
Extracción de la astaxantina y su estabilidad

M. H. Herrera-Andrade^{1*}, D. I. Sánchez-Machado², J. López-Cervantes², J. A. Núñez-Gastélum², y O.H. Moreno-Ramos¹

¹ Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, Block 611, Valle del Yaqui, Bácum, Sonora, México.

² Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Cd. Obregón, Sonora, México.

Astaxanthin extraction and its stability

Abstract

Mexico takes about 50% of shrimp production; the rest is discarded as exoskeleton and cephalothorax. These wastes contain compounds with potential applications such as astaxanthin, a potent antioxidant. The aim of this study was to evaluate the effect of extraction conditions on the stability of astaxanthin from fermented shrimp waste. The extraction procedure involved purification, hydrolysis, pH adjustment, cleaning, extraction with hexane, dried and quantification of astaxanthin by spectrophotometry. The results indicated that the method reduced the concentration of astaxanthin in the sample.

Key words: astaxanthin, shrimp waste, saponification, spectrophotometry.

Resumen

México aprovecha aproximadamente el 50 % de su producción de camarón; el resto lo desecha como exoesqueleto y cefalotórax. Estos desechos contienen compuestos con potencial aplicación y entre ellos destaca la astaxantina, un potente antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de extracción en la estabilidad de astaxantina de los residuos fermentados de camarón. El procedimiento de extracción involucró purificación, saponificación, ajuste de pH, lavado, extracción con hexano, secado y cuantificación de astaxantina por espectrofotometría. Los resultados indicaron que el método utilizado disminuyó la concentración de astaxantina en la muestra.

Palabras clave: astaxantina, residuos de camarón, saponificación, espectrofotometría..

Introducción

En México, la explotación del camarón ocupa el cuarto lugar dentro de las industrias pesqueras. En el 2007 la producción de camarón de cultivo superó las 68,000 toneladas en el Estado de Sonora, por lo que la fracción no comestible (cefalotórax y exoesqueleto) representó 23,800 toneladas. Estos residuos contienen nutrientes como quitina, proteínas, lípidos y pigmentos carotenoides (Cañipa y Durán, 1995).

En el cefalotórax, además de las sustancias responsables del aroma y sabor del camarón, se

encuentran pigmentos carotenoides como la astaxantina (Mathur y Narang, 1990). La astaxantina libre es una xantofila que químicamente se le conoce como 3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β - β -caroteno (figura 1). La astaxantina puede existir bajo cuatro configuraciones, siendo la forma 3S-3'S la que se encuentra en mayor cantidad en el camarón. Los carotenoides se pueden descomponer, deshidratar, o isomerizar en presencia de ácidos. Algunos carotenoides como α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina resisten la saponificación mientras la luteína, violaxantina, y otros dihidroxi, trihidroxi, y epoxi carotenoides se

*Autores de correspondencia
Email: hermelinda111@hotmail.com

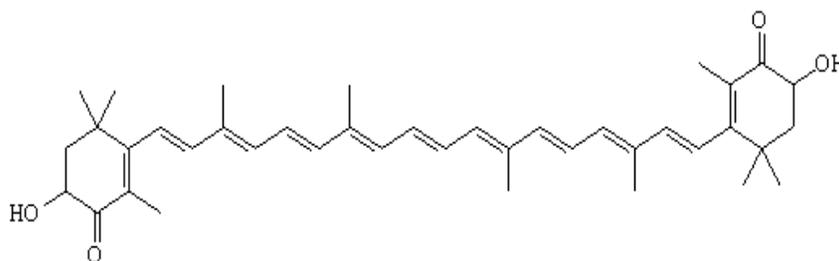


Figura 1. La molécula de astaxantina (Higuera-Ciapara et al., 2006).

modifican por lo que este proceso debe excluirse durante los procedimientos analíticos (Rodríguez-Amaya, 2001).

