

# PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE ASTAXANTINA EN MICROALGAS CULTIVADAS

## PROTOCOL FOR THE DETERMINATION OF ASTAXANTHIN IN CULTIVATED MICROALGAE

Leenin Flores<sup>1</sup>

Hanna Hernández

Anthony Ruiz

Alberto Oscanoa

### RESUMEN

FLORES L, HERNÁNDEZ H, RUIZ A, OSCANO A. 2021. Protocolo para determinación de astaxantina en microalgas cultivadas. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 30-34.- Los carotenoides son pigmentos importantes para la acuicultura. Contribuyen en los criterios de calidad, especialmente en el color, para satisfacer la demanda de los consumidores de productos acuícolas. En las dietas de peces, la pigmentación es importante por lo que se incluyen fuentes de carotenoides sintéticas y naturales. Durante los últimos años las microalgas han adquirido especial interés, debido a que son productores de compuestos de alto valor. La microalga *Haematococcus pluvialis* es una de las fuentes más importante de astaxantina natural y tiene gran interés comercial debido a su actividad antioxidante. Por esta razón, el objetivo del protocolo es determinar el contenido de astaxantina en microalgas cultivadas usando cromatografía líquida de alta resolución.

**PALABRAS CLAVE:** carotenoides, pigmentación, microalga, cromatografía

### ABSTRACT

FLORES L, HERNÁNDEZ H, RUIZ A, OSCANO A. 2021. Protocol for determination of astaxanthin in cultured microalgae. *Inf Inst Mar Peru*. 48(1): 30-34.- Carotenoids are important pigments for aquaculture. They contribute to quality criteria, especially color, to meet consumer demand for aquaculture products. In fish diets, pigmentation is important so we include both synthetic and natural sources of carotenoids. In recent years, microalgae have gained special interest because they are producers of high-value compounds. The microalga *Haematococcus pluvialis* is one of the most important sources of natural astaxanthin and is of great commercial interest due to its antioxidant activity. Therefore, this protocol aims to determine the astaxanthin content in cultured microalgae using high-performance liquid chromatography.

**KEYWORDS:** carotenoids, pigmentation, microalgae, chromatography

## 1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios del AFIA-IMARPE producen microalgas, microorganismos fotosintéticos importantes por su fuente de biocompuestos, como ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobilinas, péptidos, polisacáridos y son fuente de vitaminas (A, B1, B2 y B12).

Se cultivan en fotobiorreactores tubulares, tanques y sistemas tipo *Raceway*. Para conservar sus biocompuestos los cultivos son centrifugados, así como secados mediante liofilización. Esto para separar el agua de la microalga mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

Los carotenoides, en el medio acuático, proceden principalmente del pigmento microalgal. Son de interés industrial, pues se usan como colorantes naturales en alimentación

humana, animal, en la acuicultura, industria farmacéutica y cosmética (CAMACHO, GONZALEZ y KLOTZ, 2013).

La astaxantina es el carotenoide más importante desde el punto de vista biotecnológico, se obtiene de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Pertenece al grupo de las xantofilas y es atractivo para los mercados industriales por sus interesantes propiedades como: el grado alimenticio, colorante y agente antioxidante (MOLINO *et al.*, 2018).

En la acuicultura, se usa como aditivo alimenticio para otorgar el color rosado/rojo a salmones, truchas y crustáceos, haciéndolo atractivo para los consumidores. También es apreciada por sus efectos antioxidantes, beneficios para la reproducción y el sistema inmune de los organismos acuáticos (AMAYA *et al.*, 2014).

<sup>1</sup> IMARPE Esq. Gamarra y Gral. Valle s/n, Callao, Perú. lflores@imarpe.gob.pe

A través de los años, se han desarrollado diversas técnicas para el análisis de astaxantina en microalgas. Consiste en liberarla de sus ésteres por hidrólisis alcalina o por hidrólisis enzimática y luego utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada a diversos detectores tales como el arreglo de diodos (DAD) o UV (Lu *et al.*, 2010).

