levaduras, los que pueden tolerar las condiciones de acidez y desarrollarse, proporcionando otra dirección en la fermentación lo cual repercute en la calidad y seguridad del producto.
- **Temperatura:** La temperatura puede ser considerada un factor de influencia en la composición de la población microbiana y del sabor final de las fermentaciones naturales. Las temperaturas altas promueven el rápido crecimiento de microorganismos indeseables.
- **Concentración de ácidos orgánicos y valor de pH:** El crecimiento de las bacterias lácticas es necesariamente acompañado por la excreción de ácido láctico y, en algunas circunstancias, de ácido acético, y en consecuencia se disminuye el valor de pH en el medio. Las bacterias lácticas son excepcionalmente tolerantes a medios con bajo pH provocado por la presencia de ácidos orgánicos débiles.

Un buen ensilado cambia su aspecto de semisólido a líquido en un tiempo de 2 a 3 días y el pH se reduce también; por centrifugación se separan la parte

semisólida y líquida, esta parte representa del 60-70% en peso del ensilado (Hall y De Silva, 1994).

El ensilado de los desechos del camarón con ácido propiónico y una mezcla de ácido propionico/fórmico (1:1 v/v) ha demostrado que aumenta la concentración de astaxantina, en un rango de pH de 4.5-5.0, durante dos días a temperatura de 4-5 °C. También se ha señalado que la astaxantina es estable en un proceso de ensilado ácido de residuo de camarón, al ser más lenta su degradación a diéster o su correspondiente monoéster (Armenta, 1998).

2.2 Astaxantina

El color es una cualidad organoléptica de los alimentos que se aprecia por medio del sentido físico de la vista. Suele ser considerado como un factor psicológico de aceptación y un criterio para elegir un alimento; incluso en los productos de origen vegetal se relaciona con la posibilidad de distinguir su grado de maduración y su idoneidad. Sin embargo, no siempre resulta válida la correlación entre color y calidad, porque el uso, y tal vez abuso, de aditivos colorantes puede enmascarar esta apreciación (Bello, 2000).

Según Badui (1999), los pigmentos relacionados con los alimentos se pueden dividir en ocho grupos: carotenoides, clorofilas, antocianinas, flavonoides, betalaínas, taninos, mioglobina, hemoglobina y otros.

2.2.1 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos que además de sus características pigmentarias funcionan como precursores de moléculas bioactivas que intervienen en algunos procesos fisiológicos de diversos organismos. Los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: los carotenos y las xantofilas, las cuales son productos oxidados de los carotenos. En la naturaleza existen tanto en forma libre

en el tejido disueltos en lípidos, como formando complejos con proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, que generan diferentes colores según la manera que interactúen. La interacción de carotenoides y proteínas aumenta la estabilidad de estos pigmentos (Badui, 1999).

2.2.2 Estructura Química

La astaxantina es un pigmento natural de naturaleza con propiedades antioxidantes, las cuales son superiores a las de otros antioxidantes como vitamina E. Estas propiedades antioxidantes explican sus efectos benéficos para aumentar la salud humana.

La estructura de la astaxantina cuenta con 2 grupos hidroxilo y 2 grupos carbonilo en los anillos de β -ionono, como se muestra en la figura 2.

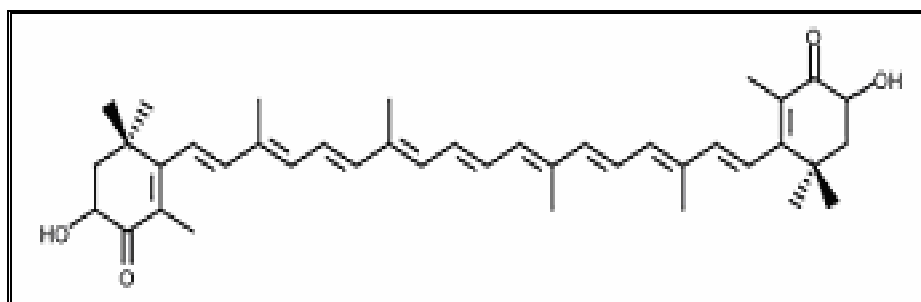


Figura 2. Estructura química de la astaxantina.

Fuente: Birkeland, 2003.

Su estructura indica los tipos de enlaces mediante los cuales puede unirse la astaxantina a otras biomoléculas. El enlace que une al pigmento con la proteína se conoce como *imino* (aminación reductiva). Éste tipo de unión también podría darse con las proteínas y la quitina. En los crustáceos, la mayor parte del pigmento está unida a una lipoproteína y monoesterificada con un ácido graso (Armenta, 1998).

La astaxantina es el pigmento más abundante en los residuos de crustáceos, este se encuentra unida a una proteína que determina la coloración, la astaxantina se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, lo que hace fácil su localización, sin embargo solo unos cuantos organismos son capaces de sintetizarla (Armenta, 2002). Se ha relacionado a la astaxantina con posibles efectos inmunes en peces y crustáceos, y se ha demostrado que incrementa la resistencia de los sujetos experimentales en algunas pruebas de estrés (Lehninger, 1975).

2.2.3 Fuentes

La astaxantina es un pigmento ampliamente distribuido en la naturaleza y debido a la importancia que tiene en la industria alimentaría puede ser obtenida de diferentes fuentes son por síntesis química, los crustáceos y los microorganismos.

➤ Sintética

La astaxantina sintética es la fuente principal usada para pigmentar al salmón, esta es preferida por los productores de salmón sobre la cantaxatina porque se absorbe más eficientemente y da una coloración más natural y homogénea a los alimentos procesados; este pigmento sintético tiene un costo de 250 dólares por kg en base a peso seco. El contenido del principio activo es de 8% de astaxantina, regularmente estas formulaciones también contienen otros ingredientes como: gelatina, sacarosa, almidón ascorbilpalmitato y etoxiquín como antioxidante.

➤ Crustáceos

Los crustáceos y su caparazón son una fuente principal de astaxantina que han sido utilizados para la pigmentación de salmónes en granjas acuícolas. Los niveles de carotenoides extraídos son bajos, (0 a 200 mg/kg), y para obtener una

pigmentación satisfactoria se requiere una adición del 10 a 25 % de peso en proporción al total de la ración del alimento formulado. Además, esta fuente contiene altos niveles de cenizas, quitina y humedad, lo cual ocasiona un problema técnico en la formulación y en la elaboración del alimento. Adicionalmente, por su bajo contenido de nutrientes y proteínas no es útil como suplemento en la alimentación para peces (Jonson *et al.*, 1991).

