

Aspectos Analíticos sobre
la Determinación de
Compuestos Carotenoides
en Microalgas mediante
Cromatografía de Líquidos
con Detector de Diodos

S. García

R. M. Pérez



Aspectos Analíticos sobre
la Determinación de
Compuestos Carotenoides
en Microalgas mediante
Cromatografía de Líquidos
con Detector de Diodos

S. García

R. M. Pérez

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M -26385-2011

ISSN: 1135 - 9420

NIPO: 721-12-007-3

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

CARETENOIDS; HYDROCARBONS; DETECTION; ALGAE;
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY;

Aspectos Analíticos sobre la Determinación de Compuestos Carotenoides en Microalgas mediante Cromatografía de Líquidos con Detector de Diodos

García, S.; Pérez, R. M.

21 pp. 19 ref. 3 tablas

Resumen:

Se presenta un estudio preliminar sobre revisión bibliográfica para la determinación de compuestos carotenoides en muestras de microalgas mediante HPLC con detector de diodos. El principal objetivo ha sido hacer una recopilación basada en estudios previos de los principales aspectos relacionados con la metodología analítica empleada en la determinación de este tipo de compuestos.

El trabajo se estructuró según se indica e incidiendo en las principales dificultades analíticas :

- Obtención y disponibilidad comercial de disoluciones patrón.
- Etapa de tratamiento de la muestra.
- Análisis cromatográfico.

Analytical Issues on the Determination of Carotenoids in Microalgae by Liquid Chromatography with Diode Array Detector

García, S.; Pérez, R. M.

21 pp. 19 ref. 3 tables

Abstract:

A preliminary study of literature review on the determination of carotenoids in microalgal samples by HPLC with diode array detector is presented. Main objective has been focused to compile data from literature and based on the main aspects of the analytical methodology used in the determination of these compounds.

The work is structured as follows and affecting major analytical difficulties:

- Procurement and commercial availability of standard solutions.
- Stage of sample treatment.
- Chromatographic analysis.

INDICE

	Pág.
1 – INTRODUCCION	6
2 – DISOLUCIONES PATRON	9
3 –TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	12
4 – ANALISIS CROMATOGRAFICO	17
5 – CONCLUSIONES	18
6 – BIBLIOGRAFIA	21

1 - INTRODUCCION

En la actualidad, la biotecnología de algas tiene numerosas aplicaciones porque permiten obtener diversas familias de compuestos que presentan gran interés en distintos campos, como:

- Obtención de alimentos para consumo animal y humano por sus altos niveles de proteínas (60-70 %).
- Desarrollar aceites esenciales ($\omega 3$ y $\omega 6$).
- Desarrollo de colorantes naturales como la astaxantina.
- Obtención de hidrocoloides, como alginatos, carragenatos y agares.
- Desarrollo cosmético para el cuidado de piel y cabello.
- Obtención de bio-fertilizantes.
- Desarrollo de biodiésel.
- Tratamiento de aguas residuales.

Así, el interés en la explotación de microalgas reside en que producen una gran variedad de metabolitos que son esenciales para el ser humano:

- Proteínas.
- Vitaminas.
- Minerales.
- Encimas.
- Ácidos grasos.
- Xantofilas.
- Carotenos.

En general, son aquellos relacionados con la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas y proteínas), compuestos lipídicos (ácidos grasos poliinsaturados, glicolípidos) así como otros compuestos relacionados con la pared celular.

De estos compuestos, los pigmentos pueden clasificarse según su composición química según:

- Colorantes flavonoides: flavonol, flavonona, calcona, autocianina
- Colorantes carotenoides: caroteno, xantofila.
- Colorantes tipo quinona: antroquinona, naftoquinona.
- Derivados de indol

- Derivados delfinidina
- Derivados dihidropilano
- Grupo betaleína
- Grupo xantonas
- Grupo tanino
- Grupo clorofila

Entre los más estudiados, para la extracción a partir de microalgas se encuentran los carotenoides, los cuales son precursores de vitaminas y tienen actividad antioxidante, con propiedades en prevención de ciertos tipos de cáncer y envejecimiento celular. Y de ellos, la astaxantina es el carotenoide que más habitualmente se encuentra en animales acuáticos y marinos. Además de su función como colorante, está considerada esencial en el proceso de crecimiento.

La luteína también tiene interés como complemento en la dieta humana. Algunos estudios científicos han demostrado que su presencia como suplemento alimenticio ralentiza la degeneración macular senil, es decir, favorece la tardanza en la aparición de cataratas y afecciones visuales similares.

La luteína, además de incorporarse a la dieta humana, puede ser utilizada como aditivo en los piensos animales, de forma que las características del pigmento pasen a la cadena alimenticia, como por ejemplo en los huevos de las gallinas. De hecho, la luteína ya se utiliza en la industria ganadera para la coloración de las yemas.

