

PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE β -CAROTENO EN MICROALGAS LIOFILIZADAS

PROTOCOL FOR DETERMINATION OF β -CAROTENE IN LYOPHILIZED MICROALGAE

Anthony Ruiz¹

Leenin Flores

Alberto Oscanoa

RESUMEN

RUIZ A, FLORES L, OSCANO A. 2021. Protocolo para determinación de β -caroteno en microalgas liofilizadas. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 11-15.- Los carotenos son pigmentos importantes para la acuicultura. Contribuyen a los criterios de calidad, especialmente en el color, para satisfacer las demandas de los consumidores de los productos acuícolas. En las dietas de peces, la pigmentación es importante por lo que se incluyen fuentes de carotenoides sintéticas y naturales. Los carotenos de origen vegetal se derivan principalmente del pigmento microalgal, como el β -caroteno que es un colorante natural en la industria de alimentos para la acuicultura. Por esta razón, el objetivo del presente protocolo es determinar el contenido de β -caroteno en microalgas liofilizadas por cromatografía líquida de alta resolución.

PALABRAS CLAVE: carotenos, carotenoides, pigmentación, cromatografía

ABSTRACT

RUIZ A, FLORES L, OSCANO A. 2021. Protocol for determination of β -carotene in lyophilized microalgae. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 11-15.- Carotenes are important pigments for aquaculture. They contribute to quality criteria, especially in color, to meet consumer demands for aquaculture products. In fish diets, pigmentation is important so synthetic and natural sources of carotenoids are included. Plant-derived carotenoids are mainly derived from microalgal pigments, such as β -carotene which is a natural colorant in the aquaculture feed industry. Therefore, this protocol aims to determine the β -carotene content in lyophilized microalgae using high-performance liquid chromatography.

KEYWORDS: carotenes, carotenoids, pigmentation, chromatography

1. INTRODUCCIÓN

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

Las microalgas se cultivan en fotobiorreactores tubulares, tanques y sistemas tipo *Raceway*. Los cultivos se centrifugan, luego se secan mediante liofilización para separar el agua de la microalga mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida para la conservación de biocompuestos

En la industria de la acuicultura, los carotenoides juegan un papel importante. Tienen diversas funciones biológicas y nutricionales en animales acuáticos, con efecto de factores bióticos al igual que abióticos sobre transporte, retención de carotenoides y pigmentación final.

Los carotenoides se han incluido en las dietas de salmónidos, crustáceos y otros cultivos de peces. En esencia como pigmentos para obtener una buena coloración, así como aprobación del consumidor (GARCÍA & LARA, 2013).

Los carotenoides y carotenos, proporcionan una actividad antioxidante significativa para la alimentación humana al igual que el suministro de alimentos para animales (SZPYLKA & DE VRIES, 2005).

La microalga *Haematococcus pluvialis* se explota comercialmente en la acuicultura por su rápido crecimiento y alto contenido de astaxantina natural. Mientras la microalga *Dunaliella salina*, es fuente de β -caroteno natural que se usa como agente colorante en la industria de alimentos para la acuicultura (AQUAFEED, 2016).

El β -caroteno es importante comercialmente y se usa como agente colorante de alimentos, antioxidante y una fuente segura de provitamina A.

¹ IMARPE Esq. Gamarra y Gral. Valle s/n, Callao, Perú. aruiz@imarpe.gob.pe

La mayoría del β -caroteno está presente naturalmente en la forma *trans*. Sin embargo, algunos isómeros de la forma *cis* se encuentran en los alimentos (JING, QUN & ROHRER, 2012).

Se desarrollaron diversas técnicas para obtener carotenos, entre ellas la espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a diversos detectores tales como el arreglo de diodos (DAD) o UV (PÉREZ, ALDANA Y RODRÍGUEZ, 2011).

Otras investigaciones emplean métodos más sofisticados como técnicas acopladas a espectrometría de masas (LC/MS), ello implica contar con la infraestructura adecuada y equipos muy costosos (HUCK *et al.*, 2000).

El objeto de este protocolo es describir el procedimiento para determinar el contenido de β -caroteno en muestras de microalgas liofilizadas por HPLC.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales a utilizar en este 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.
- Centrífuga refrigerada *Eppendorf Centrifuge* 5702R.
- Campana extractora de gases LABCONCO.0
- Micropipetas de rango variable de 10-100 μ L, 100-1000 μ L y 500-5000 μ L.
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa rosca de PTFE.
- Viales con filtro de 2 mL de PTFE 0,45 μ m.
- Fiolas clase A de 50 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Metanol grado HPLC.
- Tetrahidrofurano grado HPLC.
- Acetona grado P.A.
- Nitrógeno gas extra puro $\geq 99,9\%$.
- Agua Ultrapura.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Estándar de *all-trans*- β -caroteno** 100 μ g/mL: pese 5,0 mg del estándar *all-trans*- β -caroteno (Fig. 1a) en una fiola de 50 mL, añada 25 mL de acetona 100% y disuelva en el baño de ultrasonido, enrase a 50 mL con acetona 100%.
- **Estándar interno (IS)** concentración 100 μ g/mL: pese 5,0 mg de estándar *trans*- β -Apo-8'-carotenal (Fig. 1a) en una fiola de 50 mL, añada 25 mL de acetona 100% y disuelva en el baño de ultrasonido, enrase a 50 mL con acetona 100%.
- **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, añada 200 mL de agua, disuelva en baño de ultrasonido. Luego, agregue 800 mL de metanol a la solución de acetato de amonio, finalmente disuelva como se indicó anteriormente.