Las principales fuentes de astaxantina son la microalga *Haematococcus pluvialis*; y la levadura *Phaffia rhodozyma*. Para la recuperación de astaxantina de *H. pluvialis* Nagao et al. (2003) utilizaron acetona y lipasas, Ramírez et al. (2003) dimetilsulfóxido, Sarada et al. (2006) acetona y centrifugación, y Passos et al. (2006) mezclas de acetona, diclorometano, metanol y dimetilsulfóxido. Estas metodologías han sido las referencias iniciales para la extracción de astaxantina de residuos de camarón, y han sido complementadas con procesos enzimáticos, fermentativos, solventes orgánicos, aceites vegetales y fluidos supercríticos (Handayani et al., 2008). Para la extracción de astaxantina del camarón Czezuga y Czerpak (1968) utilizaron elución en columna con mezclas acetona:éter de petróleo, ácido acético:éter etílico y separaciones en capa fina con benceno, benceno:hexano y benceno:éter etílico:metanol. Adicionalmente, Stepnowski et al. (2004) usaron éter de petróleo y acetona mientras que Rødde et al. (2008) solamente aplicaron acetona. Por otro lado, Armenta et al. (2002) han aplicado tratamientos enzimáticos complementados con solventes, y Luna et al. (2003) han combinado métodos químicos con enzimáticos. Últimamente el CO₂ se ha utilizado como fluido supercrítico para extracción de lípidos de salmón (Tanaka y Ohkubo, 2003), astaxantina y ficocianina de *H. pluvialis* (Valderrama et al., 2003) y astaxantina de *P. rhodozyma* (Passos et al., 2006).

Los estudios que tienen el fin de extraer y purificar la astaxantina se justifican en el uso potencial de éste pigmento en la industria farmacéutica y alimenticia debido a sus propiedades antioxidantes.

También por la necesidad de producir insumos de fuentes naturales para la elaboración de alimentos y para aportar alternativas a los problemas de contaminación ocasionados por los residuos de camarón. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de extracción en la estabilidad de astaxantina presente en residuos de camarón fermentado.

Material y métodos

Preparación de las muestras. Los residuos de camarón (cabeza y cefalotórax) se recolectaron de fábricas que lo procesan en el Sur de Sonora, México. Las muestras congeladas se almacenaron en bolsas de plástico a -20 °C hasta su caracterización. La fermentación de los residuos se realizó mezclándolos con sacarosa e inóculo comercial, incubando a 30 °C por 36 h. El fermentado se centrifugó para separar la fracción rica en quitina (sedimento), el hidrolizado líquido de proteína y la fracción lipídica (Bueno-Solano et al., 2009). Esta última fracción se utilizó para realizar los ensayos de concentración de la astaxantina. El material se almacenó a 25 °C protegido de la luz y herméticamente sellado.

Purificación de la fracción lipídica. Se agregaron 4 ml de KOH 0.1 M por g de muestra, se agitó 10 min y se almacenó a 25 °C 18 h protegida de la luz. Se recuperó la fase oleosa y se le añadió 1 ml de CH₃COOH 1% por cada ml recuperado. La mezcla se agitó 30 min a 40 °C, se reposó 30 min y se recolectó la fase oleosa, la cual se centrifugó 10 min a 2400 rpm recuperando el sobrenadante. Se cuantificó astaxantina por espectrofotometría ultravioleta visible.

Saponificación. Al residuo purificado se añadió

KOH disuelto en agua, se reposó 18 h a 25 °C protegido de la luz, se agitó 10 min y se ajustó el pH a 5.0. La mezcla se reposó 30 min, se lavó con agua hasta alcanzar pH 7.0 y obtener una fase lipídica insoluble en agua.

Extracción. Se recuperó la fase lipídica después de la saponificación, se lavó con hexano, se agitó 5 min, se reposó 30 min a 25 °C protegida de la luz y se recobró el sobrenadante. El procedimiento se repitió 3 veces y los sobrenadantes se mezclaron.

Secado. La mezcla de sobrenadantes se secó a 40 °C hasta peso constante en estufa de vacío y se cuantificó astaxantina por espectrofotometría ultravioleta visible

Cuantificación de astaxantina. Se realizó por el método sugerido por López-Cervantes *et al.* (2006) y para ello se pesó la muestra, se le agregó metanol, se agitó 5 min, se centrifugó 15 min a 2500 rpm y se obtuvo la absorbancia en espectrofotómetro ultravioleta visible a una longitud de onda de 476 nm. Se cuantificó astaxantina utilizando una curva estándar cuya ecuación fue $y = -0.0066 + 0.1534x$ y $R^2 = 0.9992$.