Otros carotenos que son habitualmente caracterizados en microalgas incluyen:

- Neoxantina
- Violaxantina
- β caroteno
- Cantaxantina
- Astaxantina éster

Junto a los carotenoides, las vitaminas A y E forman micronutrientes solubles en grasas que tienen un papel muy importante en la salud del ser humano. Los carotenos, especialmente β caroteno, poseen actividad provitamina A; la vitamina A es necesaria para la visión normal, diferenciación celular, crecimiento y reproducción. La vitamina E es conocida por sus propiedades antioxidantes y por reforzar el sistema inmunológico.

En relación al análisis de estos compuestos, se analizan mediante HPLC/UV y la vitamina E mediante HPLC/FL. Como toda técnica analítica, el análisis mediante cromatografía de líquidos tiene ciertas fuentes de error asociadas, las cuales son críticas para garantizar el resultado analítico final ⁽¹⁾. Las principales dificultades se encuentran en:

- Incompatibilidad del disolvente de inyección y la fase móvil.
- Cuantificación de picos sin resolver por co-elución de compuestos.
- Baja recuperación de la columna de HPLC.
- Impureza e inestabilidad de los patrones de carotenoides.
- Identificación errónea.
- Errores en la preparación de las disoluciones de calibrado.

En cuanto al disolvente de inyección, éste debe ser capaz de disolver los compuestos y ser también compatible con la fase móvil. En este sentido, la acetona ha dado buenos resultados como disolvente de inyección ⁽¹⁾.

Respecto a la coelución de compuestos, existen carotenoides que presentan similar comportamiento cromatográfico e idénticos espectros. En estos casos, la medida de ambos parámetros, tiempos de retención y espectros en ultravioleta, no puede ser concluyente como método de identificación y origina una importante limitación de la aplicación de HPLC con detector de diodos. Asimismo, la selección de la columna cromatográfica es también crítica para una mejor eficacia en la separación de componentes de este tipo de mezclas. Así, se ha comprobado que las de C18 no resuelven bien todos los picos y en la mayor parte de los estudios realizados en los últimos años se han utilizado columnas de C30.

Otro aspecto también importante en el análisis de estos compuestos es que la cuantificación de carotenoides se hace difícil por la amplia variedad de pureza de los patrones comerciales, por el limitado número de patrones disponibles comercialmente y la inestabilidad de los mismos.

Más dificultades inherentes al análisis de carotenoides que pueden contribuir a esta falta de fiabilidad, residen en el gran número de compuestos químicamente muy parecidos y su tendencia a la isomerización y degradación por oxidación durante el análisis, pues son sensibles a la luz, temperatura, oxígeno y superficies activas. Todo ello implica la necesidad de trabajar con precauciones muy particulares como operar en condiciones de luz roja, acabar el análisis en el menor tiempo posible,

condiciones de trabajo en ausencia de oxígeno, evitar altas temperaturas y contacto con ácidos, utilizar disolventes de alta pureza y proceder a sucesivos ciclos de extracción para maximizar eficiencia de recuperación ⁽²⁾.

Los objetivos de este informe se centran en hacer una revisión de los trabajos publicados en la última década sobre la metodología analítica empleada en la determinación de compuestos carotenoides y su aplicación a muestras de microalgas. Para ello, se han abordado principalmente cada una de las etapas involucradas en el análisis de esta familia de compuestos, junto con los aspectos más críticos asociados. En particular, el trabajo se ha estructurado conforme a la información bibliográfica recopilada en cuanto a la obtención de disoluciones patrón, extracción de las muestras y análisis cromatográfico mediante HPLC con detector de diodos, haciendo hincapié en las principales dificultades involucradas.

2 - DISOLUCIONES PATRON

Una dificultad importante en el análisis de HPLC de carotenoides es la obtención de disoluciones de patrones estándar, ya que son altamente insaturados y propensos a la isomerización y oxidación. La pureza de los patrones debe ser verificada y los más impuros, re-purificados. Por otra parte, suelen ser caros y puede que no estén disponibles comercialmente, por lo que parece muy interesante que el laboratorio pueda prepararse sus propios patrones. El método propuesto por M. Kimura y col. ⁽³⁾ se basa en realizar una extracción inicial de 50-60 g de escarola con acetona en frío y posteriormente en éter de petróleo, para hacer pasar por columna de MgO:Hyflosupercel (1:1) e ir haciendo eluir los componentes selectivamente por adición de acetona en éter de petróleo; en particular, clorofilas, neoxantina, luteína, violaxantina, lactucaxantina y β -caroteno.