EXTRACCIÓN DE β -CAROTENO

- Trabaje las muestras en un ambiente con luz muy tenue para evitar la degradación del β -caroteno.
- Pese 40 mg de biomasa liofilizada (Fig. 1b) en un tubo de ensayo de 16x100 mm con tapa de PTFE. Repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare 1 tubo sin muestra (blanco de reactivos).
- Agregue 3 mL de acetona 100%, incluyendo el blanco de reactivos.
- Añada nitrógeno gas a cada tubo con muestra, incluyendo el blanco de reactivos durante 1 min.
- Iguale los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido por 15 min.
- Coloque el tubo en refrigeración a -4 °C durante toda la noche.
- Al día siguiente, iguale nuevamente los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido por 15 min.
- Centrifugue las muestras a 4 °C y 350 rpm por 20 min, recolectar en un tubo de ensayo y repita la extracción con 3 mL más de acetona.

Junte ambos extractos y anote el volumen (VE).

- Filtre el extracto en viales de 2 mL con filtro de PTFE 0,45 μm antes de ser inyectados en el HPLC (Fig. 2).

CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración (Fig. 3) se prepara a partir de una solución patrón de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *all-trans*- β -caroteno y estándar interno *trans*- β -Apo-8'-carotenal de acuerdo a la Tabla 1.

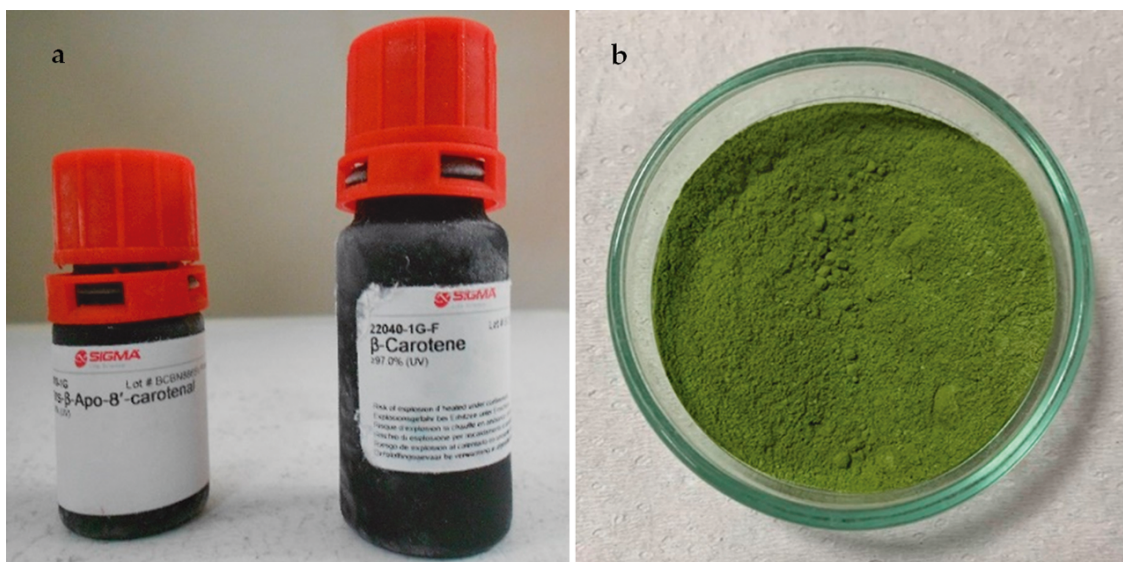


Figura 1.- Estándares de *all-trans*- β -caroteno y *trans*- β -Apo-8'-carotenal (a). Muestra de microalga liofilizada (b)



Figura 2.- HPLC Hitachi LaChrom Elite

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

Nivel	Volumen de estándar de <i>all-trans</i> - β -caroteno de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μL)	Volumen de IS de <i>trans</i> - β -Apo-8'-carotenal de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μL)	Volumen de acetona 100% (μL)	Concentración final de <i>all-trans</i> - β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0	400	3600	0
1	40	400	3560	1
2	100	400	3500	2,5
3	200	400	3400	5
4	400	400	3200	10
5	1000	400	2600	25

