

94
2 ej'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SEPARACION DE PIGMENTOS CAROTENOIDES
DE ALGA SPIRULINA



EXAMENES PROFESIONALES
EAG. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A
MIGUEL ROCHA QUIROZ

MEXICO, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	PAGINA
1. INTRODUCCION	
1.1 Objetivo	1
2. GENERALIDADES	
2.1 Algas	2
a) Influencia de algunos factores físicos y químicos en la productividad.	7
I. Factores físicos	7
II. Factores químicos	8
b) Cultivos de algas	9
c) Cultivo de alga Spirulina	10
2.2 Cromatografía	15
a) Cromatografía de reparto	15
b) Cromatografía de adsorción	17
I. Constitución química y comportamiento en cromatografía de adsorción	18
II. Elección de adsorbente y eluyentes	19
2.3 Carotenoides	24
I. Clasificación de los carotenoides	24
II. Algunas propiedades físicas y químicas de los carotenoides	29
III. Evaluación de la actividad como provita mina A	30
IV. Separación y cuantificación de carotenoides	30
V. Experimentos que ilustran la separación de carotenoides en columnas de adsorción, (Ta bla 9)	41
VI. Usos de los carotenos	42

3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Métodos cromatográficos	
I. Método de las dos columnas : columna de azúcar-carbonato de calcio-óxido de alu minio, y columna de óxido de aluminio	44
II. Método de la columna de óxido de aluminio	51
3.2 Método de reparto en disolventes inmiscibles	55
3.3 Curva patrón	60
3.4 Resultados	65
I. Con el método de las dos columnas	67
II. Con el método de la columna de óxido de aluminio	68
III. Con el método de reparto en disolventes inmiscibles	72
4. CONCLUSIONES	79
5. BIBLIOGRAFIA	80

1.- INTRODUCCION

1.1 Objetivo

El alga spirulina fue usada como alimento por los Aztecas, desde tiempos prehispánicos; todavía es consumida por los Canebus del Chad de Africa. Ahora, vuelve a cobrar interés, Sosa Texcoco y el Instituto Francés del Petróleo estudian sus propiedades y cultivo.

Su producción tiene buenas perspectivas económicas, al compararla con cultivos de otras algas como Chlorella y Scenedesmus. (18,19,20)

La importancia del alga Spirulina radica en su sorprendente composición química. Su contenido en proteínas, de 55 a 65 %, y su alto contenido de pigmentos carotenoides, de 4000 ppm. Resalta su contenido de β -caroteno, de 1700 ppm, en comparación con la cantidad presente en zanahoria y alfalfa, que es de 903 y 260 ppm, respectivamente. (21)

El aprovechamiento del alga es total, si los pigmentos se extraen, para utilizarlos como colorantes de alimentos.

Con este fin, se busca revisar algunos métodos de extracción de carotenoides del alga Spirulina.

2.- GENERALIDADES

2.1 Algas

Son plantas criptógamas, que carecen de raíces, algunas flotan libremente en las aguas, donde se sostienen por medio de vesículas aéreas diseminadas en su tejido, otras se fijan en las rocas por medio de prolongaciones que parecen raíces, pero que, son simples horquillas formadas por prolongaciones. (Figura 1).

Pueden clasificarse por el pigmento que contengan en :

- a) Rojas
- b) Pardas
- c) Verde-azules

De las algas verde-azules, son interesantes las algas filamentosas, como la Spirulina. Algunas especies son fijadoras de nitrógeno atmosférico, se incorporan al terreno e incrementan la fertilidad del suelo; pueden aumentar el rendimiento de cultivos de arroz y caña de azúcar. (19,23)

El hombre puede cultivar algas, tanto microscópicas como macroscópicas; a esta nueva ciencia se le llama Acuicultura; dentro de esta disciplina se incluyen los cultivos de peces y camarones.

En Berkeley, E.U., se realizaron trabajos sobre la depuración de aguas negras, se recolectaron algas microscópicas que fueron empleadas como alimento de animales. (20 , 22)

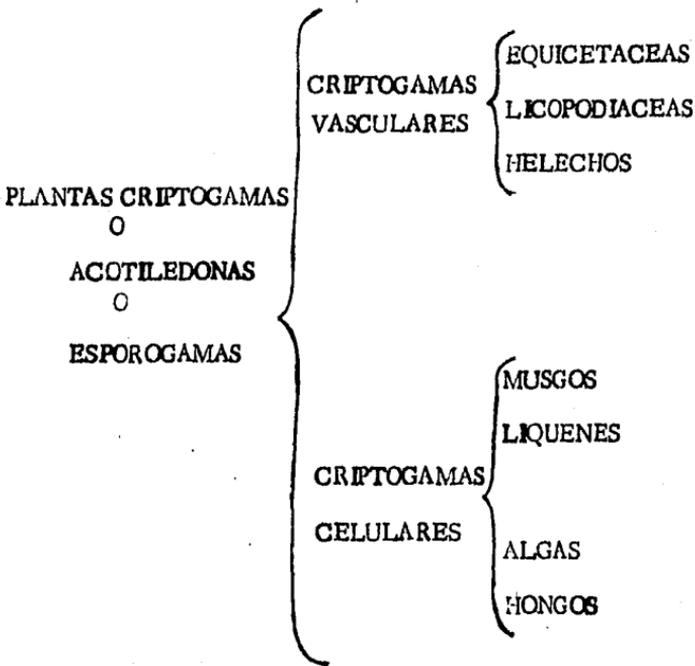


FIGURA 1

LAS ALGAS EN LA CLASIFICACION BOTANICA

El Instituto Francés del Petróleo, y la compañía Sosa Texcoco, comienzan a investigar la importancia del alga Spirulina, juntos inician un proyecto; su trabajo permite la construcción en Sosa Texcoco, de una planta piloto, con la que se produce una tonelada de algas por día, que proceden de un cultivo seminatural mejorado. Se lleva a cabo en un recipiente de 140 hectáreas de superficie, y un volumen de $1.63 \times 10^6 \text{ m}^3$, ubicado en el evaporador solar llamado el Caracol. (Figura 2)

Dichos estudios ofrecen la posibilidad de extender el cultivo a lagos alcalinos, localizados en zonas semidesérticas de América, África y Asia.

El Caracol, está situado en un valle a orillas del lago de Texcoco, es una gran espiral de 3 Km de diámetro. Está fraccionado por varios vasos que fluyen hacia su centro. (Figura 3)

Las condiciones normales del Caracol, dan como resultado un ecosistema apropiado para que se desarrolle el alga Spirulina, en compañía de microorganismos tales como: Bacterias, hongos, protozoarios y otras algas. Las condiciones más importantes que determinan al ecosistema son:

- 1) Una precipitación pluvial adecuada con un promedio anual de 1.5 mm.
- 2) Una luminosidad promedio de 86 Klux.
- 3) Una concentración de bicarbonatos y carbonatos de 8.6 a 10.8 ppm.
- 4) De 16 a 76 ppm de compuestos nitrogenados.
- 5) De 280 a 700 ppm de fosfatos.
- 6) Un pH cercano a 9.8

INSTALACIONES DEL CARACOL

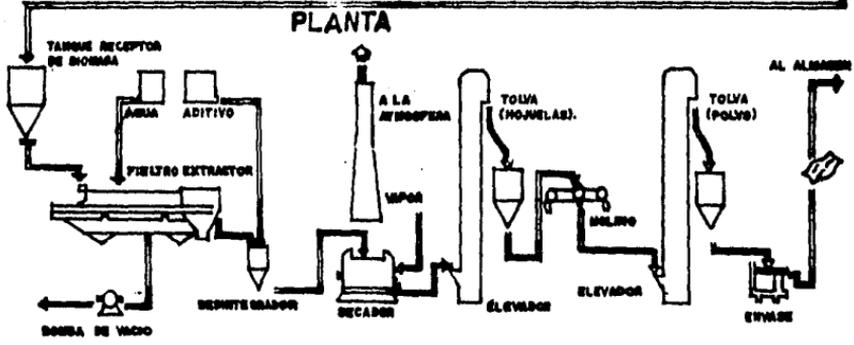
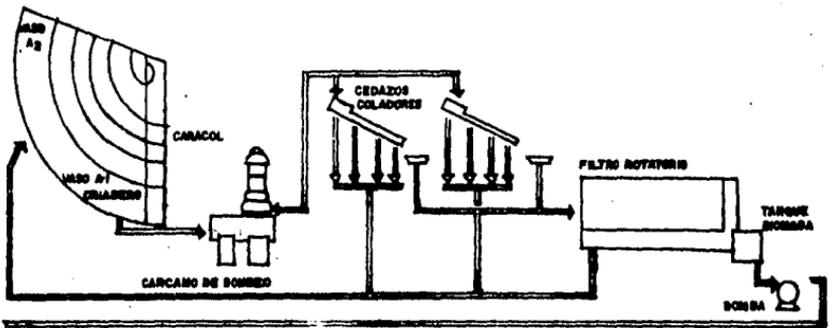


FIGURA 2
PLANTA PILOTO QUE PRODUCE
1 TON/DIA DE ALGA SPIRULINA

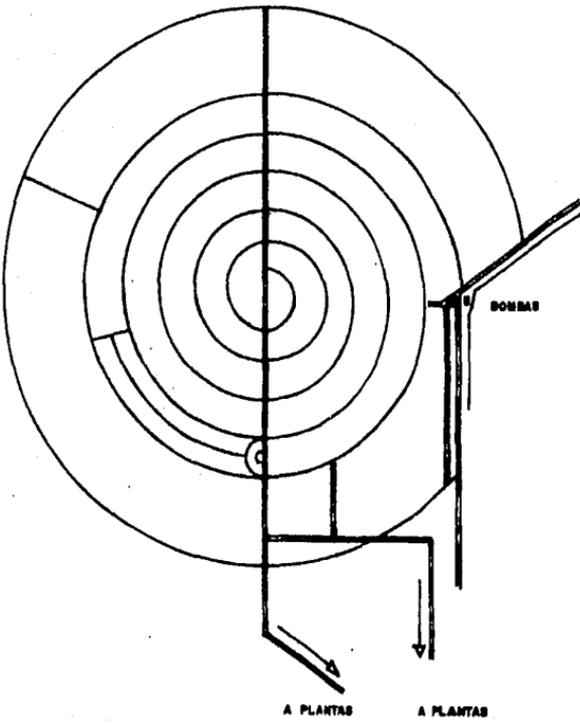


FIGURA 3
ESQUEMA DEL CARACOL

- a) Influencia de algunos de los factores físicos y químicos en la productividad del alga *Spirulina*.