Resultados y discusión

Para purificar la astaxantina se puede optar por hidrolizar y separar los ácidos grasos esterificados en uno o ambos grupos hidroxilo de su estructura. Al respecto Higuera-Ciapara *et al.* (2006) afirma que si se saponifica una muestra en condiciones

apropiadas, se puede lograr que solo se hidrolicen los enlaces éster, y que la molécula de astaxantina se mantenga intacta para después de separar los residuos se obtenga el pigmento concentrado. Con base en lo anterior, se siguió la metodología propuesta por Montoya-Olvera *et al.* (2001), para obtener xantofilas de alta pureza. La metodología involucró purificación, saponificación, ajuste de pH, lavado, extracción y secado. Se cuantificó astaxantina después de cada una de las etapas por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Contenido de astaxantina en la fracción lipídica

Se determinó la absorbancia de la astaxantina en metanol, variando la longitud de onda desde 240 hasta 590 nm. La longitud de onda máxima en este trabajo fue de 476 nm (figura 2), similar a lo reportado por Rodríguez-Amaya (2001) quien indicó que la longitud óptima estaba en el rango de 468 a 480 nm. La longitud de onda máxima se utilizó como referencia en las cuantificaciones de astaxantina realizadas a las muestras.

Se obtuvo la función de calibración, para lo cual se varió la concentración de astaxantina entre 2.1 y 21 mg por ml considerando 10 puntos de la recta y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro ultravioleta-visible. Los resultados indicaron un buen ajuste ($R^2 = 0.9992$) a una función lineal, misma que se usó para calcular el contenido de astaxantina.

Se cuantificó por triplicado la concentración de

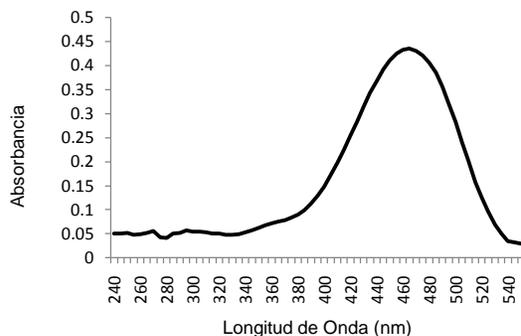


Figura 2. Espectro de absorción del patrón de astaxantina en metanol.

astaxantina a la fracción lipídica, variando entre 1.611 y 1.869 mg g⁻¹ (tabla 1) lo cual difiere sensiblemente a lo reportado por López-Cervantes *et al.* (2006), mostrando concentraciones en el rango 1.07 a 3.16 cuantificadas por HPLC.

Tabla 1. Concentración de astaxantina en fracción lipídica original y purificada.

Muestra No	Original (mg/g)	Purificada (mg/g)
1	1.869	1.320
2	1.807	1.292
3	1.611	1.302
Promedio	1.762	1.305

Purificación de la fracción lipídica

La finalidad este proceso fue eliminar ácidos grasos libres, ceras, fosfátidos y compuestos volátiles. En la tabla 1 se presenta el contenido de astaxantina en la fracción lipídica original y purificada, observándose que el proceso de purificación disminuyó la concentración del pigmento en un 25.9%. Esto es congruente con lo que reportan Johnson y Gil-Hwan (1999) y Rodríguez-Amaya (2001), quienes recomiendan evitar el uso de sustancias alcalinas durante los pasos de extracción y purificación, porque éstos compuestos cambian irreversiblemente la astaxantina a astaceno. De igual manera, no aconsejan el uso de ácidos porque

degradan la astaxantina. También López-Cervantes *et al.* (2006) afirman que la astaxantina es un carotenoide lábil a los álcalis.

Para valorar la estabilidad del pigmento al tratamiento se obtuvieron los espectros de absorción del patrón de astaxantina, fracción lipídica original y purificada. Al comparar el espectro del patrón (figura 2) con el de la fracción lipídica original (figura 3) y con el de la fracción purificada (figura 4), se confirmó la presencia del pigmento en ambas muestras pues los espectros presentaron un máximo de absorción alrededor de los 470 nm.