El objetivo del protocolo es describir el procedimiento para determinar el contenido de astaxantina en microalgas cultivadas por HPLC. Siendo resultado de la evaluación de las metodologías propuestas por CEREZAL *et al.* (2014), GALARZA *et al.* (2019), GARCÍA & LARA (2013), HUCK *et al.* (2000), OGAWARA *et al.* (2010), SU *et al.* (2018), SZPYLKA *et al.* (2005) y THOMASON (2001).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales en el proceso se listan a continuación:

- HPLC Hitachi LaChrom Elite con detector DAD y programa EZChrom Elite Ver. 3.2.1.
- Agitador Vórtex ZX Classic VELP Scientific.
- Balanza semi-micro analítica Sartorius MSU225S-000-DU.
- Centrifuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R.
- Evaporador-concentrador Glas-Col para viales de 4 mL.
- Campana extractora de gases LABCONCO.
- Micropipetas de rango variable de 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L y 500-5000  $\mu$ L.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa rosca de PTFE.
- Tubos Falcon de 15 mL.
- Viales HPLC de 2 mL.
- Filtros de jeringa de PTFE 0,45  $\mu$ m.
- Fiolas clase A de 50 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Perlas de metal de 2,4 mm VWR Metal Beads 10158-550.
- Acetona grado HPLC.
- Hexano grado HPLC.
- Sulfato de sodio anhidro P.A.
- Metanol grado HPLC.
- Acetato de amonio P.A.
- Nitrógeno gas extra puro  $\geq 99,9\%$ .

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Estándar de astaxantina** de 100  $\mu$ g/mL: pese 5 mg de astaxantina en una fiola de 50 mL, añada 30 mL de acetona y disuelva en el baño de ultrasonido, enrase a 50 mL con acetona.
- **Tris-HCl buffer** 0,5 M pH=7: añada 30,285 g de tris base en un vaso de precipitados de 500 mL, agregue 350 mL de agua ultrapura y disuelva por un minuto. Luego verifique el pH, debe ser mayor a 7,4. Añada lentamente 16,25 mL de HCl concentrado (37%) e incorpore HCl hasta pH=7. Complete con agua ultrapura hasta 500 mL, esterilice y almacene en refrigerador hasta por 4 meses (PM Tris base=121,14 g/mol).
- **Colesterol esterasa** 4 U/mL: disuelva el reactivo Sigma-Aldrich C9281 de 100 U en 25 mL de solución Tris-HCl buffer 0,5 M pH=7. Se recomienda almacenar en viales de 2 mL a -20 °C, si no se va a usar en el momento.
- **Fase móvil B**, Metanol-Acetato de amonio 0,5N 80:20 (v/v): pese 7,71 g de acetato de amonio en una botella con tapa rosca de 1 L y añada 200 mL de agua y disuelva en baño de ultrasonido. Luego, agregue 800 mL de metanol a la solución de acetato de amonio y repita el baño.

### EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA

- Trabaje las muestras en un ambiente con luz tenue para evitar la fotooxidación de la astaxantina.
- Pese 10 mg de muestra liofilizada (Wm) en un tubo Falcon de 15 mL, repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare un tubo sin muestra (blanco de reactivos).
- Agregue 50 mg de perlas de metal junto con 5 mL de acetona, agite con fuerza en un vórtex por 30 s y centrifugue el extracto. Luego

almacene el sobrenadante en una fiola de 25 mL (Vfiola) y repita la operación hasta que el pellet se aclare del todo (Fig. 1), suele repetirse tres veces. Enrase a 25 mL con acetona.

### HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

- Ajuste la absorbancia del extracto de acetona entre 0,4 y 1,0 a 475 nm. Un valor de 0,85 es óptimo, anote el nivel de dilución (Fd).
- Transfiera 2 mL del extracto (Vh) a un tubo de vidrio y añada 2 mL de Tris-HCl buffer 0,5 M pH=7. Si la solución no es traslúcida o hay separación de fase, se debe purificar.
- Incube el tubo a 37 °C por 2 min, añada 200 µL de colesterol esterasa 4 U/mL, incube a

37 °C por 45 min con agitación suave cada 15 min.