Según los estudios realizados, (18), se obtienen datos de pH, alcalinidad, temperatura, luminosidad, nitratos, fosfatos, etc, y se tratan de relacionar con la productividad, en forma individual y colectiva. Lo que permite hacer predicciones estadísticas de la productividad. Todo esto se hace para cosechar el alga, a la misma velocidad que se reproduce, garantizando la disponibilidad de la biomasa, hasta lograr una explotación sistemática a nivel industrial.

I. Factores físicos.

Temperatura

La temperatura adecuada para el crecimiento del alga *Spirulina* es de 34 ± 1 °C, pero que de sobrevivir desde 4 °C hasta 44 °C. En los trabajos realizados en Sosa Texcoco, se nota que las variaciones más pequeñas entre temperaturas máximas, y temperaturas mínimas, que suceden durante la primavera y el verano; es el periodo en donde se obtienen las concentraciones de biomasa más altas y menos irregulares

Luz

Ocurre lo mismo que con la temperatura, las menores oscilaciones, en cantidad de luz de la primavera y verano, correspondieron a la mejor productividad.

II Factores químicos

pH

Cambia únicamente en décimas, por eso no se puede relacionar con la productividad.

Alcalinidad

Durante los meses de febrero a agosto suceden sus menores variaciones, presentándose los mejores valores de productividad.

Nitrógeno

Tiene una variación cíclica, con un máximo de 76 ppm y 16 ppm como mínimo. No se encuentra relación con la productividad.

Fosfatos

Su comportamiento también es cíclico, con variaciones menos bruscas e irregulares. Máximo de 700 ppm y mínimo de 280 ppm; no existe relación con respecto a la variación de productividad.

La influencia de los vientos y las lluvias es menos marcada. Los primeros provocan una benéfica oxigenación de las algas, y las segundas originan una mejor homogenización.

Con el control de afluentes, se puede regular la concentración de los nutrientes, además de que se van eliminando selectivamente a protozoarios, y bacterias, evitando la competencia por nutrientes y otros efectos de productos metabólicos.

Se encuentra que la temperatura y la luz presentan cierta relación con la productividad, en tanto que, el nitrógeno y los fosfatos, solo interfieren en la calidad de la biomasa, es decir, en su contenido de proteínas.

b) Cultivo de algas

Las algas microscópicas tienen ciertas características por las cuales llaman la atención. Su ciclo de vida es corto, de aproximadamente 1 día, por lo tanto se pueden lograr cosechas diarias.

Son plantas que sintetizan materia orgánica, por eso, necesitan una cantidad de energía solar.

Sus células se reproducen por simple división, y cada una da origen a otras dos. Las células se reproducen aproximadamente cada 12 horas, en condiciones óptimas pueden incrementar su población doscientas veces en cuatro días. Por eso, se puede tener un cultivo continuo, teniendo suficiente iluminación, y nutrientes (como bióxido de carbono y otras sales disueltas en agua).

Puede variarse la composición de las algas, manteniendo niveles altos o bajos de nitrógeno, pudiendo tenerse, mayor cantidad de proteínas y menor contenido de lípidos o viceversa.

c) Cultivo de alga Spirulina

El alga Spirulina es una planta microscópica constituida por un filamento pluricelular de forma helicoidal, de 0.25 a 0.5 cm de longitud, se encuentra en aguas alcalinas o salobres. (Figura 4)

Su reproducción excesiva se observa en muchos lugares del mundo, como Etiopía, Chile, Perú y México.

Por el año de 1963, el Instituto Francés del Petróleo inicia los estudios del cultivo en medio sintético, la tecnología del método de cultivo y de sus cualidades nutritivas. Como resultado, se construye un recipiente para el cultivo acelerado de Spirulina, el cual trabajo en Atibes Francia. El recipiente de 100 m² de superficie, y con una capacidad de 15 000 litros, forma una plataforma horizontal de poca profundidad, con un pozo en cada extremo. La plataforma y los pozos son divididos en dos compartimentos, por una mampara central en toda su longitud. Las únicas comunicaciones entre los dos compartimentos, estaban en el fondo de los pozos, los cuales hacían posible la recirculación y agitación del cultivo. Los recipientes tenían tapas de polietileno a presión, para evitar la contaminación y la pérdida de agua. La cosecha en la etapa inicial se efectúa, concentrando y filtrando al vacío. En el ensayo se alcanza un rendimiento de 12 g/ m² día.

En Sosa Texcoco, se estudian ceras de África y

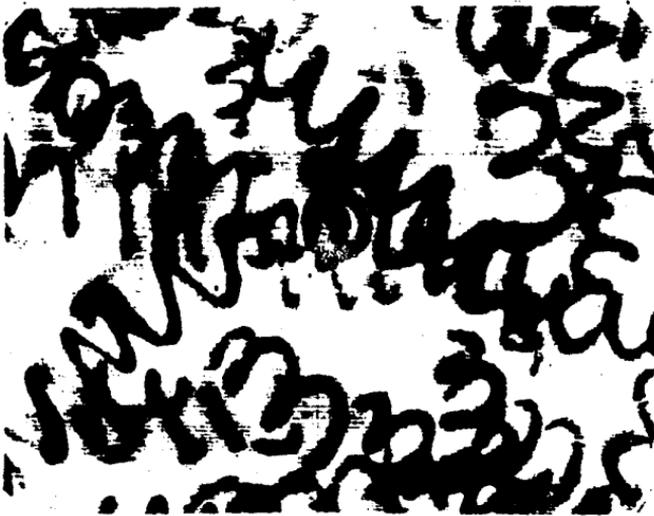


FIGURA 4
FOTOGRAFIA AMPLIFICADA
DEL ALGA SPIRULINA

de México. Se utiliza el método de cultivo acelerado, en recipientes, usando como modelo el construido en Francia. Se preconcentra y se filtra al vacío. Se seca por atomización; se separan proteínas; pigmentos y lípidos, por extracción de solventes. (19)

Las consideraciones económicas del cultivo de alga *Spirulina* son muy alagadoras, (según las investigaciones, se puede obtener un promedio anual de 225 toneladas), y la convierten en una adecuada fuente natural de proteínas y pigmentos; presentando ventajas, en comparación con cultivos de otras algas, como *Chlorella* y *Scenedesmus*. (18,22)

TABLA 1

CONTENIDO DE CAROTENOS (20,21)

FUENTE	ppm DE CAROTENOS
ALGA SPIRULINA	1700
ZANAHORIA	903
CENTENO	447
TREBOL	337
CEBADA	308
ALFALFA	259
TRIGO	259
TREBOL DULCE	196
PAPAS	140

TABLA 2

ANALISIS QUIMICO DE LA SPIRULINA EN POLVO (11,20)

HUMEDAD	7.0 %
GRASA	7.0 %
PROTEINAS	71.0 %
CARBOHIDRATOS	16.0 %
CENIZAS	9.0 %
FIBRA CRUDA	0.9 %
CLOROFILA	7.6 g/Kg
CAROTENOIDES	4000 ppm

2.2 Cromatografía

Los pigmentos de las plantas, pueden ser separados por un método ideado en 1906, por el biólogo Tswett. Dicho método recibió el nombre de Cromatografía, por haber sido aplicado, por primera vez, en la separación de sustancias con color. Desde entonces ha sufrido modificaciones y mejoras. Actualmente, es de los métodos más empleados en la separación y purificación de compuestos en mezclas.

Las ideas más generales del método, se mencionan a continuación. En todos los procesos cromatográficos, participan fuerzas de adsorción, partición o intercambio iónico; en la separación cromatográfica están involucradas al menos dos fases.

La separación cromatográfica, es consecuencia de los coeficientes de reparto, que aparecen a lo largo de la columna, o del fenómeno adsorción-desadsorción, de cada componente de la mezcla. (1,8,9)

En general, los procesos cromatográficos se clasifican en:

- Cromatografía de reparto
- Cromatografía de adsorción

a) Cromatografía de reparto

Se basa, en la separación de una mezcla de sustancias, por el reparto, que existe entre una fase móvil, y una fase estacionaria, soportada por un sólido adecuado. Los disolventes pueden ser líquidos, este sería el caso de la cromatografía líquido-líquido; y gases, en el caso de la cromatografía gas-

TABLA 4

DIFERENCIAS ESTRUCTURALES	ADSORCION	PARTICION
TAMANO DE LA MOLECULA	b - r	b - mb
ISOMEROS ESTRUCTURALES:		
CADENAS, ANILLOS	b - r	b
CADENAS RAMIFICADAS	b - r	r
POSICION DE LAS DOBLES LIGADURAS	b - r	ni
ISOMEROS ESTERICOS:		
CIS-TRANS EN DOBLES LIGADURAS	b - r	b
CIS-TRANS EN UN ANILLO	mb - r	b
ISOMEROS OPTICOS	r	r
NUMERO DE DOBLES LIGADURAS	mb	b
CONJUGACION DE DOBLES LIGADURAS	b - r	b
NUMERO DE SUSTITUYENTES NO POLARES	b - r	b - r
NUMERO DE SUSTITUYENTES POLARES	mb	mb

DATOS EMPIRICOS PARA LA ELECCION DEL METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA DE ACUERDO A LA SENSIBILIDAD DE ESTE, EN RELACION CON LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES DE LAS SUSTANCIAS A SEPARAR. (6,14). DONDE: mb, muy bueno; b, bueno; r, regular; ni, no investigado.

-líquido.

En éste tipo de cromatografía, las sustancias de la mezcla, se separan de acuerdo al siguiente principio:

Principio de reparto

Para una sustancia S, que se disuelve en dos disolventes, D_1 y D_2 , se distribuye entre ellos, por el siguiente principio:

$$K = \frac{C_{SD_1}}{C_{SD_2}}$$

Donde:

K , es el coeficiente de reparto. (constante a una temperatura dada)

C_{SD_1} , es la concentración de S en D_1

C_{SD_2} , es la concentración de S en D_2

b) Cromatografía por adsorción

Cuando hablamos de cromatografía por adsorción, nos referimos a la presencia de interacciones, en las que participan enlaces de Hidrógeno o fuerzas electrostáticas.