➤ **Microbiana**

Hongos y levaduras

Se han reportado que algunos hongos y levaduras como *Phaffia rhodozyma* el contenido de astaxantina es alrededor del 85% del total de los carotenoides totales. La astaxantina obtenida por *P. rhodozyma* es aprobada en dieta de trucha arcoiris (Yuan, 1998).

Algas

Hay ciertas algas verdes que contienen astaxantina como carotenoides por su parte *Haematococcus pluvialis* produce de 0.5 a 2 % de astaxantina en peso seco donde el 87 % del pigmento se encuentra en forma de éster, un factor limitante que se presenta es la extracción del pigmento y los requerimientos de luz que necesita el alga para poder desarrollarse es por eso que aumentan los costos de producción. Por lo anterior esta fuente de astaxantina no puede competir con la sintética (Dietmar, 2004).

2.2.4 Extracción de astaxantina de residuos de camarón

La cantidad de la astaxantina extraída depende del sistema de extracción empleando, y la cantidad depende de la temperatura empleada,

exposición al oxígeno atmosférico y a la luz, es decir, de las condiciones de procedimiento y almacenamiento.

Para extraer el pigmento, el principal obstáculo lo constituye la unión con las proteínas. En estado natural, hay una interacción mutua entre proteínas y carotenos que aumenta la estabilidad de los últimos. Si esta unión se debilita o se rompe, por ejemplo durante el secado, la estabilidad de los carotenos tiende a decrecer. Por esta razón, el precalentamiento de las muestras favorecen la extracción de pigmentos, al promover la unión de las proteínas y los pigmentos, mejorando el rendimiento en un 58%; en otro estudio, se utilizaron proteasas bacterianas para separar el complejo caroteno-proteína de la quitina logrando con ello obtener pigmentos enriquecidos con proteínas (Armenta, 1998).

La astaxantina, también puede ser recuperada mediante el empleo de mezclas de solventes. El sistema de solventes más eficiente para la extracción de astaxantina es éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10) en una relación 10:1 con respecto al residuo, obteniéndose en promedio 23.5 µg/g, (Armenta *et al.*, 2002).

Un método para recuperar caroteno proteína con un rendimiento aproximado de 73% de astaxantina y un 90% de proteína consiste en un empleo de la tripsina para tratar a residuos de crustáceos. Esta carotenoproteína, después de la acción enzimática, es separada del residuo sólido y puede ser usada como suplemento alimenticio para consumo animal (Armenta, 1998).

2.2.4.1 Usos

Debido a la importancia del color en la industria avícola y piscícola se han realizado muchas investigaciones del uso de los carotenoides sintéticos y naturales como fuente de pigmentos. Las xantofilas que han adquirido mayor relevancia como aditivo en la industria de los alimentos balanceado para aves, son: la capsantina que se encuentra como principal pigmento del pimiento rojo,

zeaxantina y luteína que se encuentran en la flor de cempasúchil (*Tzompa xochitl*). Se ha observado que los pigmentos rojos tienen mayor capacidad de pigmentación y que pueden ser combinados con pigmentos amarillos, lo cual da un atractivo color a la yema de huevo, por ejemplo 1mg de astaxantina puede sustituir a 30 mg de luteína, este uso potencial de la astaxantina representa una ventaja económica para la industria avícola, por la disminución del pigmento que requiere ser utilizado (Cerde, 1985).

En la industria acuícola las principales xantofilas utilizadas son: la cantaxantina y la astaxantina. La astaxantina es un importante constituyente de los alimentos para peces, debido a que el salmón y otros animales marinos no pueden sintetizarlo, por lo que requiere incluirse en las dietas, pero su importancia como aditivo radica en proporcionar la pigmentación característica a la carne y a la piel de peces e intervenir en el proceso de la producción de estos, participando como agente protector de factores fisicoquímicos durante el desarrollo embrionario. Otra función importante es la de actuar como precursor de la vitaminas A en dietas carentes de esta vitamina. Además, existen estudios donde se relaciona a la astaxantina con el sabor característico del salmón cuando este es cocinado (An *et al.*, 1991).

La astaxantina al igual que otros carotenoides tiene un uso potencial como colorante en la cosmetología, pero su inestabilidad a factores como la luz y el oxígeno limita su aplicación en esta área (An *et al.*, 1991).

2.3 Cromatografía

2.3.1 Aspectos teóricos

La cromatografía agrupa un conjunto de importantes y diversos métodos que permiten a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros

medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que es un líquido. La cual se hace pasar por una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la mezcla se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Skoog *et al.*, 2000).

La cromatografía se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante (Rouessac y Rouessac, 2003). Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, 2001). Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso (Skoog *et al.*, 2001; Bermejo, 1991).

2.3.2 Tipos de cromatografía líquida (LC)

La fase móvil es un líquido. Es el tipo de cromatografía que engloba la forma más antigua conocida como método preparativo de separación. Esta categoría, muy extendida, puede subdividirse según el fenómeno aplicado:

- **Cromatografía líquido-sólido (o de adsorción).** La fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que las moléculas se adhieren por un doble efecto de adsorción física y química. El parámetro físico-químico implicado es el coeficiente de adsorción (Strobel, 1982).

- **Cromatografía iónica.** La fase estacionaria incorpora en la superficie posiciones iónicas y la fase móvil es una disolución tampón acuosa. La fase estacionaria permite el intercambio de estos contra iones móviles con iones del mismo signo de la muestra. La separación es debida al valor de los *coeficientes de distribución iónica* (Skoog *et al.*, 2001).
- **Cromatografía de exclusión.** La fase estacionaria es un material que comporta poros cuyas dimensiones se eligen en relación con el tamaño de las especies que hay que separar. De este modo se realiza un tipo de tamiz a escala molecular de permeabilidad selectiva. Esta técnica está designada por los términos de filtración sobre gel o permeabilidad en gel, según la naturaleza respectivamente acuosa u orgánica de la fase móvil. El coeficiente de distribución toma el nombre de coeficiente de difusión (Strobel, 1982).
- **Cromatografía líquido-líquido (o de reparto).** La fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte y poroso que sólo desempeña un papel de apoyo.
- **Cromatografía de afinidad (de fase enlazada).** Para inmovilizar la fase estacionaria (generalmente se trata de un polímero de tipo líquido) hay que fijar de forma definitiva las especies que la componen por enlaces covalentes: es la técnica de inmovilización *por* enlace. La separación se basa en el coeficiente de reparto K de la disolución entre las dos fases, un fenómeno comparable a la extracción de la fase acuosa en un disolvente por medio de un embudo de decantación (Skoog *et al.*, 2001).