No obstante, la preparación de patrones de carotenos es en general muy laboriosa y delicada, y está condicionada a un número limitado de patrones. De ahí que normalmente los trabajos experimentales suelen desarrollarse mediante adquisición cuando existe disponibilidad comercial. Una recopilación bibliográfica sobre las casas comerciales que han suministrado patrones de estos compuestos a diversos autores se detalla en la tabla 1.

En relación a la estabilidad de las disoluciones de patrón preparadas, MG Dias et al. ⁽⁶⁾ realizaron una estimación de las principales fuentes de incertidumbre en el análisis de α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina.

En particular, investigaron las contribuciones por precisión intermedia y repetibilidad, sensibilidad, sesgo y la estabilidad de las disoluciones estándar y de las muestras. Como cabe esperar, la contribución de incertidumbre más elevada correspondió a las medidas sobre precisión intermedia, mientras que no encontraron diferencias significativas en la respuesta del detector para las disoluciones de calibrado preparadas tras 24 horas desde su preparación y almacenamiento bajo refrigeración a 4° C.

Otros autores ⁽⁴⁾ prepararon las disoluciones patrón de astaxantina, β -apocaroteno-8-al y trans- β -caroteno mediante dilución en su disolvente respectivo, adición de hidroxitolueno butilado (0.1%) y almacenamiento inmediato a -20°C. Un tratamiento más particular fue aplicado para los compuestos trans-zeaxantina y trans-lycopeno, los cuales fueron secados bajo corriente de nitrógeno antes de su almacenamiento y fueron re-disueltos en el disolvente correspondiente justo antes de su uso.

Caroteno	Casa comercial	Preparación disolución	Ref
All-trans-luteína, α caroteno, β caroteno, β criptoxantina, zeaxantina. Neoxantina y violaxantina son obtenidos en laboratorio	SIGMA		3 5
Zeaxantina Astaxantina Luteína, β caroteno	DSM Inc. Heerlen Sigma Aldrich CaroteNature		4 6
Astaxantina (98%) All-trans- β -caroteno α -tocoferol	Sigma Aldrich Fluka	MeOH/Hx/DCM (50/25/25) 1 mg.mL ⁻¹	5 7
α caroteno, β caroteno, licopeno, luteína, β -apo-8 caroteno, zeaxantina, β criptoxantina	Sigma Aldrich Fluka Carl Roth		6 8
All-trans-astaxantina	BASF		7 9
Sol. Stock de Aloxantina, anteraxantina, cantaxantina, diadinoxantina, fucoxantina, luteína, neoxantina, perodicina, violaxantina, zeaxantina Clorofila A y B, β caroteno, astaxantina	DHI Water & Environ Sigma	En etanol. Almacenadas a -80°C	8 10
Zeaxantina, violaxantina, neoxantina, luteína ^{5,6} epóxido, anterixantina, β -criptoxantina, equinenona, 13z β -caroteno, 9z β -caroteno	CaroteNature	Disueltos en THF y diluidos en acetona a 100, 200 y 2500 μ g.mL ⁻¹ . Sol. almacenadas a -20° C bajo N ₂ .	9 11
β caroteno, zeaxantina, luteína, astaxantina, criptoxantina	Sigma Chemical Co		12

Tabla 1 – Relación de casas comerciales que suministran sustancias patrón de carotenoides, según distintos trabajos.

3 - TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La preparación de muestra es una etapa crucial en cualquier metodología analítica aplicada a cualquier campo. Está muy influenciada por las propiedades químicas o físicas de los analitos investigados y por las matrices de las muestras. El principal objetivo es concentrar el analito, separar interferencias de la matriz y preparar el analito en la manera más adecuada para el posterior análisis cromatográfico.

La tabla 2 incluye una recopilación de los métodos más habitualmente utilizados en la extracción de carotenoides en muestras de microalgas. Principalmente, se han utilizado técnicas de extracción mediante ultrasonidos, acelerada con disolventes y, la más atractiva por su potencial en obtención y desarrollo biotecnológico, con fluidos supercríticos, dada las características que posee para utilizar disolventes del tipo GRAS (Generally Regarding As Safe) y la posibilidad de aplicarlo a escala industrial.

A nivel analítico, los parámetros clave en la selección del método más adecuado de extracción deben incluir:

- Peso de la alícuota de muestra
- Técnica aplicada
- Disolventes utilizados

Respecto al peso de la alícuota de muestra a analizar, actualmente los métodos de tratamiento de muestras están optimizados para utilizar cantidades de muestra muy reducidas, junto con volúmenes de disolvente y tiempos de extracción también reducidos. El objetivo es minimizar la manipulación de la muestra y simplificar el trabajo implícito en los métodos desarrollados. Todo ello además implica una reducción de los costes asociados al consumo de disolvente y tiempo necesarios. En general, las masas más adecuadas oscilan entre 0.1 y 1 g de muestra.