Saponificación y extracción de la fracción lipídica purificada

En la figura 5 se observa que la concentración de astaxantina varió de 448 a 785 µg de astaxantina por g de muestra saponificada. Estos valores son en promedio 50.9 % menores que los valores promedio de la muestra sin saponificar. Por lo que, estos procedimientos pueden modificar a la molécula de astaxantina y provocar la disminución de su concentración. Al respecto Yuan y Chen (1999) afirman que la concentración de solución saponificante influye tanto en la hidrólisis de los ésteres de astaxantina como en la degradación de la misma y que el uso de altas concentraciones induce una degradación significativa del pigmento.

Respecto al solvente a utilizar durante el proceso de

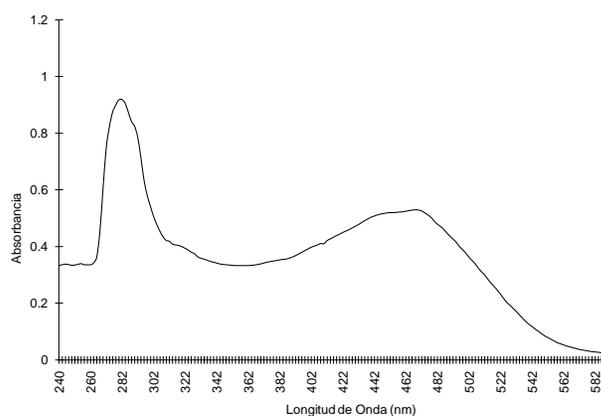


Figura 3. Espectro de absorción de astaxantina en la fracción lipídica original, disuelta en metanol.

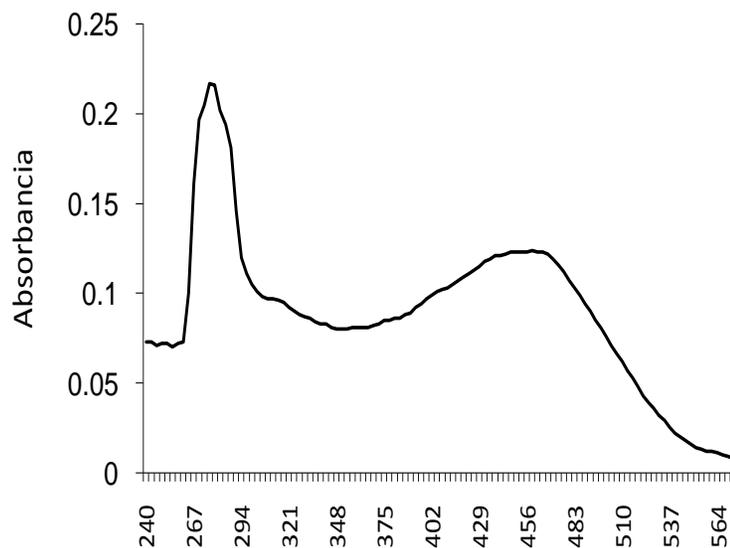


Figura 4. Espectro de absorción de astaxantina en la fracción lipídica purificada, disuelta en metanol.

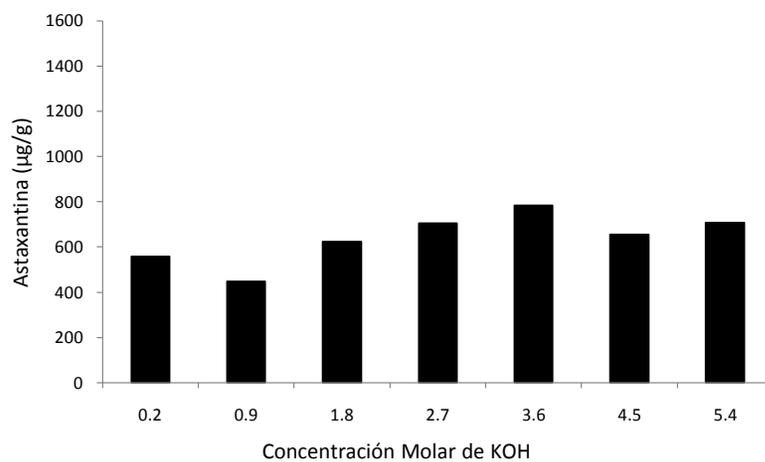


Figura 5. La concentración de astaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$) en función de la concentración de KOH (moles por litro).