2.3.3 Columnas

En este método un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión (Rouessac y Rouessac, 2003). En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación (Loro, 2001). El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y

un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm (Harris, 2001).

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible (Harris, 2001).

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

2.3.4 Detector

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura (Hernández y Gonzalez, 2002).

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un grafico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles. Entre ellos se tienen:

- **Detectores de absorbancia ultravioleta:** Son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo (Hernández y Gonzalez, 2002).
- **Detectores de fluorescencia:** Son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste (Loro, 2001).
- **Detectores electroquímicos:** Ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría y voltamperometría (Hernández y Gonzalez, 2002).

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- **Detectores de índice de refracción:** Está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula (Harris, 2001). El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.

- **Detectores de conductividad:** Son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración (Harris, 2001).

2.3.5 Validación de técnicas analíticas

Según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001), para lograr un buen análisis es necesario validar el método mediante un procedimiento analítico con un alto grado de seguridad, para la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Hoy en día no se concibe la idea de que un laboratorio pueda utilizar un método analítico que no haya sido objeto previamente de algún tipo de validación, transferencia o, simplemente comprobación.

Validación de un método es la obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación, de que cualquier procedimiento, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto.

No existe una guía oficial que indique la óptima secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

- **Selectividad**

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta

del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.

➤ **Linealidad y rango**

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

➤ **Precisión, repetibilidad y reproducibilidad**

Precisión: Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo.

Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en el mismo laboratorio y en un período de tiempo corto. Se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Reproducibilidad: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. El objetivo de éste estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios.

➤ **Exactitud**

La exactitud es un procedimiento analítico que expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimental encontrado. No se debe confundir exactitud con precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de medidas, pero no da ninguna indicación de lo cerca que ésta del valor verdadero.

➤ **Límite de detección y cuantificación**

Dado un método determinado, se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la cantidad mínima de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantifica bajo dichas condiciones experimentales.

2.4 Metodologías de cromatografía líquida propuestas para la cuantificación de astaxantina

La adecuación de los métodos analíticos es un serio problema, debido a que ciertos métodos habituales son generalmente aceptables para algunos pigmentos, para otros son menos adecuados. Los factores que limitan los métodos analíticos pueden ser de diversa naturaleza, como la falta de especificidad de los métodos tradicionales, extracción incompleta del pigmento y la medida incompleta de las formas complejas de un determinado analito.

A diferencia de los métodos químicos utilizados para el análisis de pigmentos, el sistema de cromatografía de líquidos tiene la ventaja de incrementar la velocidad de análisis, incrementa la precisión y es específico.

2.4.1 Preparación de muestras

En la tabla 3 se presentan algunas de las metodologías propuestas para la preparación de las muestras con el propósito de optimizar la separación de la astaxantina de los materiales a los cuales se encuentra asociada.

Tabla 3. Tratamientos para la preparación de la muestra.

Autor	Procedimiento
Yuan, (1998)	La muestra de células de algas <i>H. pluviales</i> es centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Al licor se le adiciona una mezcla de diclorometano:metanol (25:75 v/v), y se centrifuga a 10,000 g por 5 min. Se separa el pigmento y se almacena en refrigeración hasta su análisis.
Duran y Moreno (2000)	A 1g muestra de pericarpio de tamarillo, se adiciona hexano:éter de petróleo (50:50 v/v) sin agitación, se separa el extracto en oscuridad, y el extracto se almacena en atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.
Armenta <i>et al.</i> , (2002)	A 100 g de muestra de cabeza de camarón se le adiciona una mezcla de 10% (p/p) de azúcar y 5% de inóculo (v/v), se fermenta a 30°C por 48 h, posteriormente se centrifuga a 3000 rpm por 15 min. Los pigmentos se separan mediante una solución de éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10 v/v/v) y se mantienen en refrigeración hasta su análisis.
Rouseff y Raley (1996)	A una muestra de 25 ml de jugo de naranja se agita por 10 min, se centrifuga, y se separa el residuo al cual se adiciona una solución de éter de petróleo y agua para separar los carotenoides y luego saponificar con 10% NaCl, se disuelve en 0.5 ml de acetona en metiliterbutileter, Para separar los carotenoides.

2.4.2 Métodos de extracción por solventes

La extracción de pigmentos de diversos materiales biológicos es un proceso que requiere una adecuada elección del método a seguir. En la bibliografía se encuentran descritos gran cantidad de métodos, unos encaminados a la cuantificación, otros a estudios cuantitativos y otros a controles semicuantitativos en los que se puede seguir un adecuado grado de agotamiento en la extracción con un método sencillo y rápido. En principio cualquier disolvente orgánico es útil,

sin embargo, en la mayoría de los casos se recurre al empleo de metanol y acetona por ser disolventes de polaridad media alta y amplio margen de solubilidad. Para la correcta extracción de pigmentos es imprescindible poner en contacto íntimo la muestra con el disolvente, y se suele poner como punto final del proceso la obtención de extractos incoloros (Mínguez, 1997). En la tabla 4 se muestran algunas metodologías propuestas para la extracción de astaxantina por solventes.

Tabla 4. Metodología para la extracción de pigmentos con solventes.

Autor	Analito	Reactivo
Armenta, <i>et al.</i> , (2002).	Carotenoproteínas	Éter de petróleo:acetona:agua (15:75:10).
Bjerkeng y Berge, (1999).	Astaxantina	Acetona:Metanol (7:3).
Coral y Bjorn (2002).	Astaxantina	Acetona:Metanol (3:7).
Duran y Moreno (2000).	Carotenoides	Hexano:éter de petróleo (50:50).
Heinonen, <i>et al.</i> , (1989).	Carotenoides	Hexano:dietil eter (70:30) BTH (0.1%) en hexano.
Perez y Mínguez (2001).	Carotenoides	Acetona:agua (75:25).
Birkeland y Bjerkeng (2004).	Astaxantina	1-6 M NaCl en agua.
Storebakken, <i>et al.</i> , (2004).	Astaxantina	Acetona

2.4.3 Identificación

La identificación de la carotenoides se suele efectuar a partir del extracto de pigmentos saponificado. Hay que señalar la excepción de aquellos pigmentos que son sensibles al método alcalino, como es el caso de la astaxantina, en cuyo caso la identificación se realiza con el extracto de pigmentos completo. El espectro de absorción electrónica de la astaxantina muestra un punto máximo de absorción a una longitud de onda aproximada a 470 nm (Mínguez, 1997).