La selección del disolvente a utilizar es crítica según la composición de la muestra que debe ser analizada. Los carotenoides atendiendo a su composición química pueden dividirse en carotenos (compuestos hidrocarbonatos) y xantofilas (oxicarotenos, con oxígeno en su estructura, normalmente en los anillos terminales). Debido a ello, los carotenos son solubles en disolventes apolares y su grado de solubilidad dependerá de los grupos sustituyentes en su molécula (-OH, C=O,...). Los carotenos son muy solubles en éter de petróleo y hexano, mientras

que las xantofilas se disuelven mejor en etanol y metanol. Entre los disolventes considerados como sistemas eficientes para la extracción de carotenoides en cepas de *Dunaliella salina*, se encuentran las mezclas acetona/metanol y acetona/agua con similar polaridad frente a la mezcla tetrahidrofurano/etanol. La mezcla acetona/metanol en proporción 90/10 permitió extraer los mayores contenidos de carotenoides, conforme a la reducción de la proporción del solvente más polar. La estructura del tetrahidrofurano por ser cíclica puede provocar, sin embargo, un mayor impedimento estérico para establecer posibles interacciones electrostáticas con las estructuras de carotenoides y por tanto menor eficacia de recuperación, pese a sus propiedades de disolvente menos polar ⁽¹³⁾.

En otro trabajo ⁽¹⁴⁾, se investigó la estabilidad del extracto de pigmentos por efecto de la influencia de dos disolventes muy habitualmente utilizados, metanol y acetona. Los resultados obtenidos indicaron en general que los pigmentos extraídos en acetona (90%) fueron estables durante 18 horas, mientras que los correspondientes en metanol indicaron significativas degradaciones y por tanto menor estabilidad. Respecto a la eficiencia de extracción, ésta fue muy variable dependiendo de la especie de alga, si bien los extractos en metanol fueron los más variables, fundamentalmente debido al mayor nivel de degradaciones producidas

La adición de hidroxitolueno butilado a disolventes de extracción como tetrahidrofurano o hexano se efectúa como agente antioxidante ⁽¹⁵⁾ debido a la facilidad que tienen los carotenoides a su oxidación y degradación. De ahí que otra característica común al proceso de extracción de estos compuestos para evitar éstas últimas sea la agitación o reposo en la oscuridad o envolviendo los recipientes en papel de aluminio. La extracción con disolventes asimismo requiere la realización de sucesivos lavados a ambas fases para garantizar y mejorar la recuperación; así, la fase orgánica se debe lavar sucesivamente con agua para retirar componentes solubles acuosos y el agua recogida se debe lavar varias veces con el disolvente orgánico inmiscible para mejorar eficiencia de extracción. Un indicativo de conseguir la máxima recuperación es la ausencia de color en el residuo acuoso final tras repetir varias veces la extracción ⁽¹⁵⁾.

El tratamiento de saponificación tiene el objetivo de retirar clorofilas y lípidos no deseados, así como hidrolizar ésteres carotenos para simplificar la separación cromatográfica, identificación y cuantificación de los compuestos. Sin embargo, pueden formarse artefactos y producirse degradaciones; α caroteno, β caroteno, y caroteno y β criptoxantina pueden resistir la saponificación, mientras que luteína,

violaxantina y otros dihidroxi y trihidroxi carotenoides pueden sufrir pérdidas. La saponificación de la muestra de carotenoides disueltos en éter de petróleo puede ser suficiente con un volumen igual de KOH (10%) durante una noche a temperatura ambiente y preferiblemente con la adición de hidroxitolueno butilado como antioxidante. Hay que tener mucha precaución con el lavado acuoso de los extractos, pues el agua fácilmente puede producir pérdidas de xantofilas ⁽¹⁾. Sin embargo, el tratamiento de saponificación también puede producir efectos adversos según el tipo de compuesto que quiera recuperarse; así, M Vilasoa-Martínez et al. ⁽⁷⁾ observaron que aplicando saponificación durante la optimización del procedimiento de extracción no se conseguía la extracción de carotenoides como la astaxantina y derivados. Debido a ello, optaron por un único tratamiento de extracción con acetona como el procedimiento más adecuado para analizar las muestras.

La técnica de ultrasonidos se utiliza a menudo en la extracción de sustancias de bajo peso molecular y compuestos bioactivos a partir de plantas. La mejora del proceso de extracción utilizando ultrasonidos está relacionada con la destrucción de la pared celular, reducción del tamaño de partícula y mejora de la transferencia a través de la pared celular debido al colapso de burbujas producido durante la cavitación ⁽¹⁶⁾.