La adsorción, es el enriquecimiento de un gas, o un material disuelto sobre la vecindad de una fase, por ejemplo, sobre un sólido. Por eso, los efectos de este fenómeno se hacen más notables, en cuanto la superficie es mayor.

I. Constitución química y comportamiento en la cromatografía por adsorción.

En este tipo de cromatografía, las separaciones dependen de la presencia del equilibrio entre moléculas adsorbidas en la fase estacionaria y las que están en el seno del disolvente. Si las moléculas de una sustancia tienen una gran afinidad por el adsorbente, pasaran muy lentamente a través de éste. En el caso contrario, si la afinidad es poca, los compuestos pasaran más rápido. (7,24)

Los adsorbentes más comunes, son óxidos hidratados o sales, (Tabla 5). Las sustancias adsorbidas, son compuestos polares o polarizables, que rodean la superficie de los adsorbentes, por fuerzas electrostáticas, las cuales son responsables de mantener junta la red cristalina. Estas fuerzas están, en parte, dirigidas hacia afuera, por eso, los centros activos consisten principalmente de filos, puntas, esquinas y defectos en la superficie, en la cual hay más o menos, iones sin combinar.

Las fuerzas eléctricas de superficie inducen momentos dipolares en compuestos no polares. En consecuencia, la unión de los adsorbatos con la superficie del adsorbente es debida a fuerzas ión-dipolo o dipolo-dipolo.

Los puentes de Hidrógeno pueden intervenir en la unión del adsorbato con el adsorbente, disminuyendo bastante o totalmente la movilidad.

Los puentes intermoleculares entre la sustancia y el disolvente, también afecta a la movilidad y en forma directa a la separación de los componentes.

II. Elección de adsorbentes y eluyentes

Para llevar a cabo la elección, en base a la experiencia, se debe considerar lo siguiente: (7)

- a) Los hidrocarburos son adsorbidos con mucha dificultad o no son adsorbidos.
- b) La presencia de dobles ligaduras eleva la afinidad por adsorción. (este es el caso de los carotenoides)
- c) La introducción de grupos funcionales dentro de los hidrocarburos, en general, elevan la afinidad por adsorción. (diferencia en afinidad del β -caroteno y las xantofilas).
- d) Si hay varios sustituyentes en la misma molécula, sus influencias separadas, son aproximadamente aditivas. En particular, los efectos estéricos deben ser tomados en cuenta, así como la posición de sus sustituyentes en anillos aromáticos.
- e) La afinidad de un disolvente por un adsorbente crece con el poder elutivo, por lo tanto, hay una influencia correspondiente, de sustituyentes en las series eluotrópicas.

TABLA 3

EjemPlo DE LA INFLUENCIA DE ALGUNOS GRUPOS FUNCIONALES
 EN LA AFINIDAD POR ADSORCION

COOH

CONH₂

OH

NHCOCH₃

NH₃

OCOCH₃

COCH₃

N(CH₃)₂

NO₂

OCH₃

H

Cl

EL EFECTO DISMINUYE HACIA ABAJO DE LA LISTA

- f) Deben tomarse en consideración la influencia de los puentes de Hidrógeno, en todas sus posibilidades, como ya se mencionó.
- g) Para establecer un sistema mezcla-disolvente, se aplicará como criterio empírico que la polaridad del disolvente sea análoga a la de la mezcla.
- h) Ya establecido lo anterior, se elegirá el adsorbente más activo para las sustancias no polares, y adsorbente menos activo para mezclas más polares.
- i) Por último, se elegirá otro disolvente de mayor polaridad, que se adicionará al usado con la sustancia a separar.

Aumentando la polaridad del eluyente, su afinidad con el adsorbente ira creciendo, desplazando en forma selectiva a los componentes de la mezcla.

Con las consideraciones anteriores, y apoyados en tablas experimentales, citadas aquí, (Tablas : 3,4,5,6,9,10,11), se pueden establecer técnicas de separación cromatográfica por adsorción, completando esto, con cuidadosa y repetida experimentación. (6,7,9,13,21,24)

TABLA 5

ADSORBENTES EN ORDEN CRECIENTE DE POTENCIA. (6,7,9)

NYLON 66 (POLICAPROLACTAMA)
 POLIVINIL PIRROLIDONA (PVP)
 ALMIDON
 INULINA
 AZUCAR
 CITRATO DE MAGNESIO
 TALCO
 CARBONATO DE SODIO
 CARBONATO DE POTASIO
 CARBONATO DE CALCIO
 FOSFATO DE CALCIO
 CARBONATO DE MAGNESIO
 MAGNESIA
 OXIDO DE CALCIO
 SILICA
 SILICATO DE MAGNESIO ANHIDRO
 MAGNESIA ACTIVADA
 CARBON ACTIVADO
 ALUMINA ACTIVADA (GRADO DE ACTIVIDAD, SEGUN SU CON
 TENIDO EN AGUA: 0%, I; 3%, II; 6%, III; 10%, IV;
 15%, V)
 TIERRA DE INFUSORIOS

TABLA 6

ALGUNOS DISOLVENTES ORDENADOS DE MENOR A MAYOR PODER
ELUTIVO. (1,14,24)

N-HEXANO

ETER DE PETROLEO

CICLOHEXANO

TETRACLARURO DE CARBONO

BENCENO

DISULFURO DE CARBONO

TRICLORO ETILENO

ETER DIETILICO (O ISOPROPILICO)

CLOROFORMO

ACETATO DE ETILO

PIRIDINA

PROPANOL-2

ACETONA

N-PROPANOL

ETANOL

METANOL

AGUA

MEZCLAS DE ACIDOS, BASES CON AGUA, ALCOHOLES O PIRIDINA

2.3 Carotenoides

Entre las fuentes naturales de carotenoides, más importante, esta el alga Spirulina, (Tabla 7), consideramos algunas características de estos pigmentos.

Los carotenoides existen en la naturaleza en forma muy extensa, tanto en el reino vegetal, como en el reino animal; son los causantes de la coloración en frutos, flores, langosta, cangrejo, etc.

De muchos de los carotenoides conocidos, solo pocos han sido aislados, o sintetizados. Se puede mencionar al β -caroteno, a las β -apo-8'-carotenal xantofilas, norbixina o carotenoide bixina.

Los primeros carotenoides disponibles como colorantes, fueron obtenidos por extracción de fuentes naturales, (21). A principio de los cincuenta, Hoffman-La Roche, desarrolló una síntesis para el β -caroteno. Esta síntesis se extendió más tarde, hacia la producción de apo-carotenal y cantaxantina, (10).

Un aspecto importante de los carotenoides, es que algunos miembros de esta familia presentan actividad como vitamina A. (15). Estos pigmentos se encuentran en plantas amarillas y verdes; junto con clorofila.

I. Clasificación de los carotenoides (8)

Los carotenoides forman cuatro grupos principales ;

- a) Los carotenos, formados solo de carbono e hidrógeno; reciben este nombre, porque se encontraron por primera vez en la zanahoria, (Daucus Carota). Son carotenos : el α , β , γ -carotenos, el licopeno, su fórmula condensada es $C_{40}H_{56}$. (Figure 5)

- b) Las xantofilas, que son derivados oxi o hidroxí de los carotenos, como la criptoxantina, $C_{40}H_{56}O$; y la luteína, $C_{40}H_{54}(OH)_2$. (Figura 6)
- c) Los ésteres de xantofila, que son los ésteres de xantofila con ácidos grasos.
- d) Los ácidos carotenoides, que son los derivados carboxílicos de los carotenos.

Los pigmentos están formados por una cadena alifática, con grupos metilo, unidos a un sistema de dobles enlaces conjugados, los cuales son responsables de su color (del rojo al amarillo). Los grupos terminales de la cadena alifática varían para los diferentes carotenoides, y determinan su actividad como provitamina A, así como, afinidades en adsorción y propiedades de solubilidad diferencial, las cuales son la base para su aislamiento.

El sistema de dobles enlaces conjugados, de los pigmentos, está sujeto a una isomerización cis-trans, siendo posible un gran número de estereoisómeros. Estos difieren uno del otro en su potencia biológica, afinidad en adsorción, espectro de absorción, etc.

Aunque, la configuración trans predomina en la mayoría de los extractos de plantas frescas, aproximadamente un tercio de estas moléculas, sufren isomerización espontánea a la forma cis. La velocidad de isomerización aumenta, con la exposición del extracto a la luz y/o al calor. Cantidades catalíticas de Iodo, en presencia de luz ordi

TABLA 7

CONTENIDO DE CAROTENOIDES DEL ALGA SPIRULINA (20)

TOTAL 4000 ppm

NOMBRE	mg CAROTENOIDES/Kg DE ALGA EN POLVO
α -CAROTENO	TRAZAS
β -CAROTENO	1700
XANTOFILAS	1600

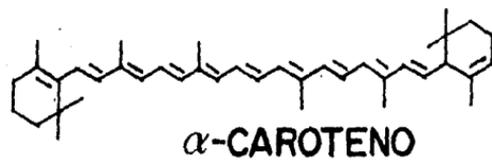
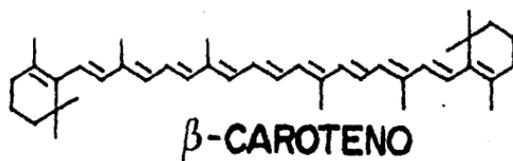
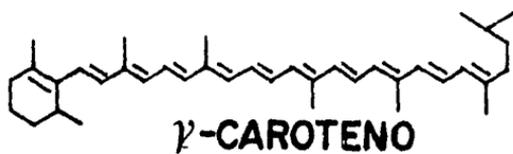
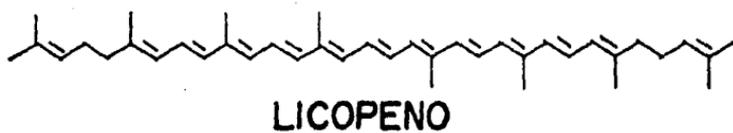
CAROTENOS

FIGURA 5

XANTOFILAS

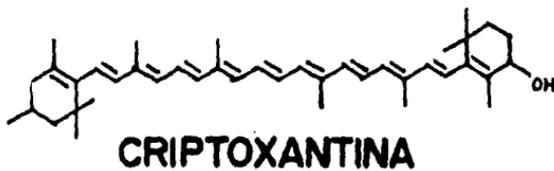


FIGURA 6

caria, puede ser usada en el laboratorio, para convertir en forma efectiva, la forma trans a la forma cis.

