

EXTRACCION DEL PIGMENTO ASTAXANTINA DE DESECHOS DE CRUSTACEOS

*Danilo Morales M.*Escuela de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional
Heredia, Costa Rica*Marco A. Calvo P.*Departamento de Química
Universidad Nacional
Heredia, Costa Rica

RESUMEN

Se extrajo el pigmento astaxantina de los desechos del langostino *Procambarus clarkii* y del camarón rojo *Solenocera agassizii*, utilizando aceite de soya. Se obtuvo una cantidad promedio de 22.1 mg de astaxantina/100 g de aceite de soya de los desechos del langostino y de 104.2 mg de astaxantina/100 g de aceite de los desechos del camarón rojo, cantidad que es más alta que la extraída de desechos de otros crustáceos al utilizar métodos más sofisticados. Por lo tanto, estos desechos tienen un gran potencial para ser utilizados como fuente de pigmento natural, especialmente para la dieta de salmonídeos y en la pigmentación de aves y las yemas de sus huevos.

ABSTRACT

The astaxanthin pigment was extracted from *Procambarus clarkii* and *Solenocera agassizii* wastes using a soybean oil process. Extracts containing 22 mg of astaxanthin/100 g of oil and 104.2 mg of astaxanthin/100 g of oil were prepared from crawfish (*P. clarkii*) and red shrimp (*S. agassizii*) wastes respectively.

The 104.2 mg of astaxanthin/100 g of oil is highest than those reported for other crustacean

wastes. Therefore, red shrimp wastes has a good potencial as a natural pigment source, notably in aquatic diets for salmonid fishes, laying hens and the yolk of their eggs.

INTRODUCCION

Los carotenoides en crustáceos han atraído la atención de los científicos a causa de la diversidad de colores que presentan si se les compara con los de otros organismos. Estos compuestos se pueden encontrar en el caparazón y las extremidades, así como también en la sangre, ojos, hiepanopáncreas y ovarios (Kuo et al., 1976a).

Es aceptado que ningún animal tiene la habilidad de sintetizar carotenoides *in vivo*, pero sí son capaces de absorberlos con sus alimentos, alterándolos de acuerdo con sus necesidades (Katayama et al., 1973; Tanaka et al., 1976). Dentro de los carotenoides, la astaxantina ($C_{40}H_{52}O_4$) es el que más comúnmente aparece en los animales marinos (Kamata, 1978).

Recientemente el incremento del cultivo de peces, en particular la trucha y las especies salmonídeas, así como la búsqueda de fuentes naturales de pigmentos a base de compuestos de naturaleza carotenoides para dietas alimentarias, ha generado

un creciente interés, debido principalmente a su inocuidad (Johnson *et al.*, 1980a; Viquez, 1986). En Costa Rica, se produce una gran cantidad de desechos en las plantas procesadoras de camarón a los que no se les da utilidad alguna, siendo no obstante una fuente de pigmentos y proteínas con posibilidades de explotación económica.

Dentro de estas consideraciones la presente investigación pretende mostrar un método de extracción optimizado de la astaxantina presente en los desechos del langostino *Procambarus clarkii* y el camarón rojo *Solenocera agassizii*.

MATERIAL Y METODOS

Recolección de la muestra

Se recolectó el langostino *Procambarus clarkii* en la represa de Cachí, en la provincia de Cartago. Los langostinos se empacaron en bolsas plásticas negras y se almacenaron a -50°C , hasta la preparación para la extracción del pigmento.

Se utilizó el cefalotórax intacto y el exoesqueleto abdominal (que constituyen las partes desechables del langostino) y este material se trituroó en una licuadora para formar una pasta, antes de la extracción del pigmento.

Extracción de la astaxantina

Fue utilizada una relación peso en peso de diez partes de desecho triturado por ocho de agua y dos de aceite de soya. El agua se adicionó al sistema de extracción para incrementar la cantidad de aceite recuperado (Spinelli y Mahnken, 1978). La temperatura inicial de la extracción fue de 70°C y se aumentó en un período de diez minutos hasta 95°C , manteniéndose la mezcla a esta temperatura por un tiempo de quince minutos, en la oscuridad, con agitación constante. Se agregaron 150 ppm del antioxidante BHT.