Los carotenoides a menudo están ligados a proteínas, en forma de complejos conocidos como caroteno-proteínas. Procedimientos como el calentamiento o el tratamiento con disolventes hidrosolubles parecen favorecer la separación de carotenoides de estos complejos ⁽¹⁷⁾. Durante la preparación de la muestra se observó que una vez la astaxantina se había separado de los complejos, el color marrón cambiaba al rojo, permaneciendo uniforme durante el proceso de secado. El proceso de liofilización también puede romper la matriz proteínica de las membranas, creando accesibilidad para el disolvente de extracción ⁽¹⁴⁾

La temperatura y la presión tienen una influencia significativa y positiva en el proceso de extracción con fluidos supercríticos de carotenoides y clorofilas. Así, según la temperatura aplicada, la presión óptima para alcanzar la extracción más efectiva es variable: para cada temperatura, un incremento en la presión de operación tiene dos efectos opuestos, un incremento en la capacidad disolvente de CO₂ y un decrecimiento en su difusividad.

La extracción acelerada con disolventes permite conseguir en general elevadas recuperaciones de analitos con mínimos volúmenes de disolvente y cortos tiempos de extracción. M. Herrero et al. ⁽¹⁸⁾ realizaron un diseño experimental para optimizar la extracción de antioxidantes de la microalga *Spirulina platensis* utilizando extracción acelerada con disolventes. De los resultados deducidos encontraron que los extractos de etanol poseían una buena actividad anti-oxidante, ligeramente peor que la obtenida con hexano y éter de petróleo. Esta propiedad podía ser utilizada como una ventaja adicional ya que el etanol, a diferencia del hexano y éter de petróleo es considerado como disolvente seguro, pudiendo utilizarse en la industria de comida. Además los rendimientos obtenidos con etanol fueron los más altos proporcionando una buena eficiencia del proceso de extracción.

Un estudio comparativo entre US y SFE ⁽¹⁶⁾, mostró que la extracción de carotenoides y clorofila fue máxima cuando se utilizó US con dimetilformamida como disolvente de extracción. El metanol como disolvente en US condujo a una extracción de alrededor del 50% y similar recuperación de clorofila comparada con la conseguida con dimetilformamida. La extracción con fluidos supercríticos recuperó alrededor del 50% de la extracción con dimetilformamida y asimismo se obtuvieron muy bajos rendimientos de clorofila. Estos resultados apuntaron a la mayor selectividad de la técnica de fluidos supercríticos para recuperar carotenoides frente a clorofilas, pigmentos más polares, y por tanto facilitar la separación de ambos componentes.

Otro detallado estudio realizado por J.A. Mendiola ⁽¹⁹⁾, que supuso la elaboración de su tesis doctoral, estuvo centrado en la extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. En el mismo, queda constancia del alto potencial de la SFE en la extracción de sustancias con actividad funcional a partir de microalgas. La extracción con fluidos supercríticos presenta ventajas importantes para su utilización en la industria alimenticia, opera en ausencia de oxígeno empleando CO₂ como agente extractante y no un disolvente orgánico. Además, se evitan los problemas asociados a la eliminación de disolventes empleando altas temperaturas, como, por ejemplo, oxidaciones no deseadas y reducción de la actividad funcional de los extractos.

Carotenoide	Tratamiento muestra	Peso aliq (g)	Disolvente	Disolvente final	Ref.
All-trans luteína, α caroteno, β caroteno, β criptoxantina, zeaxantina. Neoxantina y violaxantina	Extracción+saponificación	1	1 - Hx/EtOH/Acet/Tol (10/6/7/7), 30 mL 2 - + KOH (40%), 2 mL 3 - + Hx, 30 mL	MeOH/DCM (50/50)	3 5
Vitamina E, β caroteno, astaxantina	Extracción	1	Acetona (5 mL)	MeOH/Hx/DCM (50/25/25)	5 7
Diadinoxantina, fucoxantina, luteína, neoxantina, perodicina, violaxantina, zeaxantina Clorofila A y B, β caroteno, astaxantina	Ultrasonidos	No especificado	1 - + MeOH/acetona (1:1) 2 - 15 m'		10
Luteína, α y β caroteno, criptoxantina, licopeno	Extracción	1	1 - THF (10 mL) + BHT (0.1%) 2 - Cloroformo (30 mL)+agua (20 mL)	AcN/MeOH/Cloroformo (35/35/30)	17
β caroteno, zeaxantina, criptoxantina, luteína, astaxantina	Extracción+saponificación	1	1 - THF (10 mL)+ BHT /CO ₃ Mg (1/10), 30 mg 2 - + KOH/MeOH (10%), 25 mL 3 - Sol org lavado con H ₂ O		12
Carotenoides totales	Ultrasonidos	0.105	1 - MeOH ó dimetilformamida, 5 mL 2 -US (3'), 24 h reposo (5 ciclos) P=400 bar, T ^a =60°C	MeOH, 5 mL	16
	Fluidos supercríticos	0.1	1- Extrac estática, 15' 2 - Extrac. Dinámica, 180' MeOH, 2 ciclos		
α caroteno, β caroteno:13-cis, all-trans,15-cis, 9-cis,	Fluidos supercríticos	1 g	P=443 bar, T ^a =9.8 °C 1- Extrac estática, 10' 2 - Extrac. Dinámica, 90'	DCM	13
	Ultrasonidos	0.25 g	3.8 mL acetona, 1'. Filtrado		
No especificado	Acelerada con disolventes	2.5 g	P= 1500 psi, T ^a =170 °C Extrac., 15'		18

Tabla 2 – Procedimientos de extracción utilizados para la preparación de muestra en análisis de microalgas.