II. Algunas propiedades físicas y químicas de los carotenoides. (17)

- 1) Son solubles en grasas.
- 2) Solubles en cloroformo, benceno, disulfuro de carbono, éter de petróleo, pero difícilmente en alcohol.
- 3) Tienen espectros de absorción característicos, para cada disolvente usado.
- 4) Al microscopio, el caroteno presenta cristales en forma de agujas, prismas y husos amarillos.
- 5) El β -caroteno es de color rojo oscuro cristalino.
- 6) Son sensibles a la oxidación, autooxidación y luz.
- 7) Son estables al calor moderado, en una atmosfera libre de oxígeno, aunque pueden suceder cambios este reoisoméricos.
- 8) Algunos son provitamina A. En el hígado de los animales se oxidan, convirtiéndose en vitamina A. Los compuestos que tienen esta propiedad, se caracterizan porque contienen al anillo de β -ionona, en uno o ambos extremos de la cadena del polieno, como en la figura 7. De estos precursores encontrados en la naturaleza, tenemos: al α , β , γ , los neo-carotenos y la criptoxantina. La actividad de vitamina A en la mayoría de los vegetales y frutas, es debida a su contenido en β -caroteno. Los demás aparecen en pequeñas cantidades. Sin embargo, el trigo amarillo contiene más criptoxantina que β -caroteno. (16,26)

III. Evaluación de la actividad como provitamina A

Esta actividad biológica de estos pigmentos, es característica de gran importancia.

Se obtiene mediante un ensayo biológico. Los resultados obtenidos de esta forma, son expresados en unidades internacionales (U.I.), o unidades de vitamina A USP. Los ensayos son llevados a cabo con ratas, alimentándolas con varios niveles de muestra en cuestión, y comparando las ganancias en peso, con aquellas obtenidas por alimentación de cantidades conocidas de β -caroteno. Aquella cantidad de alimento, la cual resulta en ganancias de peso, similares, que para aquellas producidas por 0.60 mcg de β -caroteno, contiene una unidad de vitamina A. (25,26)

IV. Separación y cuantificación de carotenoides

Para cuantificarlos, se utilizan medidas espectrofotométricas o colorimétricas.

Los pigmentos se separan de extractos de la muestra por reparto en disolventes, o por técnicas de cromatografía de adsorción.

No importando el método de purificación empleado, hay cierto grado de libertad, para elegir el procedimiento de extracción. En general, el calor debe ser evitado, pues los altera. Hay ocasiones, en las cuales, es necesario una saponificación, como es el caso de materiales con alto contenido en grasa o clorofila. Esto sucede en productos lácteos, alimentos mezclados, algas, etc. La saponificación, provoca la desintegración del tejido, saponificando a las grasas y a la mayoría de las clorofilas; así

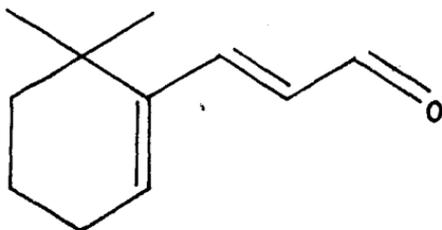
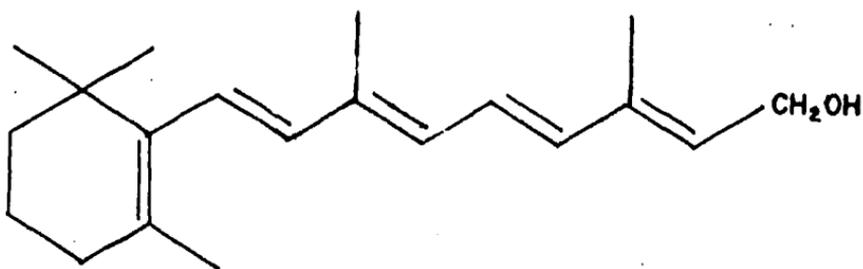
β -IONONA**VITAMINA A****FIGURA 7**

TABLA 8

ESTEREOISOMERO	POTENCIA BIOLOGICA RELATIVA (25) %
TOTAL-TRANS β -CAROTENO	100
NEO- β -CAROTENO U	38
NEO- β -CAROTENO B	53
TOTAL-TRANS α -CAROTENO	53
NEO- α -CAROTENO U	13
NEO- α -CAROTENO B	16
TOTAL-TRANS γ -CAROTENO	27-42
NEO- γ -CAROTENO P	19
TOTAL-TRANS-CRIPTOXANTINA	57
NEO-CRIPTOXANTINA U	27
NEO-CRIPTOXANTINA A	42

los carotenoides siendo insaponificables, son más fáciles de separar. (2,3,7, 24)

Fue a través de los estudios sobre estos pigmentos, que por primera vez, se estableció la relación entre insaturación, y el poder de adsorción de los compuestos orgánicos. (Tabla 9)

A causa del gran número de carotenoides, y por el parecido entre ellos, es difícil resolver una mezcla de estos compuestos, en una sola columna de adsorción, por lo tanto, es necesario hacer una separación preliminar de los diferentes compuestos, antes de la adsorción. Esta separación se hace por partición en dos disolventes inmiscibles, pudiendola realizar, antes y/o después de la saponificación.

Los carotenoides se separan de la siguiente forma:

- a) Repartidos entre el éter de petróleo y metanol al 90 %, de la siguiente forma:
 - 1) Epifásicos, los de la capa superior; en la que se encuentran los carotenos y los ésteres de xantofila.
 - 2) Hipofásicos, los de la capa inferior, en la que se encuentran xantofilas libres y los ácidos carotenoides.
 - 3) Se saponifican los pigmentos de la capa superior, con hidróxido de potasio alcohólico.
 - 4) Los pigmentos de la mezcla saponificada, se vuelven a repartir entre éter de petróleo y metanol al 90 %. En la capa superior quedan los carotenos, y en la inferior, las xantofilas.

TABLA 9

PIGMENTO	FORMULA	GRUPOS	DOBLES LIGADURAS
FLAVOXANTINA	$C_{40} H_{56} O_3$	3 OH	11 CONJUGADAS
ZEAXANTINA	$C_{40} H_{56} O_2$	2 OH	11 CONJUGADAS
LUTEINA	$C_{40} H_{56} O_2$	2 OH	10 CONJUGADAS Y 1 AISLADA
CRIPTOXANTINA	$C_{40} H_{56} O$	1 OH	11 CONJUGADAS
RODOXANTINA	$C_{40} H_{56} O_2$	DICETONA	2 CARBONILOS Y 12 DOBLES LIGADURAS TODAS CONJUGADAS
LICOPENO	$C_{40} H_{56}$		11 CONJUGADAS Y 2 AISLADAS
γ -CAROTENO	$C_{40} H_{56}$		11 CONJUGADAS
β -CAROTENO	$C_{40} H_{56}$		11 CONJUGADAS
α -CAROTENO	$C_{40} H_{56}$		10 CONJUGADAS Y 1 AISLADA

EL PODER DE ADSORCION DE LOS PIGMEN
TOS, AUMENTA DE ARIIBA HACIA ABAJO.