La solución roja de aceite pigmentado que contenía los carotenoides se recuperó por centrifugación a 3.000 rpm durante quince minutos. Se obtuvo una bifase supernadante del centrifugado, desechándose la hipofase de agua. La concentración de la astaxantina en el aceite fue examinada espectrofotométricamente.

Análisis cuantitativo de astaxantina

Debido al hecho de que la astaxantina y sus ésteres representan más del 90 % de los carote-

noides que posee el exoesqueleto de los desechos del langostino (Meyers y Bligh, 1981) el término astaxantina se utilizó para referirse al total de carotenoides que se encuentran en esos desechos.

El total de astaxantina en el extracto de aceite se calculó midiendo su concentración en el máximo de absorbancia. La cantidad total de astaxantina extraída del desecho se calculó por medio de la fórmula dada por Spinelli y Mahnken (1978):

$$\text{mg de astaxantina} / 100 \text{ g de aceite de soya} = A \times D \times 10^5 / 100 \times d \times S \times E_{1 \text{ cm}}^1 \%$$

donde: A = absorbancia

D = múltiplo de dilución

d = ancho de celda

S = densidad del aceite de soya

$E_{1 \text{ cm}}^1 \%$ = coeficiente de extinción de la astaxantina en aceite de soya.

El coeficiente de extinción se determinó por medio de la ecuación dada por Chen y Meyers (1984):

$$E_{1 \text{ cm}}^1 \% = 7.4428 \times \lambda_{\text{max}} - 3.9311$$

Determinación del máximo de absorción

Un sistema de éter de petróleo-acetona-agua 15:75:10 fue utilizado para una extracción total de los carotenoides presentes en los desechos. Las branquias y órganos internos del cefalotórax se removieron y descartaron, así como la carne de los quelípedos. Para facilitar la extracción de la muestra se descalcificó con ácido acético al 50 %, en atmósfera de nitrógeno y en la oscuridad, siendo ésta filtrada posteriormente para recuperar los restos del exoesqueleto. Una vez lavados estos extractos orgánicos con agua destilada, fueron concentrados a sequedad en un evaporador rotatorio, al vacío y redisueltos en éter de petróleo. Posteriormente, los fragmentos del exoesqueleto se dejaron por una noche a 5°C , en la oscuridad, en la misma mezcla de éter-acetona-agua. Una vez filtrada esta mezcla se concentró y se combinó con la solución de éter de petróleo, a la vez que se adicionó agua; luego la hipofase fue drenada y extraída con éter de petróleo. El éter de petróleo que contenía el total de los carotenoides, se dejó secando durante la noche sobre sulfato de sodio anhidro a 5°C y en la oscuridad. El éter de petróleo fue filtrado a través

CUADRO 1. Análisis cromatográfico de los pigmentos extraídos de los desechos del langostino *Procambarus clarkii* utilizando como sistema de elución éter de petróleo y sílica gel como material de soporte.

FRACCION	VALOR R _f	VALOR R _f ¹	pigm. identificado ¹	% ¹
1	0.98	0.95	éster de astaxantina	49.4
2	0.86	0.84	astaxantina libre	40.3
3	0.66	0.65	astaceno	10.3

1. Valores reportados por Meyers y Blig (1981), al utilizar éter de petróleo y sílica gel.

CUADRO 2. Cantidad de astaxantina extraída de los desechos del langostino *Procambarus clarkii*, utilizando como sistema de elución éter de petróleo y sílica gel como material de soporte.

EXTRACCION	mg astaxantina/100g aceite	
	A	B ¹
1	12.3	19.1
2	11.9	23.2
3	15.2	23.0
4	14.3	23.1
X	13.4	22.1

1. Solo se utilizó el exoesqueleto abdominal y el cefalotórax; se desecharon las vísceras.

de un embudo de porosidad media que contenía una cama de un centímetro de sulfato de sodio anhidro. El solvente se destiló en un evaporador rotatorio a 45°C, y los carotenoides fueron redisoluidos en aceite de soya.

Se realizaron cromatografías de capa fina de los carotenoides extraídos, utilizando éter de petróleo como eluante y sílica gel como material de soporte. Se midieron los R_f de los compuestos separados.