4 - ANALISIS CROMATOGRAFICO

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) parece ser el método de referencia para analizar carotenoides y tocoferol. La resolución de la separación de los diferentes componentes de la mezcla a analizar depende fundamentalmente de las propiedades de la fase estacionaria, de la composición de la fase móvil y de la temperatura de la columna.

Los análisis de carotenoides normalmente se han realizado mediante HPLC en fase reversa debido a su mejor eficiencia de separación. La mayor parte de los análisis se han realizado con columnas de C18, originando perfiles inadecuados de carotenoides o pérdida de resolución de isómeros geométricos. Utilizando columnas de C18 se han podido separar neoxantina, violaxantina, luteína, β -caroteno, astaxantina, cantaxantina y astaxantina éster, si bien las columnas de C30 pueden proporcionar mejor resolución para las mezclas más complejas ^(5, 10, 11)

La elección de la fase móvil es también extremadamente importante. La adición de tampón reduce posibles pérdidas o degradaciones minimizando los efectos de acidez de los grupos libres de silanol que están presentes en la fase estacionaria de sílice derivatizada ^(5, 10)

En relación al detector utilizado, el que más a menudo se utiliza con el sistema cromatográfico es el de diodos, que es capaz de registrar un rango específico de espectros y permite obtener cromatogramas simultáneos a determinadas longitudes de onda para algunos componentes y la identificación de pico según el perfil espectral del compuesto separado.

M.A. van Leeuwe et al.⁽¹⁴⁾ apuntan a la baja estabilidad de los pigmentos en metanol, indicando que en este disolvente se promueve la formación de alómeros de clorofila mientras que la acetona proporciona un medio más estable. No obstante, la eficiencia de extracción en este disolvente es muy variable según la especie de microalga. También encontraron que el secado por congelación rompía la matriz de proteínas de las membranas, creando mayor accesibilidad para el disolvente de extracción incluso en el caso de algas recalcitrantes.

Mb Toomey et al.⁽⁶⁾ para mejorar la resolución de picos y reducir el ensanchamiento del pico de la astaxantina, probaron la adición de ácido fosfórico a la composición de la fase móvil inicial con MeOH/AcN/DCM (44/44/12); sin embargo, no obtuvieron

diferencias. Para conseguir la separación de la astaxantina de la luteína incrementaron la composición de metanol y acetonitrilo en 48 % los primeros 11 minutos, para rebajar dicha composición a 42/23/35 (MeOH/AcN/DCM)

5 – CONCLUSIONES

En relación a la disponibilidad comercial de disoluciones de calibrado para llevar a cabo el análisis de compuestos carotenoides en microalgas, existe una limitación respecto al amplio grupo y gran variabilidad que componen este tipo de compuestos.

Existe una estabilidad relativa de las disoluciones de calibrado y según el compuesto incluido en la misma. En general, es recomendable la preparación y almacenamiento de las disoluciones en un tiempo no superior a días y siempre en frío, por debajo de 4°C, incluso a -20°C.

Como disolventes de extracción, las mezclas acetona/metanol (90/10) han llevado a la obtención de buenos resultados en cuanto a solubilización de la muestra y estabilidad de las disoluciones preparadas.

La etapa de saponificación para eliminar clorofilas y compuestos lipídicos no siempre es recomendable porque producen pérdidas o degradaciones. Análogamente, los lavados reiterados pueden producir pérdidas de compuestos xantofilas.

En cuanto al tipo de extracción, la técnica de ultrasonidos es asequible y conduce a buenos resultados. Sin embargo, el mayor potencial actualmente se encuentra en la utilización de la extracción con fluidos supercríticos porque permitir el uso de disolventes no orgánicos, con posibilidad de aplicación a escala industrial y en el sector alimentario.

Finalmente, respecto al análisis de carotenoides se recomienda el uso de columnas de C30 por presentar mayor resolución. A la fase móvil es conveniente añadir tampón para reducir problemas por pérdidas y degradaciones.