saponificación, no hay criterio unificado. Yuan y Chen (1999) emplearon diferentes concentraciones de NaOH en metanol; Boussiba *et al.* (1992) y Sarada *et al.* (2006) usaron KOH 0.9 M en metanol; Gimeno *et al.* (2007) KOH 0.09 M disuelto en agua pero Montoya-Olvera *et al.* (2001) recomiendan que se utilice agua como solvente del KOH.

Se utilizó KOH 0.9 M recomendado por Sarada *et al.* (2006). Como se puede observar en la figura 6, la concentración de astaxantina varió de 809 a 1198 μg de astaxantina por g de muestra en relación a la cantidad de KOH utilizado.

Estos valores son en promedio 25.85 % menores

que los valores promedio de la muestra sin saponificar lo que indica que los tratamientos no son apropiados para romper enlaces éster en la astaxantina y que también ocasionan su degradación (Yuan y Chen, 1999). El tratamiento en el cual se utilizaron 0.8 ml de KOH 0.9 M por ml de muestra fue el mejor con menor pérdida de astaxantina, lo cual concuerda con Rodríguez-Amaya (2001) que recomienda volúmenes equivalentes de muestra y KOH.

Se estudió el efecto del ajuste de pH en el contenido de astaxantina. Como puede apreciarse en la figura 7, la concentración de astaxantina varía en relación

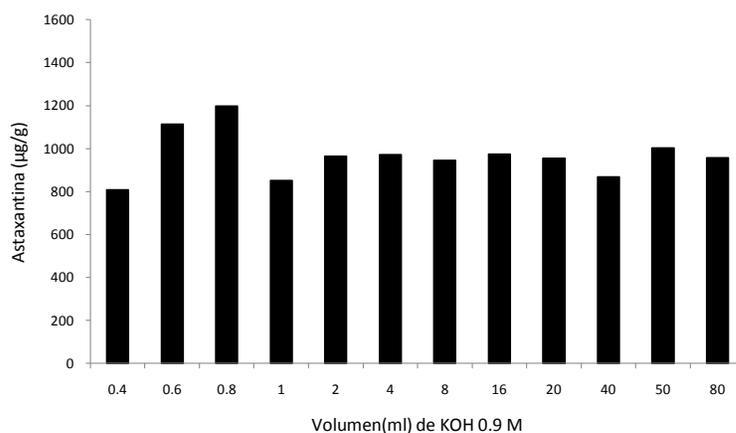


Figura 6. La concentración de astaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$) en función del volumen de KOH 0.9 M.

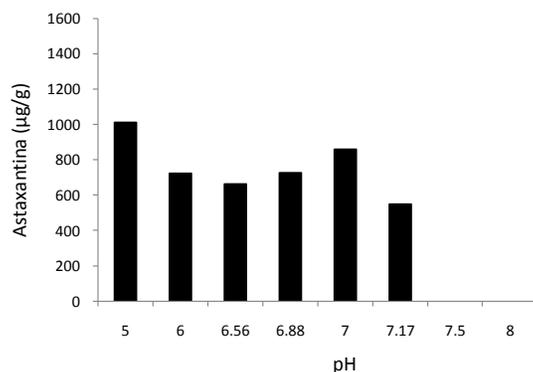


Figura 7. La concentración de astaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$) en función del ajuste de pH posterior a la saponificación.

al pH, alcanzando $1010 \mu\text{g g}^{-1}$ como el valor más alto a pH 5, resultado que apoya lo indicado por Sarada *et al.* (2006), quienes recomiendan acidificar hasta pH 4 después de la saponificación para promover la ruptura de enlaces éster en los pigmentos. Ningún tratamiento incrementó el contenido de astaxantina hasta los valores de la muestra sin saponificar.