2.4.4 Condiciones cromatográficas.

Tras la identificación de los pigmentos presentes en una muestra, el siguiente paso es la cuantificación. En la tabla 5 se muestran las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación del contenido de astaxantina en diversas muestras.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de astaxantina.

Referencia	Columna	Fase móvil	Detección
Yuan, (1998)	C ₁₈ (250 X 4.6 mm), partícula 5 µm, Beckman Ultrasphere, a 25 °C	Consiste en: Solvente A: (diclorometano/metanol/ acetonitrilo/agua, 5.0:85:5.5:4.5, v/v) Solvente B: (diclorometano/metanol/ acetonitrilo/agua, 22.0:28.0:45.5:4.5, v/v)	Barrido de 250 a 700 nm Detección: 480 nm
Yuan <i>et al.</i> , (1997)	C ₁₈ (250 X 4.6 mm), partícula 5 µm, Beckman Ultrasphere, a 25 °C	Consiste en: 69.0 % metanol 17.0 % diclorometano 11.5 % acetonitrilo 2.5 % agua Velocidad de flujo: 1 ml/ min.	Barrido de 300 a 700 nm Detección: 450 nm
Emenhiser <i>et al.</i> , (1996)	C ₃₀ (250 x 4.6 mm), partícula 5 µm, temperatura ambiente, YMC	Consiste en: En una fase móvil binaria con flujos de MTBE-Metanol, (3:97 a 38:62, v/v)	Barrido de 250 a 550 nm Detección: 453 nm carotenoides Detección: 460 nm licopeno
Armenta-López, Guerrero L. (2002)	HPLC, C ₁₈ Sephacryl-100-R column, SYMMETRY.	Consiste en: 20 % acetato de etilo 80 % metanol. Agua(9: 1)	Detección: 474 nm
Rouseff y Raley (1996)	C ₃₀ (250 x 4.6 mm) fase-reversa, flujo 1 ml/ min.	Consiste en: 90 % MeOH 5 % agua 5 % MTBE	Barrido de 290 a 486 nm Identificación de carotenoides a 430 nm

III. MÉTODO Y MATERIALES

3.1 Patrones y reactivos químicos.

Se utilizó agua ultra pura purificada con un sistema Milli-Q (Nano pure Diamond, Barnstead). Astaxantina (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione.) (Sigma, St. Louis, MO, USA) se disolvió en metanol (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Germany, Grado HPLC). Además, los reactivos acetonitrilo, metanol (EMD Chemicals Inc. Darmstadt, Germany) y diclorometano (Merck-México S.A.) fueron grado HPLC.

3.2 Localización del experimento y material biológico

Esta investigación se realizó en el laboratorio LV-712 del Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Nainari, ubicado en Antonio caso S/N, en Cd. Obregón, Sonora.

Como materia prima se utilizó cabeza de camarón *Penaeus vannamei* de bahía y de acuacultura, la cual se recolectó de la congeladora “Mar Abierto” ubicada en el parque industrial, en Cd. Obregón, Sonora.

3.2.1 Preparación de la muestra

Las cabezas de camarón se transportaron con hielo al laboratorio de trabajo donde se eliminaron las impurezas antes de congelarlos (AMERICAN, modelo CL 110), ya congeladas las cabezas se molieron en un molino para carne (TORREY, modelo 12) hasta un tamaño de partícula de aproximadamente de 4 mm, y posteriormente se almacenaron en congelación en envases de plástico hasta su utilización.

3.2.2 Fermentación láctica

Se utilizaron 500 g de cabeza de camarón (*Penaeus vannamei*) previamente descongelada.

- **Microorganismo.** Se utilizó un producto probiótico que contiene *Lactobacillus sp* (5%, v/v) en agua destilada enriquecida con 3.75% de sacarosa comercial, para su activación durante 5 días a 37 °C.

- **Condiciones de la fermentación.** A 500 g de cabeza de camarón molida y descongelada se adicionó 50 % (v/p) del *Lactobacillus sp* activados, 6.6 % de sacarosa comercial (p/p) y al inicio de la fermentación se adicionó 10 ml ácido cítrico 2M hasta alcanzar un pH de 6.5. La fermentación de este sustrato semisólido se realizó en envases de plástico de 1l con tapa para mantener las condiciones anaeróbicas durante 24 hrs a 30°C. El pH y la acidez titulable fueron monitoreados cada 3 horas con el fin de confirmar estabilidad del fermentado durante todo el proceso.

3.3 Desarrollo del proceso

En la figura 3 se presenta en forma general el tratamiento que recibió la cabeza de camarón para finalmente cuantificar la astaxantina.