DIAGRAMA No. 1

SEPARACION DE CAROTENOIDES POR PARTICION Y ADSORCION

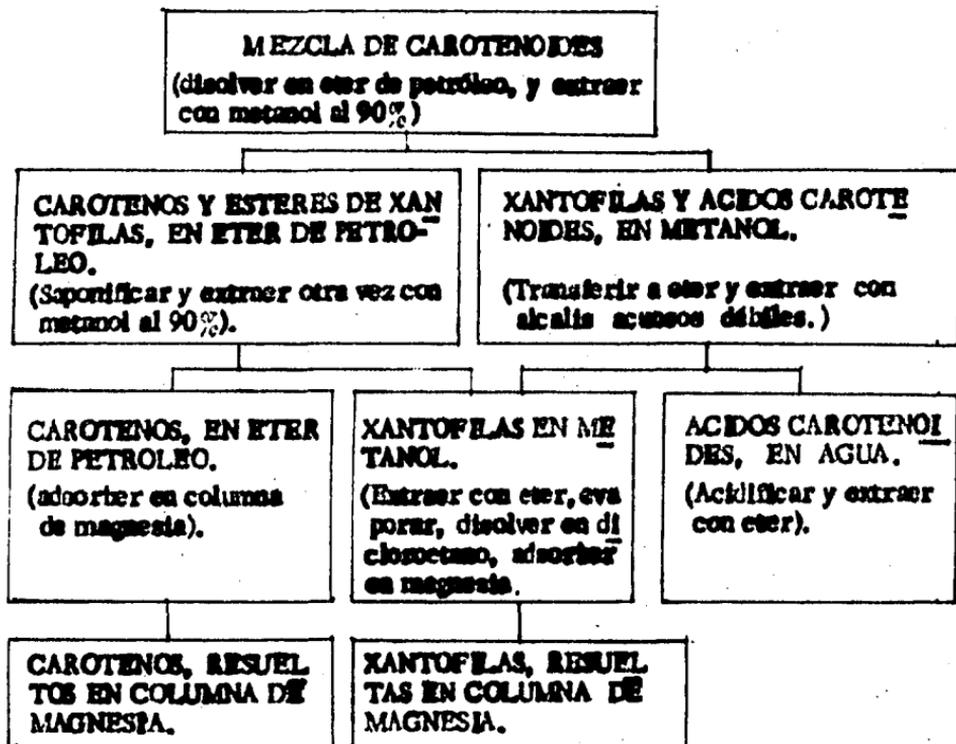


DIAGRAMA No. 2

SEPARACION DE CAROTENOIDES POR ADSORCION

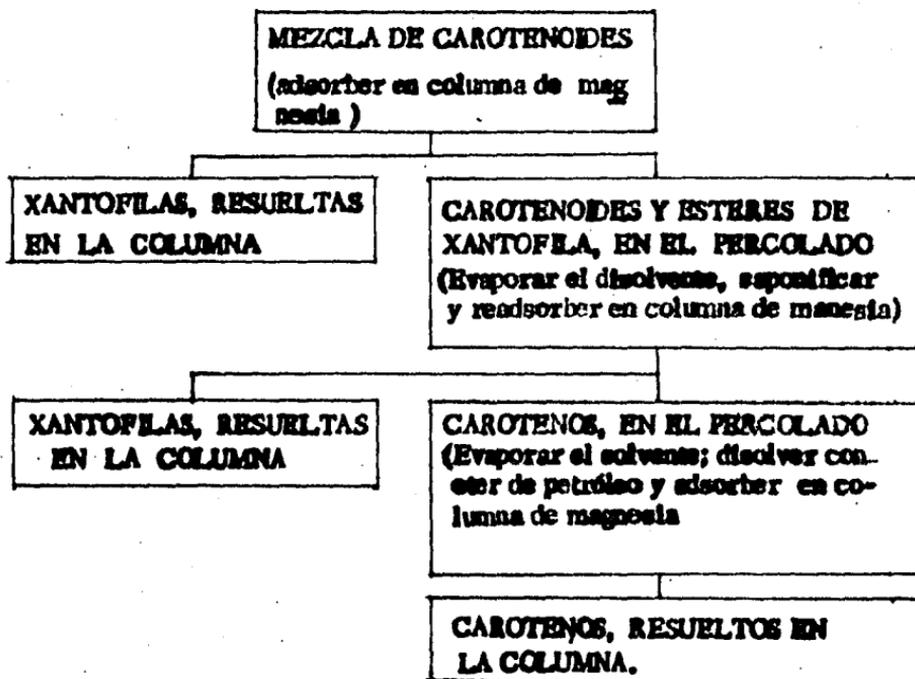


TABLA 10

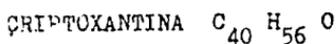
ALGUNOS CAROTENOIDES CON: SU FUENTE PRINCIPAL, ADSORBENTES, Y
DISOLVENTES USADOS PARA SU SEPARACION



FUENTE	ADSORBENTES	DISOLVENTES
ZANAHORIA (RAIZ)	ALUMINA	ETER DE PETROLEO
HOJAS DE MUCHAS PLANTAS	MAGNESIA	ETER DE PETROLEO
CHILE (PAPRICA)	CAL	ETER DE PETROLEO
MANTEQUILLA	MAGNESIA	ETER DE PETROLEO
ALGA SPIRULINA	ALUMINA	ETER DE PETROLEO Y ACE TONA
	MAGNESIA Y TIE RRAS DIATOMACEAS	ETER DE PETROLEO Y ACE TONA
	AZUCAR-CARBONATO DE CALCIO-ALUMI NA	ETER DE PETROLEO, BENGE NO, METANOL Y ETER ETILICO
PATATAS	CARBON ACTIVADO	HEXANO Y BENGENO
ALFALPA	CARBON ACTIVADO	HEXANO Y BENGENO

TABLA 11

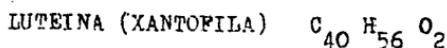
XANTOFILAS



FUENTE	ADSORBENTES	DISOLVENTES
TOMATE VERDE	ALUMINA	ETER DE PETROLEO Y BENCENO
MAIZ	MAGNESIA	DICLOROETANO
	ALUMINA	ETER DE PETROLEO Y BENCENO



TOMATE VERDE	ALUMINA	ETER DE PETROLEO Y BENCENO
MAIZ	ALUMINA	ETER DE PETROLEO Y BENCENO
YEMA DE HUEVO	MAGNESIA	DICLOROETANO
	CARBONATO DE	
	MAGNESIO	DICLOROETANO



HOJAS VERDES	MAGNESIA	DICLOROETANO
CEMPASUCHIL	MAGNESIA-TIE	
	RRAS DIATOMA	
	CEAS	HEXANO Y ACETONA
ACEITE DE GERMEN		
DE TRIGO	MAGNESIA	DICLOROETANO

- 5) La mezcla de xantofilas y ácidos carotenoides obtenida en la primera repartición, (inciso 2), es transferida a éter; los compuestos acídicos, pueden ser extraídos con álcalis. (Diagrama 1).
 - 6) Con la adsorción en columnas, es resuelta en forma separada, la mezcla de carotenos y la mezcla de xantofilas.
- b) Otra forma de separación es:
- 1) Saponificando la muestra, con hidróxido de potasio alcohólico.
 - 2) Disolviendo los pigmentos con éter de petróleo y éter etílico.
 - 3) Lavando la mezcla con agua destilada.
 - 4) Adsorbiendo la mezcla en la columna. Generalmente, los ésteres de xantofila y los carotenos, pueden ser separados de las xantofilas, cuando se encuentran en solución, de benceno, dicloroetano, éter de petróleo, éter etílico, entre otros; utilizando columnas de alúmina, magnesia y/o tierras silíceas. Donde las xantofilas son adsorbidas, más fuertemente, y los carotenos pasaran rápidamente a través de la columna. (Diagrama 2).

Quando los pigmentos se disuelven con éter de petróleo, se pueden utilizar columnas de sacrosa o de carbonatos alcalinos. El percolado, que contiene a los carotenos, puede entonces ser pasado a través de una columna de magnesia

o alúmina.

Con estos pigmentos, que proceden de plantas y animales, con frecuencia, están presentes sustancias grasas, sin color, que decrecen el poder de adsorción de los carotenoides. Por tanto, es necesario determinar si están presentes o no, contaminantes, en cantidad tal, que afecten la separación. Se hacen pruebas con una pequeña porción de la mezcla, adsorbiéndola en una columna pequeña. Si los carotenoides son débilmente adsorbidos, las sustancias contaminantes deben ser eliminadas. Esto se logra saponificando, por reparto en disolventes inmiscibles, o por cristalización. Durante estas purificaciones preliminares, deberá uno tener cuidado, para prevenir pérdidas de los pigmentos.

La posición relativa de los carotenoides, en la columna, depende del número de dobles enlaces y de los grupos hidroxilo en la molécula. Según se reporta por investigadores, la potencia de la adsorción está íntimamente relacionada con el incremento en el número de dobles enlaces conjugados, (Tabla 9).

La adsorción de los carotenoides es mayor, y la posición en la columna es más alta, (7,15).

1) Cuando el número de dobles enlaces es mayor.

Ejemplo : liconeno y β -caroteno.

- 2) Cuando con el mismo número de dobles ligaduras, aumenta la conjugación. Ejemplo: β -caroteno y α -caroteno.
- 3) Cuando es el caso de sistemas insaturados idénticos, y entonces aparecen hidroxilos. Ejemplo: criptoxantina y β -caroteno.
- 4) Cuando se incrementa el número de hidroxilos. Ejemplo: flavoxantina y zeaxantina.

Regularmente, las columnas de adsorción tienen un uso limitado, ya que, solo las primeras veces que se usan se logran buenas separaciones, y cortos tiempos de trabajo. Al retirarse su utilización, el adsorbente se empaqueta fuertemente. Siendo importante la regeneración del adsorbente, debe ser cuidadosa.

Para el caso de los pigmentos del alga Spirulina, al separar y purificar los carotenoides, se necesita saponificar, con el fin de separar las clorofilas, que están en gran cantidad. (tabla 2). Con la consiguiente destrucción de los carotenos. Si no se saponifica, la columna se obstruye con clorofilas en su parte superior, rápidamente; haciéndose demasiado lenta la separación, incrementándose la oxidación de los pigmentos, a pesar de aislar de la luz la columna, en una cámara oscura.

V. Experimentos que ilustran la separación de carotenoides en columnas de adsorción. (Tabla 9)

- a) Separación de carotenos, xantofilas y clorofilas.

Se usan columnas de azúcar, carbonato de sodio anhidro, magnesia, fosfato dicálcico, etc, (adsorbentes poco y medianamente activos). Con éter de petróleo y dicloroetano.

El orden del poder de adsorción de los pigmentos es:

Clorofilas > xantofilas > carotenos; por tanto, los carotenos salen en primer lugar. (9)

b) Separación del α -caroteno y el β -caroteno.

Se logra utilizando una columna de magnesia y tierras diatomáceas, (medianamente activos). Utilizando éter de petróleo, hasta que el α -caroteno sale de la columna. El β -caroteno, que queda en la columna es eluido con éter de petróleo que contenga un poco de etanol.

c) Separación de β -caroteno, criptoxantina, luteína y zeaxantina.

Los pigmentos se disuelven en dicloroetano, se pasan a través de una columna de magnesia y tierras diatomáceas (adsorbente medianamente activo). La columna se lava con porciones de dicloroetano.

Se separan cuatro bandas de pigmentos. Quedan en el siguiente orden, comenzando por la parte superior de la columna: zeaxantina, luteína, criptoxantina y β -caroteno. (24)

Debido a que el poder de adsorción es:

zeaxantina > luteína > criptoxantina > β -caroteno.

VI. Usos de los carotenos

A escala comercial, uno de los carotenoides que se sinte

tiza en mayor cantidad, es el β -caroteno. Tiene amplia utilización en la industria alimenticia. (4,5,17,26)

Se usa en la fabricación de: aceites de mesa, mantequillas, margarinas, productos de panificación, jugos de frutas, bebidas instantaneas en polvo, con sabor a naranja o toronja, sopas, aderezos para ensaladas, quesos, cremas, Postres, como polvo para budín instantaneo con sabor a vainilla, yogurts, dulces, jaleas, helados, etc.

En el mercado encontramos β -caroteno, que sintetiza la compañía Roche, quien ofrece en dos presentaciones, una al 1 %, soluble en agua fría, otra al 30 %, en suspen-sión oleosa.

La primera presentación es especial para: refrescos, confitería, sopas secas, etc. El producto esta formado por una solución aceitosa de cristales de caroteno, esta-bilizado con antioxidantes, como el α -tocoferol y ascorbato de sodio; es emulsificado en un sistema acuoso, que contiene goma de acacia, azúcar y malto-dextrina.