Conclusiones

El proceso de purificación de la fracción lipídica elimina olores desagradables sin afectar la molécula de astaxantina. Sin embargo, los tratamientos que involucran la utilización de agentes saponificantes y ajuste del pH afectan el contenido de astaxantina. Por ello, para estudios posteriores se recomienda adicionar antioxidantes, disminuir la concentración del agente saponificante y utilizar diferentes solventes para la extracción del pigmento.

Bibliografía

- Armenta-López R., Guerrero L.I. y Huerta S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the caroprotein complex. *Journal of Food Science*, 67(3):1002-1006.
- Boussiba S., Fan L. y Vonshak A. 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymology*, 213:386-391.
- Bueno-Solano C., Lopez-Cervantes J., Campas-Baypoli O.N., Lauterio-Garcia R., Adan-Bante N.P. y Sanchez-Machado, D.I. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112:671-675.
- Cañipa A. y Duran B. 1995. Reaprovechamiento del cefalotórax del camarón. *Industria Alimentaria*, 10-17.
- Czczuga B. y Czerpak, R. 1968. Carotenoids in the carapace of the *Orconectes zimosus* (Raf.), crustacea: decapoda. *European Journal Biochemistry*, 5:429-432.
- Gimeno M., Ramírez-Hernández J.Y., Martínez-Ibarra C., Pacheco N., García-Arrazola R., Bárzana E. y Shirai K. 2007. One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10345-10350.
- Handayani A.D., Sutrisno Indraswati N. y Ismadji, S. 2008. Extraction of astaxanthin from giant tiger *Penaeus monodon* shrimp waste using palm oil: studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*, 99:4414-4419.
- Higuera-Ciajara I., Félix-Valenzuela L. y Goycoolea F.M. 2006. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:185-196.
- Johnson E.A. y Gil-Hwan, A. 1999. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4):297-326.
- López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Gutiérrez-Coronado M.A. y Ríos-Vázquez N.J. 2006. Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC. *Biomedical Chromatography*, 20(10):981-984.
- Luna R., Ramírez M. y Jiménez M. 2003. Obtención de pigmentos carotenoides provenientes del cefalotórax de camarón mediante su extracción con aceite comestible y su aplicación como complementos alimenticios. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mathur L. y Narang, R. 1990. Shrimp composition. *Aquaculture Digest*, Enero.
- Montoya-Olvera R., Elizondo-Mireles J.R., Torres-Gomez C. y Torres-Quirogo, J.O. 2001. Process for obtaining highly pure xanthophyll concentrates, WO/2001/028966, World Intellectual Property Organization.
- Nagao T., Fukami T., Horita Y., Komemushi S., Sugihara A. y Shimada Y. 2003. Enzymatic enrichment of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* cell extracts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80:975-981.
- Passos R., Beirão L., Palavra A., Mendes R., Nobre B. y Gouveia L., 2006. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. Supercritical carbon dioxide and organic solvents extraction. *Journal of Food Technology*, 4(1):59-63.
- Ramírez C.M., García G.R., Flores A.I., Gálvez M.A. y Durán B.C. 2003. Empleo de una enzima quitinolítica de *Serratia marcescens* para la obtención de caroproteínas a partir del cefalotórax de camarón. *Tecnología, Ciencia y Educación*, 18(1):32-39.
- Rødde R.H., Einbu A. y Vårum K.M. 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp *Pandalus borealis*. *Carbohydrate polymers*, 71:388-393.
- Rodríguez-Amaya D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI PRESS. United states of America.
- Sarada R., Vidhyavathi R., Usha D. y Ravishankar G.A. 2006. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7585-7588.
- Stepnowski P., Ólafsson G., Helgason H. y Jastorff B. 2004. Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste. *Chemosphere*, 54:413-417.
- Tanaka Y. y Ohkubo T. 2003. Extraction of lipids from salmon roe with supercritical carbon dioxide. *Journal of Oleo Science*, 52:295-301.
- Valderrama J.O., Perrut M. y Majewski W. 2003. Extraction of astaxanthin and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 48:827-830.
- Yuan J.P. y Chen F. 1999. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1): 31-35.