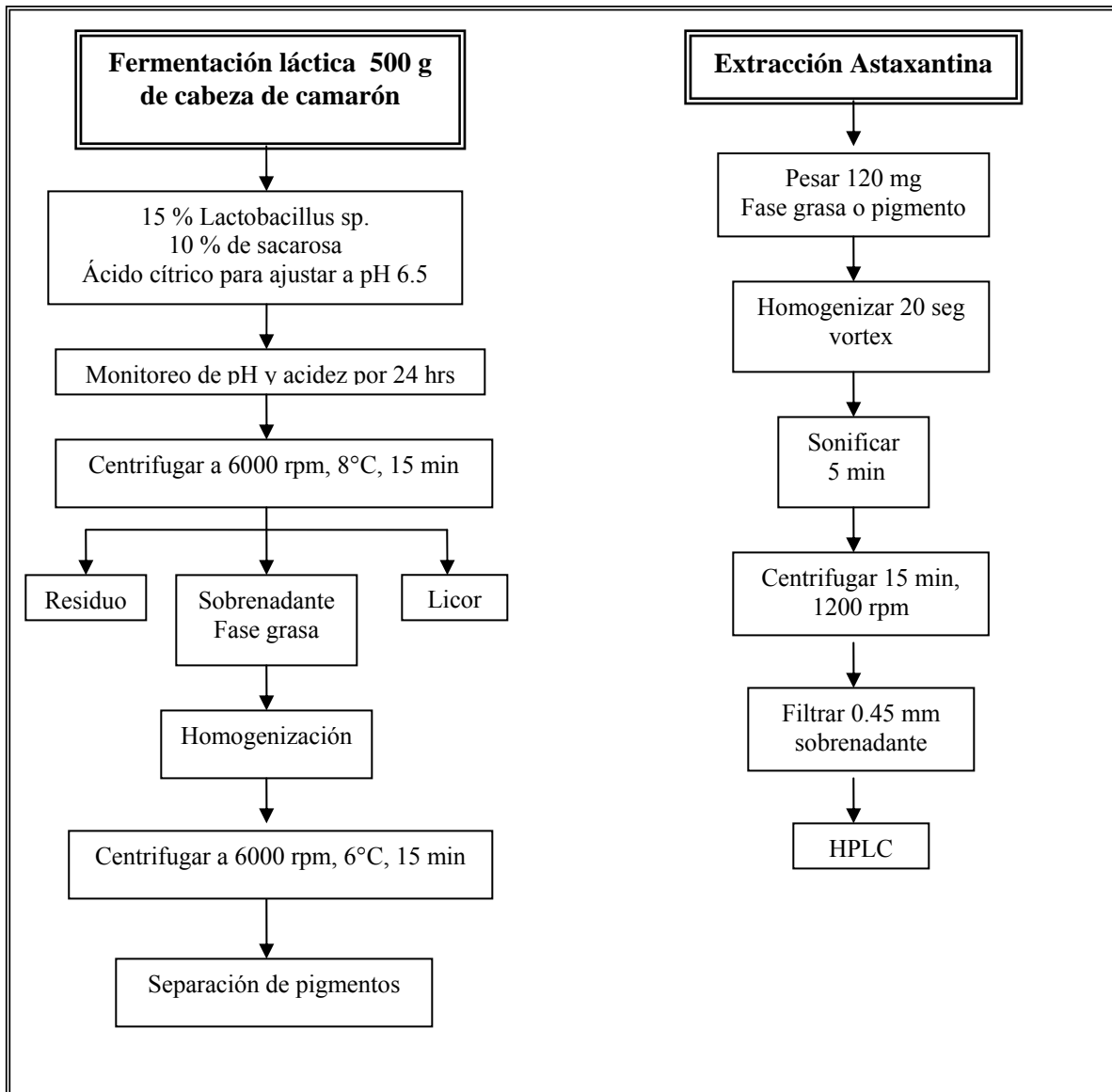


Figura 3. Tratamiento de residuos de camarón y extracción astaxantina.

➤ **Recuperación del pigmento**

El fermentado se centrifugó a 8°C, 6000 rpm durante 15 min (Harrier 18/80), y posteriormente se separaron las tres fases: sobrenadante (fase grasa), residuo (quitina fresca) y licor (Fase proteica). El rendimiento de fase grasa fue determinado por gravimetría (balanza digital marca Scout-Ohaus).

3.4 Análisis y equipo HPLC.

Para el análisis se utilizó un sistema para cromatografía de líquidos de GBC Instrumental (Dandenong, Australia), equipado con muestreador automático LC 1650, desgasificador LC1460, bomba cuaternaria LC1150, bucle de inyección (Rheodyne, Cotati, CA, USA), y un detector UV-vis con photodiode array LC5100, todo controlado con un software WinChrom. La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa SGE Hypersil ODS C₁₈ (25 x 0.46 cm diámetro interno) con un tamaño de partícula de 5 μm (SGE, Dandenong, Australia). Para el análisis cromatográfico se inyectan 20 μL de la muestra. La fase móvil consistió en una mezcla de agua:metanol:diclorometano:acetonitrilo (4.5:28:22:45.5 v/v/v/v), a una velocidad 1 ml/min. La detección se realizó a $\lambda_{\text{detection}} = 476 \text{ nm}$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de la muestra.

Para la determinación de la cantidad de muestra a utilizar en el análisis cromatográfico se realizaron ensayos preparando soluciones a distintas concentraciones (0.200 y 0.120 mg/ml) en diferentes solventes (metanol, hexano, etanol, metiletilcetona, y acetonitrilo), estas soluciones fueron sometidas al mismo tratamiento (mezclado en vortex y sonicación) a fin de asegurar la extracción total del pigmento. Se encontró que el mejor solvente fue el metanol y con 5 ml se logró la extracción total al homogenizar en vortex durante 20 seg, en combinación con 5 min de sonicación, y centrifugación a 1200 rpm por 15 min. Al analizar las muestras por HPLC se encontró que la muestra de 0.120 mg/ml fue la que presentó una mejor resolución en el cromatograma. El extracto se pasó a través de una membrana de 0.45 μm antes del análisis por HPLC, todo bajo las mismas condiciones de extracción y tratamiento.

4.2 Condiciones cromatográficas

Diferentes columnas cromatográficas han sido utilizadas para el análisis de carotenoides como la astaxantina y de sus ésteres, en este estudio se seleccionó una columna 25 cm x 4.6 mm SS Exil ODS C₁₈ 5µm. De acuerdo a las recomendaciones de Yuan y Chen (1998), para la separación de las señales cromatográficas de astaxantina fueron seleccionados como componentes de la fase móvil agua, metanol, diclorometano, y acetonitrilo; y se llevaron ensayos variando la relación de los componentes en el gradiente de la bomba, velocidades de flujo de la fase móvil y temperaturas de la columna (resultados no mostrados). Estos ensayos permitieron seleccionar las condiciones cromatográficas del método. En la tabla 6 se muestran las condiciones seleccionadas.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de astaxantina.