- Añada 2 mL de hexano, agite vigorosamente en un vórtex.
- Centrifugue el tubo a 3500 RPM por 3 min y separe la fase orgánica en un vial de 4 mL.
- Añada 2 mL más de hexano y repita la extracción, junte los dos extractos en el vial de 4 mL.
- Seque el vial con nitrógeno gas en un evaporador-concentrador.
- Reconstituya con 3 mL de acetona (VHPLC) y tamice con el filtro de PTFE de 0,45 µm en un vial antes de inyectarlos al HPLC (Fig. 2).

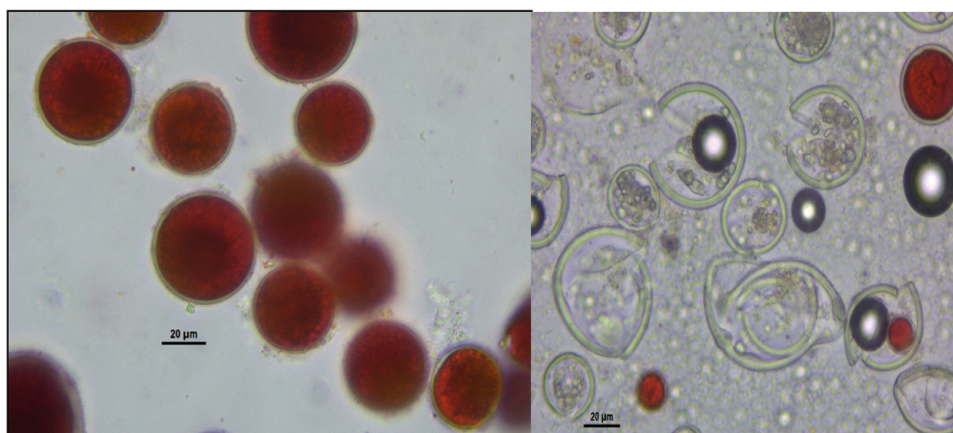


Figura 1.- Microalga *Haematococcus pluvialis*, antes y después del proceso de extracción de la astaxantina



Figura 2.- HPLC Hitachi *LaChrom Elite*

Tabla 1.- Volúmenes de los reactivos para la curva de calibración

Nivel	Volumen de estándar de astaxantina de 100 µg/mL (µL)	Volumen de acetona (µL)	Concentración final de astaxantina (µg/mL)
0	0	3000	0
1	30	2970	1
2	150	2850	5
3	300	2700	10
4	750	2250	25
5	1500	1500	50

### CURVA DE CALIBRACIÓN

- La curva de calibración se prepara a partir de la solución estándar de astaxantina de 100 µg/mL de acuerdo a la Tabla 1.

### CONDICIONES DE HPLC

- Columna Merck LiChrospher® C8 de 4,6 mm x 150 mm, 5 µm con guardacolumna.
- Temperatura del horno de la columna de 25 °C.
- Temperatura del automuestreador de 10 °C.
- Volumen de inyección de 20 µL.
- Longitud de onda de detección de 450 nm.
- Fases móviles: A= Metanol, B= Metanol-Acetato de amonio 0,5N 80:20 (v/v) y C= Tetrahydrofurano.
- Rampa de fase móvil (Tabla 2).
- El cromatograma típico del extracto se muestra en la figura 3.