Con un espectrofotómetro UV-visible (Beckman 25), se determinó el máximo de absorbancia del pigmento extraído en aceite de soya, considerando un barrido de 300 a 600 nm.

Extracción de astaxantina de los desechos de camarón

Los desechos del camarón rojo *Solenocera agassizii* fueron obtenidos de COPEMONTECI-

LLOS R.L., se empacaron en bolsas plásticas y se almacenaron a -50°C hasta la extracción.

Cuatro extracciones fueron realizadas siguiendo el procedimiento utilizado con los desechos del *Procambarus clarkii*, y se determinó la máxima cantidad de astaxantina extraída.

RESULTADOS

El máximo de absorción observado para la astaxantina en aceite de soya fue de 485 nm. Al sustituir el valor de λ_{max} en la ecuación dada por Chen y Meyers (1984) para la obtención del coeficiente de extinción de la astaxantina en diferentes

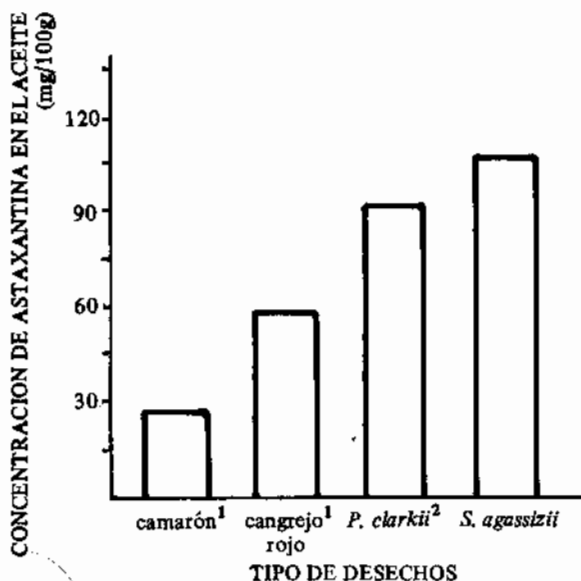


FIGURA 1. Niveles de carotenoides extraídos de diversos desechos de crustáceos.

1. Tomado de Spinelli y Mahnken, 1978.
2. Tomado de Chen y Meyers, 1982.

CUADRO 3. Cantidad de astaxantina extraída de los desechos del camarón rojo *Solenocera agassizii*.

EXTRACCIÓN	mg astaxantina/100g aceite
1	103.3
2	104.5
3	104.9
4	104.0
\bar{X}	104.2

solventes, se obtuvo un valor de $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2.160$ para la astaxantina en aceite de soya.

La densidad del aceite de soya utilizado fue de 0.845 g/ml.

Al realizar cromatografía de capa fina del extracto de astaxantina en éter de petróleo, se obtuvieron tres manchas cuyos valores de Rf aparecen en el Cuadro 1 y son el promedio de cinco mediciones.

En el presente experimento se obtuvo una concentración de 13.4 mg de astaxantina en 100 g de aceite, al utilizar una relación de diez partes de desecho por dos de aceite. Este valor se incrementó a 22.1 mg / 100 g de aceite al lograr subdividir más finamente el exoesqueleto abdominal y el celofórax, desechándose las vísceras (Cuadro 2).

Utilizando la misma metodología se extrajeron 104.2 mg de astaxantina en 100 g de aceite de los desechos del camarón rojo *Solenocera agassizii* (Cuadro 3 y Figura 1).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los picos de absorbancia máxima de los pigmentos extraídos del langostino *Procambarus clarkii*, al utilizar aceite de soya y éter de petróleo y los extraídos de los desechos de camarón fueron idénticos. Esto confirma que se extrajeron carotenoides con cromatóforos similares tanto de los desechos del langostino (por medio de los dos procesos de extracción), como de los desechos de camarón.

Chen y Meyers (1984) reportan que la densidad y la pureza del aceite afectan al máximo de absorción, por lo que el coeficiente de extinción y

la densidad deben ser determinados específicamente para cada aceite utilizado. Así, la densidad del aceite de soya utilizado es menor que la que reportan Chen y Meyers en sus investigaciones.