Parámetro	Condiciones
Columna	4.6mm SS Exil ODS C ₁₈ 250 mm, 5µm
Fase móvil	agua:metanol:diclorometano:acetonitrilo (4.5:28:22:45.5 v/v/v/v)
Velocidad de flujo	1.0 ml/min
Detección	476 nm
Temperatura	25°C

4.3 Identificación

Un cromatograma típico de una solución estándar de astaxantina es mostrado en la figura 4A, éste presentó un pico sencillo a 3.13 ± 0.003 min, de un promedio de 10 inyecciones. La astaxantina en la fracción lipídica fue identificada por comparación de su tiempo de retención y espectro de absorción con el correspondiente del estándar. Un cromatograma característico del extracto

lipídico obtenido del fermentado del residuo de camarón es presentado en la figura 4B. En base a las características de retención y espectro de absorción el pico principal fue identificado como *trans*-astaxantina. En la figura 5 se muestra el espectro de absorción de la astaxantina encontrándose que la longitud de onda óptima para la cuantificación es de 476 nm.

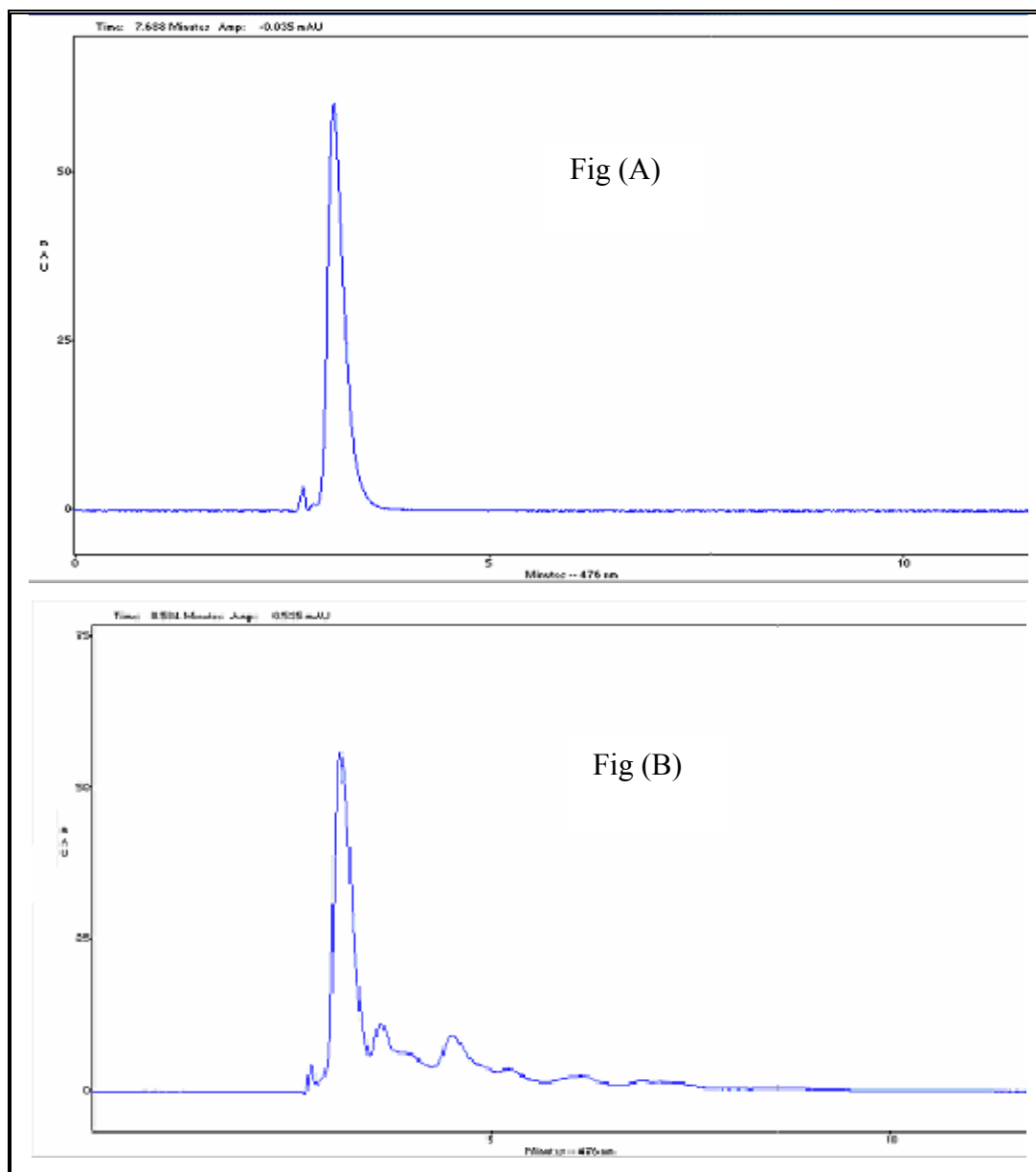


Figura 4. HPLC cromatograma de una solución del estándar de astaxantina (A) y una muestra de la fracción lipídica del hidrolizado de residuos de camarón (B). Pico principal: astaxantina.

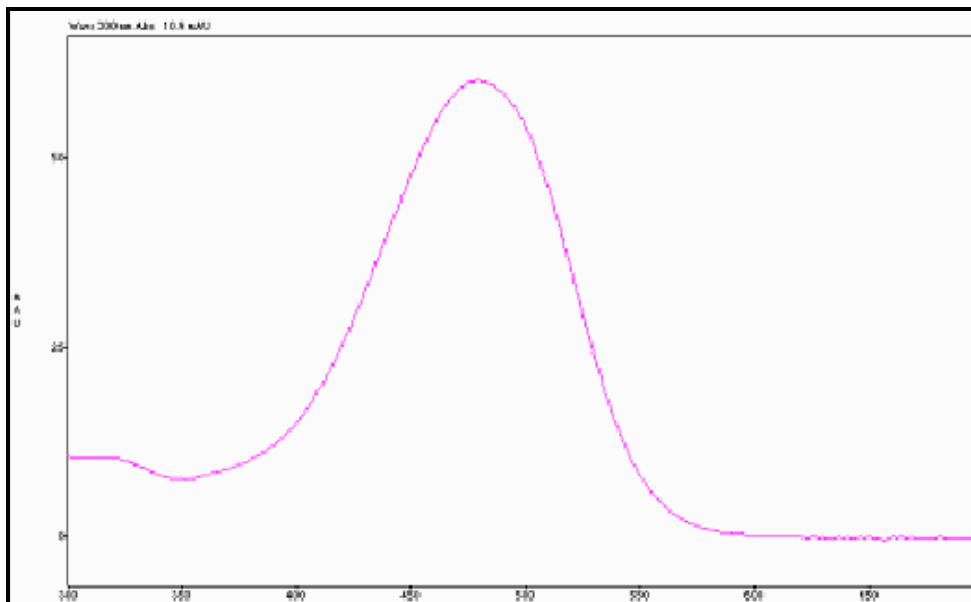


Figura 5. Espectro de absorción de astaxantina.