La segunda presentación es una suspensión oleosa de β -caroteno al 30 %. Es el colorante ideal de aceites y grasas, o productos alimenticios conteniendo fase oleosa, aderezos para ensalada, quesos, crema y otros productos lácteos, etc. (5)

La aplicación de este colorante es, para dar desde un amarillo limón hasta amarillo naranja. (4,25)

Recordemos que la importancia en la utilización de los carotenoides, es, no solo, su propiedad de servir como colorantes, sino también en su actividad provitamínica A.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

El alga Spirulina fue proporcionada por la compañía Sosa Texcoco, y almacenada desde 1977.

Se utilizaron 15 muestras de diferentes pesos, que comprendían cosechas de los meses de abril a agosto de ese año; se mezclaron, dando un peso aproximado de 8 Kg. Siendo las características del alga, las mostradas en la tabla 12.

Se siguieron dos métodos cromatográficos, y uno por reparto en disolventes inmiscibles.

Métodos cromatográficos

I. Método de las dos columnas:

- columna de azúcar, carbonato de calcio y óxido de aluminio.(9)
- columna de óxido de aluminio.(13)

Como la primera fracción obtenida en la primera columna era de color verdoso, se agregó la columna de óxido de aluminio. (modificación al método original).

Material:

- Matraces de 500 ml
- Probetas graduadas de 50 ml
- Embudos de separación de 500 ml
- Buretas graduadas de 50 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Embudos Buchner de 4 cm de diámetro
- Kitasatos de 500 ml

TABLA 12

CARACTERISTICAS DEL ALGA SPIRULINA UTILIZADA. (11)

HUMEDAD	10 %
GRASA	3 %
PROTEINAS	60 %
CARBOHIDRATOS	18 %
CENIZAS	9 %

TEXTURA : POLVO FINO

COLOR : VERDE OSCURO

OLOR Y SABOR : PARECIDO AL DE VEGETALES MARINOS.

Reactivos para la extracción de los pigmentos:

Mezcla de éter de petróleo, benceno y metanol, (9+1+3).

Mezclar 45 ml de éter de petróleo, 5 ml de benceno y 15 ml de metanol.

Solución saturada de cloruro de sodio. Se saturan 100 ml de agua destilada, con cloruro de sodio g.r.

Sulfato de sodio anhidro.

Reactivos para la separación cromatográfica:

Eter de petróleo y benceno (3+1). Mezclar 300 ml de éter de petróleo y 100 ml de benceno.

Benceno y éter etílico (3+1). Mezclar 300 ml de benceno y 100 ml de éter etílico.

Oxido de aluminio neutro, para cromatografía.

Carbonato de calcio, desecado a 150°C, durante dos horas.

Azúcar finamente molida.

Aparatos:

Agitador mecánico

Balanza granataria

Balanza de precisión

Baño maria con control de temperatura

Espectrofotómetro

Cubas de lectura en espectrofotómetro, de 1 cm de paso de luz.

Columnas cromatográficas:

En una bureta de 50 ml, se coloca en la parte inferior, un tapón de algodón. Después, una capa de 2 cm de arena

muy fina. Siguiendo el orden, se colocan 3 cm de óxido de aluminio, 6 cm de carbonato de calcio, y 8 cm de azúcar. Se cubre la última capa con un tapón de algodón. En otra bureta de 50 ml, se coloca su tapón de algodón, luego 10 cm de óxido de aluminio, y por último otro tapón de algodón.

Procedimiento:

a) Extracción de los pigmentos

Se pesan de 8 a 10 gramos de alga en polvo, (con esa cantidad de muestra, las columnas se tapan con las clo rofilas; por eso se pesan cantidades cercanas a 3 gramos).

La muestra se coloca en un matraz de 500 ml, con 200 ml de mezcla de éter de petróleo, benceno y metanol, (9+1+3).

La mezcla se sacude en agitador mecánico, durante una hora.

Se filtra a través de un embudo Buchner con papel filtro. El residuo se lava con 50 ml de mezcla de éter de petróleo, benceno y metanol (9+1+3).

El filtrado se pasa a un embudo de separación de 500 ml, y se lava con 100 ml de agua destilada helada; agitando la con suavidad, para evitar que se emulsione.

Se desecha la fase acuosa de metanol; en donde se encuen

tran disueltas xantofilas, (24). La fase restante; mezcla de carotenos y xantofilas, se lava con 50 ml de solución saturada de cloruro de sodio.

Se desecha la parte acuosa. Al resto se le quita humedad, filtrando a través de un poco de sulfato de sodio anhidro.

Se evapora al vacío, hasta tener 20 ml aproximadamente.

b) Separación cromatográfica

Se vierte todo el extracto, por el extremo superior de la columna empacada con azúcar, carbonato de calcio y óxido de aluminio.

Cuando se adsorbe casi todo, se añade, en porciones de 5 ml, mezcla de éter de petróleo y benceno (3+1). Las cantidades varían, ver los resultados en la tabla 12. Con esta mezcla, las clorofilas comienzan a rezagarse; los carotenoides bajan más rápido. Se agrega hasta que se separan los carotenos de las xantofilas.

Luego se eluye con mezcla de benceno y éter etílico, (3+1). En seguida, con éter etílico; las fracciones se recogen en tubos de ensaye, como se muestra en la figura 8.

Cada fracción se pasa a través de la columna de óxido de aluminio. Eluyendo con éter etílico.

Las fracciones se evaporan al vacío, casi a sequedad.

Se llevan a un volumen dado con acetona; ver en resultados, la tabla 12. Se leen las absorbancias, a 450 nm.

Se hacen cálculos comparando las absorbancias de las soluciones de muestra, a 450 nm, con las que se obtienen para la curva patrón de β -caroteno. Los datos para las soluciones patrón, se ajustan por mínimos cuadrados, según (2,3), dando la ecuación de una recta; al relacionar con el aforo y el peso de la muestra, dan:

$$\text{CCN (ppm)} = \frac{\text{CCN}_c \times \text{AP}_L}{\epsilon_{\text{mta}}}$$

Donde:

$$\text{CCN}_c = \frac{\text{ABS} - b}{m}$$

CCN (ppm) : Es la concentración en mg de β -caroteno por Kg de alga.

CCN_c : Es la concentración en mg de β -caroteno por litro; que se obtiene al leer directamente en la curva patrón; o al calcularla con la ecuación de la recta que se obtiene por mínimos cuadrados.

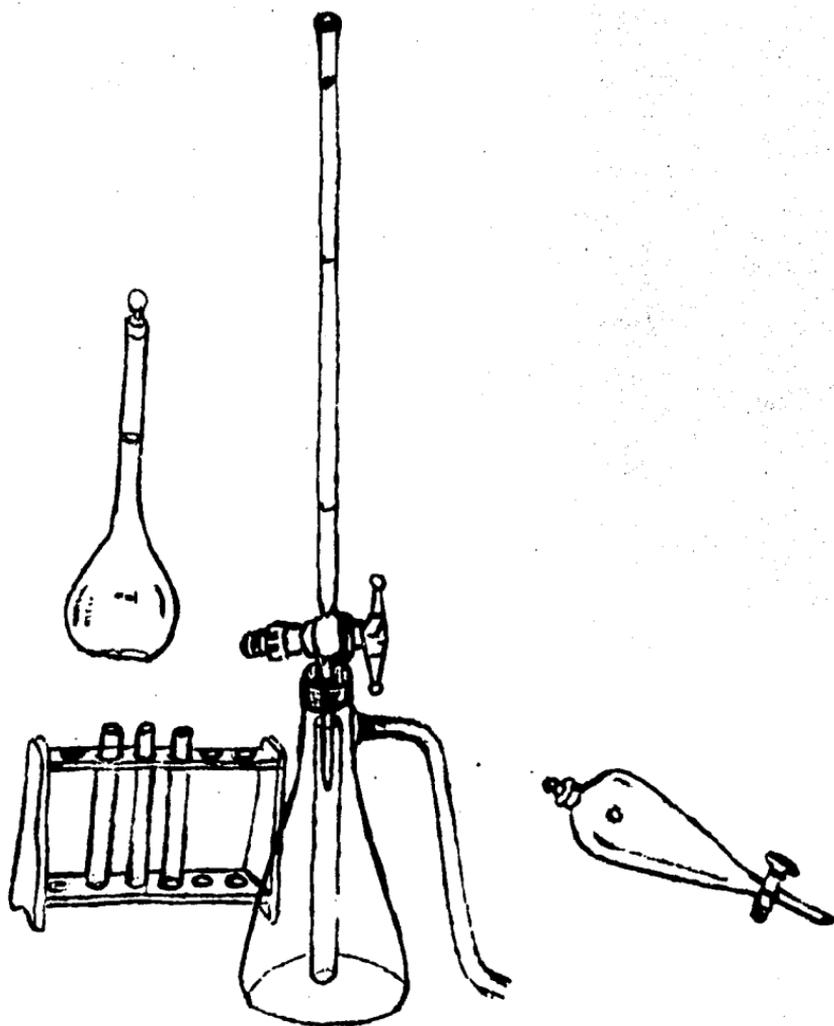


FIGURA 8

II. Método de la columna de óxido de aluminio, (26)

Material:

Matraces de 500 ml.

Matraces de 250 ml

Probetas graduadas de 50 ml

Buretas graduadas de 50 ml

Vasos de precipitados de 100 ml

Kitasatos de 500 ml

Embudos de separación de 250 y 500 ml

Reactivos para la extracción de los pigmentos:

Mezclas (1+1) de : acetona-etanol, acetona-hexano, y acetona-éter de petróleo.

Solución alcohólica de hidróxido de potasio al 10 %

Etanol absoluto

Eter etílico

Eter de petróleo

Sulfato de sodio anhidro

Reactivos para la separación cromatográfica:

Oxido de aluminio neutro, para cromatografía

Eter de petróleo

Mezclas de éter de petróleo y acetona, aumentando la cantidad de acetona; en las siguientes proporciones: 90+10, 80+20, 60+40, 40+60, 10+90.

Procedimiento:

a) Extracción de los pigmentos

Se pesan 10 gramos de alga en polvo; se coloca en un cartucho; se extrae en el aparato Soxhlet, con 200 ml de mezcla extractora. Se hace una evaluación preliminar de cada una de las mezclas extractoras, ver en resultados las tablas 13 y 14. Después de 6 horas se enfría.

Al extracto se le agrega 50 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio al 10 %, se hierve en baño maría, bajo reflujo, durante 30 minutos.