Meyers y Bligh (1981) indican que el pigmento que se encuentra en mayor proporción en los desechos del *P. clarkii* es el éster de la astaxantina seguido de la astaxantina libre y el astaceno. Las diferencias no significativas encontradas con respecto a los valores de Rf, si se les compara con los reportados por Meyers y Bligh (1981), pueden ser debidas principalmente a diferencias en el grosor del soporte usado en las placas cromatográficas, a diferentes niveles de saturación de la cámara cromatográfica y a la pureza y características del disolvente utilizado.

Por su parte, Nagakawa *et al.* (1971) informan sobre la presencia de doce carotenoides en el exoesqueleto fresco del *P. clarkii*. El hecho de que se encontraran solamente tres compuestos en el presente estudio puede ser debido a que los otros no estuvieron presentes antes de la extracción, o más posiblemente fueron oxidados durante el proceso. Según Meyers y Bligh (1981) otra posibilidad es que en la fracción de astaceno se encuentren múltiples productos oxidados.

Chen y Meyers (1982a) obtuvieron una concentración de 90 mg de astaxantina en 100 g de aceite al utilizar una relación de diez partes de desecho por una de aceite, usando un sistema de extracción de contracorriente. Para este propósito calentaron el langostino molido durante quince minutos a 90°C con agitación continua. Posteriormente el material se pasó a una prensa o decantador continuo hasta conseguir un aceite rico en carotenoides.

La marcada diferencia con los resultados obtenidos en el presente experimento, puede deberse principalmente a diferencias en el método de extracción. Por las limitaciones de nuestro medio no fue posible desarrollar la metodología descrita anteriormente, por lo que fue necesario ingeniar un sistema de extracción que no resultó tan efectivo. Además, no se pudo conseguir el tamaño de partícula de desecho triturando óptimo, ya que según Chen y Meyers (1982a) al disminuir el tamaño de las partículas se incrementa la cantidad de pigmento extraído hasta en un 40 %. Otro factor que puede haber influido en la baja concentración de astaxantina extraída es el uso del antioxidante BHT (Chen y Meyers, 1982b), el cual no es tan efectivo como otros antioxidantes que se consi-

guen en nuestro medio, como por ejemplo el Endox.

Otra posible explicación de esta diferencia en la cantidad de pigmentos encontrados, es que el langostino de zonas templadas presenta una mayor cantidad de pigmentos que el que habita en el trópico. Además, por estudios previos (Morales, 1987) se tienen indicios de que el langostino presente en Costa Rica puede tener una variación estacional en su contenido de pigmentos entre la estación seca y la lluviosa, debido básicamente a variaciones en su dieta.

La cantidad de astaxantina extraída de los desechos del camarón rojo *Solenocera agassizii* es superior a la extraída por otros autores de los desechos del cangrejo rojo, de otros camarones y del *P. clarkii* (Spinelli y Mahnken, 1978; Chen y Meyers, 1982a) al utilizar un proceso de extracción con aceite de soya. Este camarón se empezó a sacar en las aguas de Costa Rica en enero de 1987, a una profundidad mayor a los 500 m y la empresa COPEMONTCILLOS recibió hasta abril de 1988 un promedio de 14.000 Kg/semana, de los cuales el 65 % es desecho.

Los desechos de este camarón presentan la ventaja de que son más blandos que los del *P. clarkii*, por lo que es más fácil triturarlos, obteniéndose un tamaño de partícula muy pequeño que facilita la extracción. Esto, unido a la gran cantidad de pigmento que poseen, hace que los desechos de este camarón tengan un gran potencial para ser usados como fuente de pigmento natural.

La cantidad de astaxantina obtenida de estos desechos se puede aumentar extrayendo la materia prima hasta por tres veces, o bien, usando un proceso como el ideado por Spinelli y Mahnken (1978); no obstante, la concentración obtenida con un solo proceso es suficiente para una futura industrialización de esta materia prima.

Entre los posibles usos que se le puede dar a la astaxantina extraída, está el incorporarla a dietas para salmonídeos, ya que se ha establecido que los carotenoides que son ingeridos con los crustáceos son los responsables de la coloración rosada de la trucha en el medio natural (Saito y Regier, 1971), y que esta coloración es generada en parte o completamente por la astaxantina y sus ésteras (Kamata, 1978). De otro modo, se ha observado que las truchas cuando son alimentadas con dietas comerciales pierden su coloración natural a causa de que estas dietas no contienen pigmentos asimilables por ellas (Kuo et al., 1976b; Johnson et al., 1980b).