Tabla 2.- Rampa de fase móvil

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	%C
0,0	1	0	100	0
5,0	1	98	0	2
17,2	1	80	0	20
25,0	1	80	0	20
26,0	1	98	0	2
34,0	1	0	100	0

### PROCESAMIENTO DE DATOS

La concentración de astaxantina en mg/g, se calcula mediante la fórmula:

$$\text{mg AA}_i \text{ Tg muestra} = \frac{C_{mi} * V_e * V_f * PM_i}{P_s * V_a * 1000000}$$

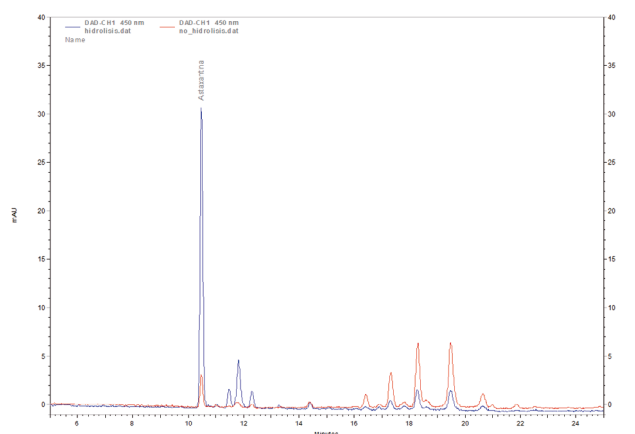


Figura 3.- Cromatograma típico del extracto de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Azul, extracto hidrolizado y rojo, extracto sin hidrolizar, se aprecian los picos de los ésteres de astaxantina

Donde:

$C_c$ : Concentración de astaxantina en la curva de calibración (µg/mL).

$F_d$ : Factor de dilución ( $\geq 1$ ).

$V_{fiola}$ : Volumen de la fiola (mL).

$V_h$ : Volumen del extracto en la hidrólisis enzimática (mL).

$V_{HPLC}$ : Volumen del extracto previo a la inyección al HPLC (mL).

$W_m$ : Masa de la microalga liofilizada (mg).

### CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

## REFERENCIAS

- AMAYA E, BECQUET P, CARNE S, PERIS S, MIRALLES P. 2014. Carotenoids in Animal Nutrition. Brussels: Fefana.
- CAMACHO J E, GONZALEZ G, KLOTZ B. 2013. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. Revista Nova. 11: 93-104.
- CEREZAL MEZQUITA P, BARRAGÁN-HUERTA B E, PALMA RAMÍREZ J, ORTIZ HINOJOSA C. 2014. Stability of astaxanthin in yogurt used to simulate apricot color, under refrigeration. Food Science and Technology. 34(3): 1-7.
- GALARZA J I, ARREDONDO VEGA B O, VILLÓN J, HENRÍQUEZ V. 2019. Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress. Biotechnol Reports. 23. e00351.
- GARCÍA CHAVARRÍA M, LARA FLORES M. 2013. The use of carotenoid in aquaculture. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology. 38-49.
- HUCK C W, POPP M, SCHERZ H, BONN G K. 2000. Development and Evaluation of a New Method for the Determination of the Carotenoid Content in Selected Vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS. Journal of Chromatographic Science. 38: 442-449.
- LU M, ZHANG Y, ZHAO C, ZHOU P, YU L. 2010. Analysis and Identification of Astaxanthin and its Carotenoid Precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of biosciences. 489-494. doi:10.1515/znc-2010-7-812
- MOLINO A, RIMAURO J, CASELLA P, CERBONE A, LAROCCA V, CHIANESE S, MUSMARRA D. 2018. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using Generally Recognized as Safe solvents and accelerated extraction. Journal of Biotechnology. 283: 51-61. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.010
- OGAWARA M, INO Y, YOSHIDA M, HISHIYAMA T, IGARASHI T. 2010. High Performance Liquid Chromatography Quantification of Total Astaxanthin in Health Foods. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 57(5): 205-214.
- SU F, XU H, YANG N, LIU W, LIU J. 2018. Hydrolytic efficiency and isomerization during de-esterification of natural astaxanthin esters by saponification and enzymolysis. Electronic Journal of Biotechnology. 34: 37-42.
- SZPYLKA J, DEVRIES J W. 2005. Determination of  $\beta$ -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography. Journal of AOAC International. 1279-1291.
- THOMASON M. 2001. HPLC Analysis of Astaxanthin from Fish and Shrimp Feeds Containing NatuRose (*Haematococcus* algae meal). NatuRose Technical Bulletin #012, 1-7.