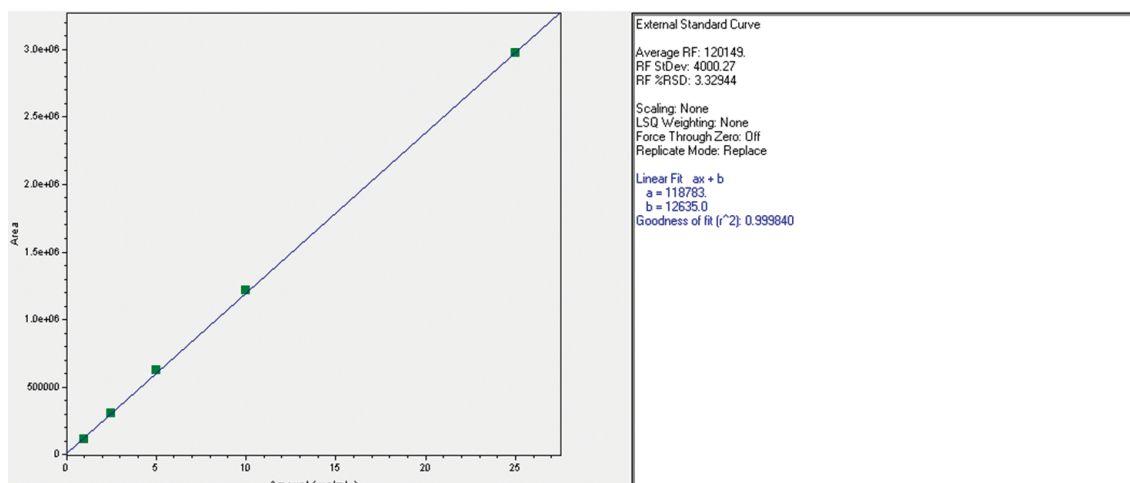


Figura 3.- Curva de calibración típico del estándar de *all-trans-β-caroteno*

CONDICIONES DE HPLC

- Columna Merck LiChrospher® C18 de 4,6 mm x 250 mm, 5 μm con guardacolumna.
- Temperatura del horno de la columna: 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= Tetrahidrofurano.
- Rampa de fase móvil (Tabla 2).
- El cromatograma típico del extracto de una microalga 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 *all-trans-β-caroteno* en μg/g, se calcula mediante la fórmula:

$$\mu\text{g } all\text{-trans-}\beta\text{-caroteno/g muestra} = \frac{C_m * V_E}{W_S}$$

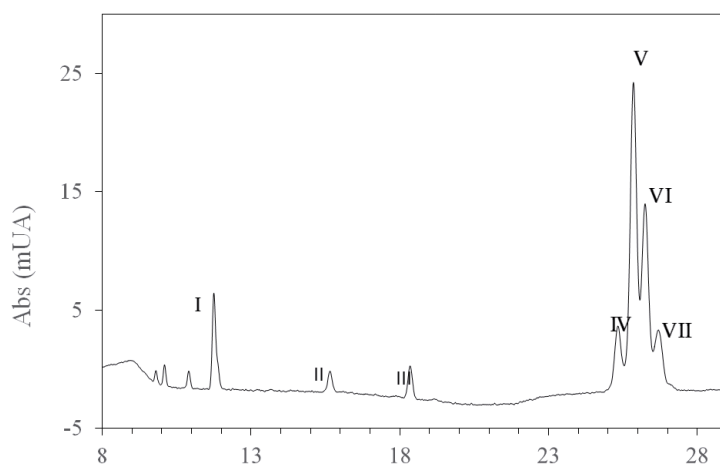


Figura 3.- Cromatograma típico de los pigmentos identificados en la microalga *Dunaliella salina* IMP-BG-001. I. violaxantina, II. clorofila b, III. clorofila a, IV. α-caroteno, V. *all-trans-β-caroteno*, VI. 9-*cis-β-caroteno*, VII. 13-*cis-β-caroteno*

Donde:

C_m = Concentración de β -caroteno de la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

V_E = Volumen de extracción (mL)

W_s = Masa de la microalga liofilizada (g)

CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 5%, en caso contrario se repite la prueba.

REFERENCIAS

AQUAFEED. 2016. Aquafeed.com. Obtenido de The importance of carotenoids in aquafeeds: <http://www.aquafeed.com/af-article/6504/The-importance-of-carotenoids-in-aquafeeds/>

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.

JING C, QUN X, ROHRER J. 2012. HPLC Separation of All-Trans- β -Carotene and Its Iodine-Induced Isomers Using a C30 Column. Thermo Fisher Scientific Inc. 1-5.

PÉREZ HERNÁNDEZ T, ALDANA M I, RODRÍGUEZ L I. 2011. Validación de un método para la determinación de Beta-caroteno en aceite de palma por HPLC con detector UV. 1-8.

SZPYLKA J, DEVRIES J W. 2005. Determination of β -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography. Journal of AOAC International. 1279-1291.