Otro uso de la astaxantina presente en los desechos de camarón, que en Costa Rica podría ser muy importante, es su utilización para pigmentar aves y las yemas de sus huevos. A pesar de que los pigmentos no tienen valor nutritivo, en algunos mercados el color amarillo o amarillo-naranja influye psicológicamente sobre el consumidor, dando al ave y al huevo una apariencia más apetitosa.

Según los resultados obtenidos por otros investigadores (Spinelli y Mahnken, 1978; Chen y Meyers, 1982a), una concentración de 60 mg de astaxantina/100 g de aceite es considerada económicamente factible para ser incorporada a dietas de salmónidos. Esto pone de manifiesto la importancia de los resultados aquí obtenidos, ya que con una metodología sencilla se pueden obtener concentraciones mayores de los desechos del camarón rojo *Solenocera agassizii*.

Dentro de esta perspectiva, los desechos de camarón se presentan como una alternativa económica con potencial para el mejor aprovechamiento de este recurso marino. No obstante, es necesario realizar un estudio más exhaustivo sobre los parámetros que mejor definen la optimización del proceso de extracción y la viabilidad económica del proyecto.

LITERATURA CITADA

- CHEN, H. y S. MEYERS 1982a. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *J. Food Sci.* 47 (3): 892-896.
- CHEN, H. Y S. MEYERS 1982b. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 30 (3): 469-473.
- CHEN, H. y S. MEYERS 1984. A rapid quantitative method for determination of astaxanthin pigment concentration in oil extracts. *JAOCs*. 61 (6): 1.045-1.047.
- JOHNSON, E., T. VILLA y M. LEWIS 1980a. *Phaffia rhodozima* as astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20: 123-134.
- JOHNSON, E., M. LEWIS y R. GRAN 1980b. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozima*. *Poultry Science* 59 (8): 1.777-1.782.
- KAMATA, T. 1978. Astaxanthin. Tesis University of Rhode Island, USA, 143 pp.
- KATAYAMA, T., M. SHIMAYA, M. SAMECHIMA y C. CHICHESTER 1973. The biosynthesis of astaxanthin XI. The carotenoids in the lobster *Paralithorus japonicus*. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 39 (2): 215-220.
- KUO, H., T. LEE, C. CHICHESTER y K. SIMPSON 1976a. The carotenoids in the deep sea red crab, *Gerion quinqueatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 387-390.
- KUO, H., T. LEE, T. KAMATA y K. SIMPSON 1976b. Red crab processing waste as a carotenoid source of rainbow trout. *Alimenta* 15 (47): 2-6.
- MEYERS, S. y D. BLIGH 1981. Characterization of astaxanthin pigments from the heat-processed crawfish waste. *J. Agric. Food Chem.* 29 (3): 505-508.
- MORALES, D. 1987. Utilización de la astaxantina extraída de desechos de crustáceos en la pigmentación de la yema de huevo. Tesis de Biología Tropical, Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas, Heredia, Costa Rica. 90 pp.
- NAGAKAWA, H., M. KAYAMA y S. ASAKAWA 1971. Studies on carotenoprotein in aquatic animals I. Distribution of carotenoproteins in exoskeleton of crawfish (*Procambarus clarkii*). *J. Fac. Fish Anim., Hiroshima Univ.* 11 (2): 61-62.
- SAITO, R. y L. REGIER 1971. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean wastes. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28: 509-512.
- SPINELLI, J. y S. MAHNKEN 1978. Carotenoid deposition in penreared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab. *Aquaculture* 13: 213-223.
- TANAKA, Y., H. MATSUGUCHI, T. KATAYAMA, K. SIMPSON y C. CHICHESTER 1976. The biosynthesis of astaxanthin XVI. The carotenoids in crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 391-393.
- VIQUEZ, E. 1986. Utilización de un éster de la bixina del achiote (*Bixa orellana*) como pigmentante de la yema de huevo. Tesis Ing. Agr., Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía. 61 pp.