Enfriar, filtrar en Buchner, lavando con 20 ml de alcohol etílico absoluto. Enjuagar el matraz con 25 ml de éter etílico y filtrar a través del Buchner. Repetir los lavados, dos veces más.

Transferir a un embudo de separación de 500 ml, enjuagando el kitasato con 25 ml de éter etílico. Se separa el material jabonoso. Agregar 175 ml de agua destilada.

Cuando las capas se separan, se pasa la fase acuosa de alcohol a un embudo de separación de 250 ml. Esta fase se extrae 3 veces con porciones de 25 ml de éter etílico. Los extractos etéreos se juntan, los extractos acuosos se desechan. La solución etérea se lava 3 veces con porciones de 50 ml de agua destilada, descartando las fases acuosas.

A la solución resultante, se agrega 50 ml de éter de petróleo, y lavar 5 veces con porciones de 50 ml de agua destilada. Rotar e invertir cuidadosamente, para evitar emulsiones. Filtrar la solución etérea en un poco de sulfato de sodio anhidro.

La mezcla éter etílico-éter de petróleo se evapora al vacío, calentando en baño maria a 45-50 °C, concentrando hasta un volumen de 5 ml.

El concentrado se afora a 100 ml con éter de petróleo, se lee su absorbancia a 436 nm. Se calcula carotenoides totales con la ecuación de la recta obtenida por el método de los mínimos cuadrados y despejando a la concentración : (2,3)

$$CCN_c \text{ (ppm)} = \frac{CCN_c \times AP_L}{\epsilon_{mta}}$$

Donde:

$$CCN_c = \frac{ABS - b}{m}$$

CCN (ppm): Es la concentración en mg de β -caroteno por Kg de alga.

CCN_c : Es la concentración en mg de β -caroteno por litro, obtenida de la curva patrón.

b : Es la ordenada al origen, de la curva ajustada.

ABS : Es la absorbancia.

m : Es la pendiente de la recta ajustada.

Se pasa a la columna de óxido de aluminio una alícuota de 25 ml de la solución obtenida anteriormente, (que equivale a 2.5 gramos de muestra). Se comienza eluyendo con éter de petróleo.

Posteriormente, se eluye con mezclas de éter de petróleo-acetona, incrementando su poder eluyente, aumentando la cantidad de acetona. Las cantidades varían para cada experimento, agregando la siguiente mezcla de mayor poder eluyente, cuando, en la columna, las fracciones con color se detengan.

Las fracciones se evaporan y se aforan con éter de petróleo, leyéndose en el espectrofotómetro a 436 nm. Calculándose carotencidos, (la primera fracción es de β -caroteno; las siguientes son xantofilas), como se indica para calcular carotenoides totales.

Método de reparto en disolventes inmiscibles, (3).

Material:

Matraces de 250 y 500 ml

Aparato de extracción de Soxhlet

Probetas graduadas de 50 ml

Embudo Buchner

Embudos de separación de 250 y 500 ml

Condensador de reflujo

Reactivos para la extracción de los pigmentos:

Mezclas extractoras (1+1) de : acetona-etanol, acetona-hexano, acetona-éter de petróleo.

Solución alcohólica de hidróxido de potasio al 10 %

Etanol absoluto

Éter etílico

Éter de petróleo

Sulfato de sodio anhidro

Reactivos para la separación por reparto en disolventes inmiscibles:

Éter de petróleo

Metanol acuoso al 92 %

Aparatos :

Baño maría, con control de temperatura

Escala de precisión

Espectrofotómetro

a) Extracción de los pigmentos

Se pesan de 10 a 20 gramos de alga en polvo; se coloca en un

cartucho; se agrega 200 ml de mezcla extractora. Se coloca en el aparato de extracción Soxhlet. Después de 6 horas, enfriar.

Al extracto se le agrega 50 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio al 10 %, se hierve en baño maria, bajo reflujo, durante 30 minutos.

Enfriar, filtrar en embudo Buchner, lavando con 20 ml de alcohol etílico absoluto. Enjuagar el matraz con 25 ml de éter etílico y filtrar a través del Buchner. Repetir los lavados, dos veces más.

Transferir el contenido del kitasato, a un embudo de separación de 500 ml, enjuagando con 25 ml de éter etílico. Se separa el material jabonoso. Se agrega 175 ml de agua destilada, se invierte y rota el embudo de separación, cuidadosamente, para evitar que se emulsione.

Cuando las capas se separan, se pasa la fase acuosa de alcohol a un embudo de separación de 250 ml. Esta fase se extrae 3 veces con porciones de 25 ml de éter etílico. Los extractos etéreos se juntan, los acuosos se desechan. La solución etérea se lava con porciones de 50 ml de agua destilada, 3 veces; descartando las fases acuosas.

A la solución etérea resultante, se agrega 50 ml de éter de petróleo, y lavar 5 veces con porciones de 50 ml de agua destilada. Rotar e invertir el embudo de separación, cuidadosamente, para evitar que se emulsione. Filtrar la solución eté

rea en un poco de sulfato de sodio anhidro.

La mezcla de éter etílico-éter de petróleo se evapora al vacío, calentando en baño maria a 45-50 °C, concentrando hasta un volumen de 5 ml, aproximadamente.

El concentrado se afora a 100 ml con éter de petróleo, se lee su absorbancia a 436 nm. Se calcula carotenoides totales, como antes se establece, con la ecuación:

$$CCN_c \text{ (ppm)} = \frac{CCN_c \times AP_L}{\epsilon_{m\lambda}}$$

Donde:

$$CCN_c = \frac{ABS - b}{m}$$

CCN (ppm): Es la concentración en mg de β -caroteno por Kg de alga.

CCN_c : Es la concentración en mg de β -caroteno por litro; que se obtiene al leer directamente en la curva patrón; o al calcularla con la ecuación de la recta resultante por el método de los mínimos cuadrados.

A_{BS} : Es la absorbancia de la solución

b : Es la ordenada al origen, de la recta que se logra con el ajuste por mínimos cuadrados.

m : Es la pendiente de la recta mencionada anteriormente.

b) Separación de carotenos y xantofilas, (3).

De la solución anterior, tomar una alícuota de 25 ml, (que equivale a 2.5 gramos de muestra), y pasarla a un embudo de separación de 250 ml

Enjuagar con éter de petróleo, y diluir aproximadamente a 100 ml. Agregar 15 ml de metanol al 92 %, agitar moderadamente, durante dos minutos. Dejar reposar hasta que se separen las dos fases.

Retirar la fase metanólica, que contiene las xantofilas, retirar las extracciones, hasta que la fase metanólica no tenga color.

Lavar la fase de éter de petróleo, con porciones de 25 ml de agua destilada, repetir 5 veces.

Pasar la solución de éter de petróleo, a través de papel filtro, que contenga un poco de sulfato de sodio anhidro; aforar con éter de petróleo a 10 ml. Leer absorbancia a 436 nm. Se calcula el contenido de carotenos (principalmente -caroteno), como se dice en el cálculo de carotenoides totales, con la ecuación :

$$CCN (pom) = \frac{CCN \times AF_L}{c \cdot \epsilon_{mta}}$$

1.3 Curva patrón

El β -caroteno que se toma como patrón, fue proporcionado por la compañía Roche. Es una solución oleosa al 30 %, (con aceite de maní). Según (12), se puede utilizar como patrón.

Cristalización del β -caroteno, (2):

Se disuelven de 100 a 300 mg de solución aceitosa de β -caroteno, en 5 a 6 ml de disulfuro de carbono.

Agregar de 35 a 40 ml de etanol absoluto. Enfriar en hielo, durante una hora, para asegurar una máxima cristalización.

Filtrar a través de papel filtro. Disolver los cristales en 5 a 6 ml de disulfuro de carbono. Agregar 40 ml de éter de petróleo, y enfriar en hielo.

Nuevamente filtrar; secar los cristales en desecador al vacío, durante una hora.

Pesar los cristales purificados, y diluir a las concentraciones indicadas en (2,3), en forma separada, con éter de petróleo y acetona. Como se indica en la bibliografía anteriormente mencionada, se ajustan los datos a la mejor recta, por el método de los mínimos cuadrados. Luego se relaciona con el aforo, y con la cantidad de muestra usada, se despeja a la concentración, de donde tenemos:

Para éter de petróleo:

$$CCN_c = 5.033 \text{ ABS} - 0.1852$$

$$CCN(\text{ppm}) = \frac{(5.033 \text{ ABS} - 0.1852) AP_L}{\epsilon_{mta}}$$

Para acetona:

$$CCN_c = 3.067 \text{ ABS}$$

$$CCN(\text{ppm}) = \frac{(3.067 \text{ ABS}) AP_L}{\epsilon_{mta}}$$

Ver las figuras 9 y 10.

Donde:

CCN_c : Es la concentración, en mg de β -caroteno por litro. Se obtiene de la recta ajustada.

ABS : Es la absorbancia. Para éter de petróleo, a 436 nm; y para acetona, a 450 nm, (2,3).

CCN (ppm) : Es la concentración que resulta al relacionar CCN_c con el aforo total y con la cantidad de muestra, en gramos.

AF_L : Es el aforo total, en mililitros.