Columna	Caudal, vol. Final (μL)	F. móvil	Programa	Detección (nm)	Ref.																																								
Spherisorb ODS 2 (250*4.6 mm). pre-columna C18 (10*4.3mm)	1 mL.min ⁻¹ , 50 μL	AcN:MeOH:cloroformo (45:45:10)+0.05% AcNH ₄ en MeOH+0.1% trietilamina en AcN. 24'	Acetona (5 mL)	450 nm: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, licopeno, β y α caroteno.	10 15																																								
YMC C30 (Waters, 250*4.6 mm, 5 μm), 30 °C	1 mL.min ⁻¹ , 20 μL	A-MeOH:AcN:agua (84:14:2) B - cloruro de metileno	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>A</td> <td>B</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0'</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>14'</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>25'</td> <td>75</td> <td>25</td> <td></td> </tr> <tr> <td>30'</td> <td>75</td> <td>25</td> <td></td> </tr> <tr> <td>35'</td> <td>74</td> <td>26</td> <td></td> </tr> <tr> <td>50'</td> <td>45</td> <td>55</td> <td></td> </tr> <tr> <td>55'</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		A	B		0'	100			14'	100			25'	75	25		30'	75	25		35'	74	26		50'	45	55		55'	100			450 nm y resuelven 32 carotenoides en 49'	3 5								
	A	B																																											
0'	100																																												
14'	100																																												
25'	75	25																																											
30'	75	25																																											
35'	74	26																																											
50'	45	55																																											
55'	100																																												
DeltaPak C18 (Waters, 150*3.9 mm, 5 μm), 28 °C	0.8 mL.min ⁻¹ , 50 μL	A- MeOH:agua:acetato amónico (85:15, 0.5 M) B - Acetonitrilo:agua (90:10) C - Acetato de etilo	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>0'</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2'</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>7'</td> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>17'</td> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>21'</td> <td>0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>28.5'</td> <td>0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>29.5'</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30'</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>35'</td> <td>60</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </table>		A	B	C	0'	60	40	0	2'	0	100	0	7'	0	80	20	17'	0	50	50	21'	0	30	70	28.5'	0	30	70	29.5'	0	100	0	30'	60	40	0	35'	60	0	0	440 - 750 nm. Resuelven β -caroteno, cantaxantina, anteraxantina, prasinoxantina, diadinoxantina, peridinina, luteína, zeaxantina, violaxantina, neoxantina, diatoxantina, astaxantina, fucoxantina, alloxantina en 68 min. Registran espectro desde 200 a 800 nm	16 14
	A	B	C																																										
0'	60	40	0																																										
2'	0	100	0																																										
7'	0	80	20																																										
17'	0	50	50																																										
21'	0	30	70																																										
28.5'	0	30	70																																										
29.5'	0	100	0																																										
30'	60	40	0																																										
35'	60	0	0																																										
YMC carotenoids C18 (Waters 250*4.6 mm, 5 μm), 30°C	1.2 mL.min ⁻¹ , 50 μL	A - MeOH B - AcN C - DCM	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>0'</td> <td>44</td> <td>44</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>11'</td> <td>44</td> <td>44</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>21'</td> <td>42</td> <td>23</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>31'</td> <td>44</td> <td>44</td> <td>12</td> </tr> </table>		A	B	C	0'	44	44	12	11'	44	44	12	21'	42	23	35	31'	44	44	12		4 6																				
	A	B	C																																										
0'	44	44	12																																										
11'	44	44	12																																										
21'	42	23	35																																										
31'	44	44	12																																										
chromosil C18 (250*4.6 mm, 5 μm)	1 mL.min ⁻¹	A -:AcN/MeOH (80:10)			11 12																																								
Teknokroma Tracer Extrasil ODS2 C30 (250*4.6 mm, 5 μm), 30 °C	20 μL	A - MeOH B - AcN C - Hx:DCM (50:50)	<table border="0"> <tr> <td>Caudal</td> <td>A</td> <td>B</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>0'</td> <td>0.8 15</td> <td>75</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>7'</td> <td>0.8 45</td> <td>45</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>16'</td> <td>1.0 15</td> <td>40</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>20'</td> <td>1.2 15</td> <td>40</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>21'</td> <td>2.0 15</td> <td>75</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>45'</td> <td>2.0 15</td> <td>75</td> <td>10</td> </tr> </table>	Caudal	A	B	C	0'	0.8 15	75	10	7'	0.8 45	45	10	16'	1.0 15	40	45	20'	1.2 15	40	45	21'	2.0 15	75	10	45'	2.0 15	75	10	450 nm, astaxantina y derivados y β -caroteno, y 215 nm, vitamina E. Detección fluorescencia, vitamina E a 280/331.	5 7												
Caudal	A	B	C																																										
0'	0.8 15	75	10																																										
7'	0.8 45	45	10																																										
16'	1.0 15	40	45																																										
20'	1.2 15	40	45																																										
21'	2.0 15	75	10																																										
45'	2.0 15	75	10																																										