4.4 Validación del método

4.4.1 Linealidad

La curva de calibración fue determinada con 4 diferentes concentraciones del estándar de astaxantina en el rango de 5.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las cuales fueron inyectadas por duplicado. La recta patrón para astaxantina se obtuvo graficando concentración contra el área del pico lo cual fue satisfactoria ya que presentó un valor de $r^2 = 0.9991$, y según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, (2001), el valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 aunque en caso de impurezas se admite ≥ 0.990

Tabla 7. Recta patrón de astaxantina.

Patrón	Concentración (µg/ml)	Área promedio
1	5.2	221805
2	10.4	428428
3	15.6	610329
4	26.0	971544

$y = 35804x + 46031$

$R^2 = 0.9991$

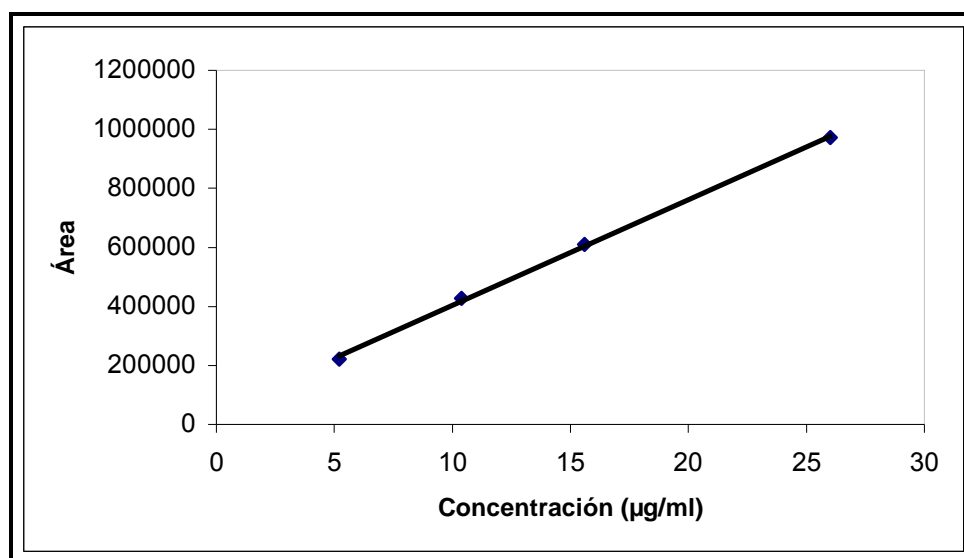


Figura 6. Gráfica de la recta patrón para astaxantina.

4.4.2 Precisión

La precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad se puede deber a errores aleatorios. Este se llevó a cabo analizando una misma muestra cuatro veces, los valores se muestran en la tabla 8, en donde se observa la desviación estándar relativa la cual es de 1.7 (RSD, %). Estos resultados indican que el presente método puede ser usado para el análisis de rutina de astaxantina en laboratorios de control de calidad. Además, no es posible comparar los resultados obtenidos con las referencias consultadas, debido a que en ellas no se muestran datos de validación metodológica para este tipo de muestras.

Tabla 8. Valores de precisión del método.

Ensayos	Astaxantina (mg/g materia seca)
1	1972.1
2	1923.0
3	1934.7
4	1994.9
Promedio	1956.2
Desviación estándar	33.2
RSD, %	1.7

4.4.3 Recuperación

Para llevar a cabo la recuperación del método, se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón. Lo anterior se realizó adicionando astaxantina (1.5 mg/g materia seca) antes de la extracción con solventes, y después se cuantificó el contenido total por HPLC. Los datos se muestran en la tabla 9 (4 ensayos de la misma muestra), donde se observó que la recuperación es de 100.8% la cual se considera excelente debido al efecto que podrían tener las condiciones de manipulación de la muestra, extracción con solventes y el tiempo de reposo del extracto para la cuantificación por HPLC.

Tabla 9. Valores de recuperación del método para astaxantina.

Ensayos	% de Recuperación
1	98.4
2	103.5
3	101.0
4	100.2
Promedio	100.8
Desviación estándar	2.1
RSD, %	2.1

➤ **Contenido de astaxantina en la fase lipídica del fermentado de residuos de camarón**

La aplicabilidad del método se demostró mediante el análisis de 8 muestras de la fracción lipídica obtenida de diferentes ensayos de fermentación. En la tabla 10 se presenta el concentración de astaxantina para cada muestra, encontrándose que el rango es de 1.91 a 3.16 mg/g materia seca, mientras que el valor promedio global es de 2.65 ± 0.40 mg/g de materia seca. En relación a esto, se han reportado 4.2 mg/g de material seca en residuos de camarón mediante extracción con fluidos supercríticos (Lin y Chien, 2005), 0.36 mg/g de materia seca en escamas de pescado (Stepnowski, 2004), y 3.7 mg/g de biomasa seca de *H. pluvialis* (Yuan y Cheng, 1998). La variabilidad entre los resultados puede atribuirse a la especie de camarón y a las condiciones de la fermentación láctica de los residuos de camarón.

Tabla 10. Contenido de astaxantina en las muestras.

Ensayos	Astaxantina (mg/g materia seca)
1	2.46
2	3.16
3	2.71
4	2.65
5	1.91
6	2.97
7	2.97
8	2.35
Promedio	2.65
Desviación estándar	0.40

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un método HPLC para la determinación de astaxantina en la fracción lipídica del fermentado del residuo de camarón.

Las características analíticas del método medidas a través de linealidad, precisión y recuperación, justifican su utilización en la cuantificación rutinaria de astaxantina en laboratorios de control de calidad y su posible utilización en muestras tanto de origen microbiano como de origen alimentario.

Los resultados sugieren que la fase lipídica del fermentado del residuo de camarón es una fuente importante de este pigmento para su utilización en la producción acuícola de camarón o peces.

LITERATURA CITADA

An, G.H., Bielich, j. Auerbach, R., Johnson, E.A. (1991). **Isolation and characterization of carotenid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting.** *Biotechnology* 9, 70-73.