Columna	Caudal, vol. Final (μL)	F. móvil	Programa	Detección (nm)	Ref.
Spherisorb ODS2 PEEK (Waters, 100*4.6 mm, 5 μm), C18 (Vydac, 250*4.6 mm, 5 μm)	1.5 mL.min ⁻¹ , 50 μL	A - AcN/ MeOH + acetato amónico DCM 0.05 M (75/20/5), con 0.1% butilhidroxitolueno y 0.05% trietilamina.			6 8
ProntoSil C30 (250*4.6 mm, 3 μm), 30 °C pre-columna con cartucho C18 (10*2.0mm)	1 mL.min ⁻¹ , 20 μL	A - MeOH: MTBE:agua (83:15:2) B - MeOH: MTBE:agua (8:90:2)	A B 0' 100 20' 100 160' 40 60	a 455 nm. Analizan 3 isómeros de astaxantina, luteína y cantaxantina y 35 derivados éster de ácidos de 16 y 18 C, entre monoéster y diéster.	7 9
Ultracarb C30 (Phenomenex, 250*4.6 mm, 5 μm), Tª amb,	1 mL.min ⁻¹ , 50 μL	A - MeOH:agua:acet. amónico (90:8:2) B - MeOH:MTBE:acet. amónico (30:68:2)	A B 0' 95 5 15' 90 10 25' 90 10 35' 85 15 40' 60 40 42' 55 45 62' 55 45 63' 0 100 68' 0 100		8 10
Nucleosil RPC18 (150*4.6 mm, 3 μm), Vydac TP54 RPC18 (250*4.6 mm, 5 μm) Tª amb,	2 mL.min ⁻¹ , 50 μL	A - AcN/Cl ₂ CH ₂ /MeOH + acet. amónico aq 0.05 M (70/10/15/5)		450 nm para pigmentos	9 11

Tabla 3 - Condiciones cromatográficas utilizadas para la preparación de muestra en análisis de microalgas.

6 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - M. Kimura, D. B. Rodríguez-Amaya, Archivos latinoamericanos de nutrición, 1999, 49, 58s-66s.
- 2 - J.M. El-Qudeh. American J. Of Applied Sciences. 2009, 6(3), 492-497.
- 3 - M. Kimura, D.B. Rodríguez Amaya. Food Chemistry. 2002, 78, 389-398.
- 4 - K.L. Taylor, A.E. Brackenridge. J. Chromatogr. A. 2006, 1121, 83-91.
- 5 - B. S. Inbaraj, J.T. Chien, B.H. Chen. J. Chromatogr. A, 2006, 1102, 193-199.
- 6 - M.B. Toomey and K.J. MacGraw. IOVS. 2007, 48(9), 3976-3982.
- 7 - M. Vilasoa-Martínez, C. Calaza-Ramos, J. López-Hernández, M. A. Lage-Yusty, P. Paseiro-Losada, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós. Anal. Chim. Acta 2008, 617, 225-229.
- 8 - M.G. Dias, MF G.F.C. Camoes, L Oliveira. Food Chemistry, 2008, 15:815-824.
- 9 - K. Holtin, M. Kuehnle, J. Rehbein, P. Schuler, G. Nicholson, K. Albert. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 395: 1613-1622.
- 10 - T. Guaratini, K. H.M. Cardozo, E. Pinto and P. Colepicolo. J. Braz. Chem. Soc. 2009, 20(9), 1609-1616.
- 11 - B. Chauveau-duriot, M. Doreau, P. Nozière and B. Graulet. Anal. Bioanal. Chem. 2010, 397:777-790.
- 12 - H.H. Abd El-Baky, FK. El-Baz and GS El-Baroty. American –Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2007, 2(6), 792-800.
- 13 - L. romero, M. Guevara, H. D'Armas, C. Lodeiros. Bol. Inst. Oceanog.. Venezuela. 2008, 47(1), 67-76.
- 14 - M.A. van Leeuwe, L.A. Villerius, J. Roggeveld, R.J.W. Visser, J. Stefels. Marine Chemistry. 2006, 102, 267-275.
- 15 - Q. Su, KG. Rowley, C. Itsiopoulus and CO Dea. European Journal of Clinical Nutrition. 2002, 56, 1149-1154.
- 16 - M.D. Macías-Sánchez, c. Mantell, M. Rodríguez, e. Martínez de la Ossa, L.M. Lubián, O. Montero. Talanta, 2009, 77, 948-952.
- 17 - A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós. Eur. Food Res. Technol. 2001, 212, 687-690.
- 18 - M. Herrero, E. Ibáñez, J. Señoráns, A. Cifuentes. J. Chromatogr. A. 2004, 1047(2), 195-203.
- 19 - Jose A. Mendiola .Tesis doctoral. "Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos", abril 2008, UAM.