Armenta, E. Roberto. (1998). **Estudios sobre carotenoproteínas extraídas de residuos de camarón fermentados y no fermentados.** Tesis de maestría. UNAM-1. México, D.F.

Armenta. R., Guerrero. I., Huerta.S. (2002). **Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex.** *Food Chemistry and Toxicology.* 67,1000-1006.

Armenta. R., Guerrero. I., Huerta.S. (2002). **Extracción de carotenoproteínas a partir de residuos de camarón fermentados**. Revista mexicana de Ingeniería Química 1, 49-55.

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I) (2001). **Validación de métodos analíticos**. Barcelona, España.

Badui S. (1999). **QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS**. 3ra edición, Editorial Alhambra Mexicana. México pp. 125 –126.

Barnes, R. (1977). **Zoología de los invertebrados**. 3ra edición. Editorial Interamericana. Mexico pp. 560-561, 564-565.

Bello, J. (2000). **Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos**. Editorial Díaz Santos, S.A. Madrid, España pp.179.

Bermejo, M. F. (1991). **Química analítica general, cuantitativa e instrumental**. Vol. 2. Ed. Paraninfo, S. A. Madrid.

Birkeland, S., Bjerkg, B. (2004). **Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of atlantic salmon (*Salmon salar*) as affected by brine concentration and pH**. Food chemistry 85, 559-568.

Bjerkg, B. y Berge, G. (2000). **Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin E/Z isomers in atlantic salmon (*Salmon salar L.*) and atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*)**. Comparative biochemistry and physiology. part B 127, 423-432.

Cañipa A. y Duran B. (1995). **Reaprovechamiento del cefalotórax de camarón**. Industria alimentaría, 10-17.

- Cerda, E. (1985). **Carotene mutans of Phycomyces**. Meth. Enzymol. 110, 220-243.
- Charley, H. (2000). **Tecnología de alimentos**. Limusa, p. 603. México, D.F. México
- Cira L.A., S. Huerta., K. Shirai (2002). **Fermentación láctica de cabezas de camarón (*penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida**. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 1, 45-48.
- Coral, G. y Bjerkgeng, B. (2002). **Astaxanthin from the red crac langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty moieties of astaxanthin esters**. Comparative biochemistry and physiology. Part B 133, 437-444.
- Desrosier N. W. (1997). **Conservación de alimentos**. CECSA: México D.F.
- Dietmar, E. (2004). **Identification and quantification of astaxanthin esters in shrimp (*Pandalus borealis*) and in a microalga (*haematococcus pluvialis*) by liquid chromatography- mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization**. Food chemistry 52, 3870-3875.
- Dore, I. y Frimodt, C. (1987). **An illustrated guide to shrimp of the world**. Van Nostrand Reinhold Pub. pp.19-42 N.Y. EUA.
- Duran, M. y Moreno. A. (2000). **Evaluación de algunas mezclas de solventes en la extracción de carotenoides del pericarpio de tamarrillo (*Cyphomandra betacea Sendt*)**. Ciencia y tecnología alimentaria. 3, 34-38.
- Emenhiser, C., Simunovic. N., Sander. L. (1996). **Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C₃₀ column in reversed-phase liquid chromatography**. Food chemistry. 44, 3887-3893.

- Gildberg A. y Stenberg E. (2001). **A new process for advanced utilisation of shrimp waste**. *Process Biochemistry* 36, 809-812.
- Hall, G. M. y De Silva, S. (1994). **Shrimp waste ensilation**. *Infotech International* 2, 27-30.
- Harris, D. C. (2001). **Análisis químico cuantitativo**. Ed. Reverte, S. A. Barcelona.
- Heinonen, M., Ollilainen. V., Linkola E. (1989). **Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits, and berries**. *Food chemistry*. 37, 655-659.
- Hernández, L. y González, C. (2002). **Introducción al análisis instrumental**. Ed. Ariel Ciencia.
- Jonson, A. E., Schreiber. D., Hall. W. (1991). **Processes for *in vivo* production of astaxanthin and Phaffia Rhodomyces yeast of enhanced astaxanthin content**. US Patent Application, WO 91/02060.
- Lehninger, Albert L. (1990). **Bioquímica**. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. pp.1117.
- León A.F. (2003). **Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de Heno de Gramíneas Tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería**. Tesis de maestría en ciencias en industria pecuaria. Universidad de Puerto Rico.
- Lin,W., Chien, J., Chen, B., (2005). **Determination of carotenoids in spear shrimp shells (*Parapenaeopsis hardwickii*) by liquid chromatography**. *J. Agric. Food. Chem.* 53, pp. 5144-5149.
- Loro, J. F. (2001). **Manual de cromatografía**. Colección Textos Universitarios.

- Minguéz, M. (1997). **Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos.** Universidad de Sevilla. España pp.103-105.
- Muncy, R. (1984). **Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (South Atlantic) white shrimp.** Coastal Ecology Group. Washington, USA.
- Oyedapo A. F. (1996). **Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads.** Food Research International, 29,(7), 595–599.
- Perez. A. y Minguéz M. (2001). **Structure reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annum* L.).** Food chemistry. 49, 4864-4869.
- Rouessac, F. y Rouessac, A. (2003). **Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas.** Ed. Mc Graw Hill.
- Rouseff, R., Raley, L. (1996). **Application of diode array detection with a C-30 Reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids.** Food chemistry 44, 2176-2181.
- Skoog, A., Holler, F., Nieman, A. (2001). **Principios de análisis instrumental.** Quinta edición. Editorial McGrall Hill. España. pp.1028.
- Stepnowski, P., Ólafsson, G., Helgason, H., Jastorff, B., (2004). **Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste.** *Chemosphere.* 54, 413-417.
- Storebakken, T., Sorensen, M., Bjerkgeng, B., (2004). **Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature.** Aquaculture 231, 489-500.

- Strobel, A. H., (1982). **Instrumentación química**. Editorial Limunsa, México. pp. 716.
- Yuan, J. (1998). **Chromatographic separation and purification of trans-Astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis***. Food chemistry 46, 3371-3375.
- Yuan, J., Gong, X., Chen, F. (1997). **Separation and analysis of carotenoids and Chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by High-Performance Liquid Chromatography photodiode array detection**. Food Chemistry 45, 1952-1956.