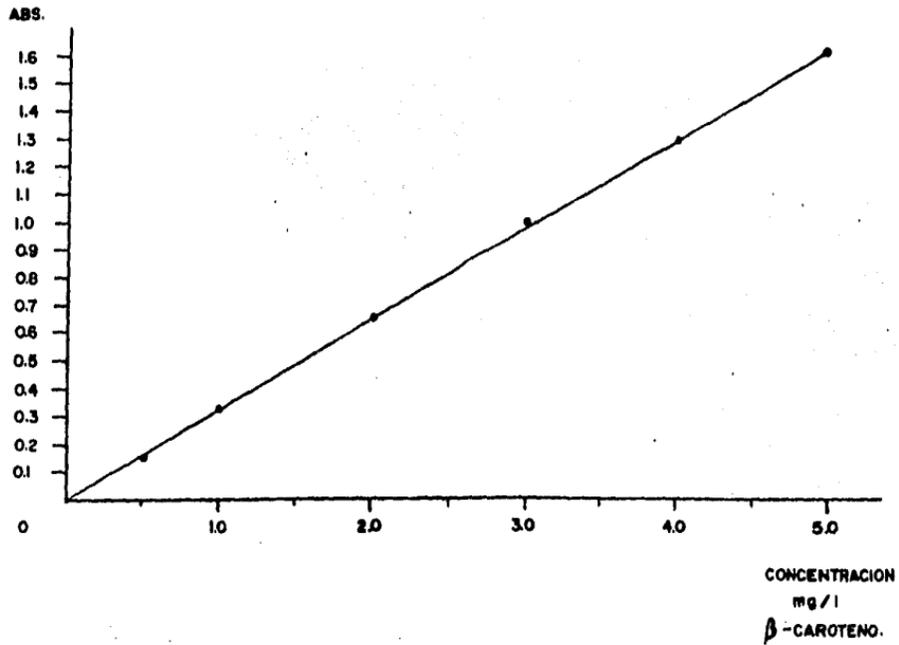


FIGURA 9
CURVA PATRON DE β -CAROTENO EN ACETONA
 $\lambda = 480 \text{ nm}$

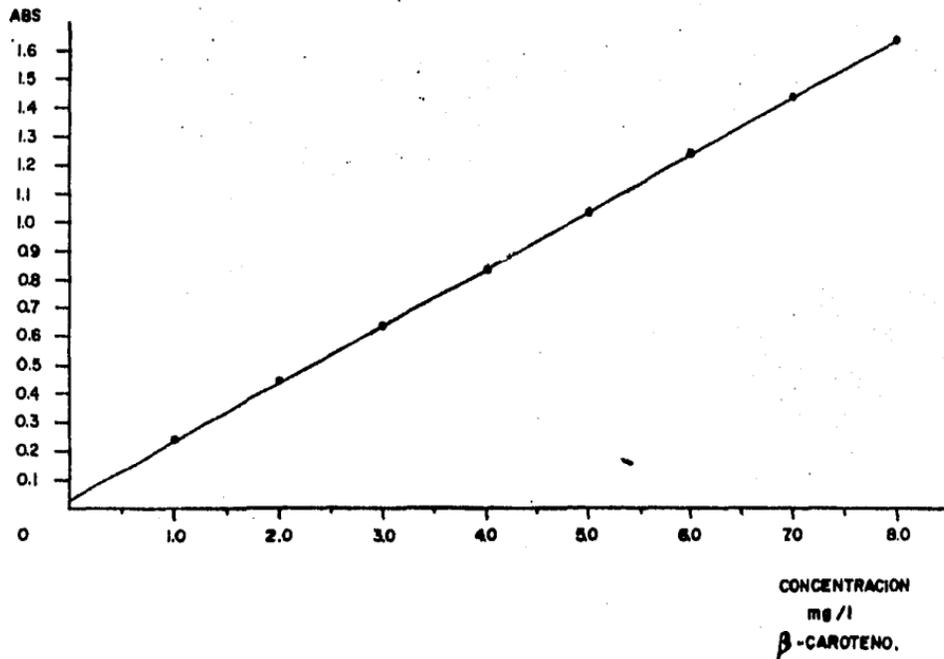


FIGURA 10

CURVA PATRON DE β -CAROTENO EN ETER DE PETROLEO
 $\lambda = 436 \text{ nm}$

3.4 Resultados

Para el método de las dos columnas, los datos muestran que, su procedimiento de extracción de los pigmentos, origina cantidades ligeramente menores de carotenoides. Aumentando su contenido en clorofilas, notándose esto, por el color verdoso del extracto.

En el proceso de separación, las clorofilas se quedan en la parte superior de la primera columna, entonces se tarda más la separación de los pigmentos, o se tapa completamente la columna. Aunado esto, con el aumento de la compactación del adsorbente, por uso y por efecto del vacío aplicado.

Unicamente, el espectro de la primera fracción obtenida después de la segunda columna, concuerda con el espectro del β -caroteno patrón.

El experimento se repitió al menos diez veces, pero como los resultados fueron muy irregulares, solo se reportan los de las tablas, más adelante.

En el método de la columna de óxido de aluminio, se utiliza nada más la solución resultante, de la mezcla extractora acetona-hexano, que es más efectiva, (ver las tablas 13 y 14).

Con el uso de la saponificación, se evita el problema de la gran cantidad de clorofilas, aunque deben degradarse algunos carotenoides.

Como en el método de las dos columnas, los tiempos de trabajo, y resultados son irregulares.

En el método de reparto en disolventes inmiscibles, se usa el mismo tipo de extracción que se utiliza para el método de la columna de óxido de aluminio. Aquí se utilizan las tres soluciones resultantes, que corresponden a cada una de las mezclas extractoras. Mediante esta técnica el proceso es más ordenado.

Aunque en algunas ocasiones, los métodos cromatográficos dan mayores cantidades de carotenos, se puede observar, que el método de reparto da resultados más regulares.

I. Con el método de las dos columnas

TABLA 13

Muestra en gramos	Aforo ml	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
10.12	25	0.688	5.21
3.20	10	0.456	4.37
3.10	6.5	0.179	1.15

Se obtiene una sola fracción en cada experimento, el resto se queda fuertemente adsorbido en la columna.

Se afora con acetona, se leen absorbancias a 450 nm.

Se hacen cálculos con :

$$CCN \text{ (ppm)} = \frac{3.067 \text{ABS} \times AP_L}{\epsilon_{mta}}$$

- II. Con el método de la columna de óxido de aluminio
 a) Separación previa de los pigmentos

TABLA 14

CAROTENOIDES TOTALES

Mezcla extractora No.	Muestra en gramos	Aforo ml	Absorbancia	Concentración en la Muestra Carotenoides ppm
1	20	500	0.217	22.67
2	10	100	0.526	24.62
3	10	100	0.246	10.52

Donde: Las mezclas extractoras son:

- 1.- acetona-etanol
- 2.- acetona-hexano
- 3.- acetona-éter de petróleo

Los pigmentos se disuelven en éter de petróleo.

Separación previa de los pigmentos

TABLA 15

CAROTENOS

Mezcla extractora No.	Muestra en gramos	Aforo ml	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenos ppm
1	0.4	4.7		1.78
2	1	7.5		3.21
3	1	4.9		0.96

Se utiliza el método por reparto en disolventes inmiscibles; los pigmentos se disuelven en éter de petróleo. La mezcla acetona-hexano, parece ser la más efectiva.

b) Separación con la columna de óxido de aluminio

TABLA 16

Fracción obtenida con	Absorbancia	Aforo ml	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
Eter de petróleo	0.280	10	4.89
M(9 + 1)	0.090	10	1.07
M(8 + 2)	0.047	10	0.20
M(6 + 4)	0.116	6	0.95
M(4 + 6)	0.081	5	0.44

Se utiliza una alícuota de 25 ml (2.5 gramos de muestra), de la solución resultante de la extracción en acetona-hexano.

Las fracciones evaporadas se disuelven en éter de petróleo, las absorbancias se leen a 436 nm.

Se usan de 50 a 70 ml de cada mezcla eluyente.

Se calcula carotenoides con :

$$CCN \text{ (ppm)} = \frac{(5.03EABS - 0.1852) AF_1}{\epsilon_{mta}}$$

Otro experimento con la columna de Al_2O_3

TABLA 17

Fracción obtenida con	Absorbancia	Aforo ml	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
Éter de petróleo	0.166	10	2.60
M(9 + 1)	0.377	10	6.84
M(8 + 2)	0.134	10	1.95

Donde : $M(x + y)$, es la mezcla de éter de petróleo-acetona, (eluyente), en la proporción indicada.

ABS, es la absorbancia a 436 nm.

AF_L , es el aforo en ml.

g_{mta} , es el peso de la muestra en gramos.

Se utiliza de 70 a 150 ml de mezcla eluyente, para obtener cada fracción.

III. Con el método de reparto en disolventes inmiscibles.

Con tres mezclas extractoras (1 + 1)

- 1.- acetona-etanol
- 2.- acetona-hexano
- 3.- acetona-éter de petróleo

Para la cuantificación de carotenoides totales, se usa 10 g de muestra, se afora a 100 ml, con éter de petróleo.

Para valorar la cantidad de carotenos, se usa una alícuota de 10 ml; se afora con éter de petróleo.

Se hacen cálculos con:

$$CGN \text{ (ppm)} = \frac{(5.033ABS - 0.1852) A P_L}{E_{mta}}$$

TABLA 18
CAROTENOIDES TOTALES

Extracción No.	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
1 *	0.217	22.67
2	0.488	22.70
3	0.425	19.53
4	0.460	21.29
5	0.525	24.57
6	0.483	22.45
7	0.420	19.28
8	0.415	19.03
9	0.513	23.96
10	0.475	22.05
11	0.435	20.04
12	0.425	19.53
13	0.438	20.19
14	0.425	19.53
15	0.445	20.54

Con mezcla extractora acetona-etanol (1 + 1)

* se utiliza 20 g de muestra y se afora a 500 ml.

TABLA 19

CAROTENOS SEPARADOS POR REPARTO

Extracción	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenos ppm
1	0.100	1.59
2	0.070	1.67
3	0.073	1.82
4	0.072	1.77
5	0.071	1.72
6	0.069	1.62
7	0.073	1.82
8	0.071	1.72
9	0.071	1.72
10	0.073	1.82
11	0.072	1.77
12	0.072	1.77
13	0.074	1.87
14	0.075	1.82
15	0.077	2.02

Se usa la solución que es originada por la mezcla extractora acetona-etanol (1 + 1).

TABLA 20
CAROTENOIDES TOTALES

Extracción No.	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
1	0.526	24.62
2	0.502	23.41
3	0.551	25.87
4	0.561	26.38
5	0.569	26.78
6	0.529	24.77
7	0.533	24.97
8	0.547	25.67
9	0.524	24.52
10	0.527	24.67
11	0.564	26.53
12	0.538	25.22
13	0.585	27.59
14	0.574	27.03
15	0.530	24.82

Con mezcla extractora acetona-hexano (1 + 1).

TABLA 21
 CAROTENOS SEPARADOS POR REPARTO

Extracción No.	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenos ppm
1	0.095	2.92
2	0.098	3.08
3	0.092	2.77
4	0.093	2.82
5	0.096	2.97
6	0.097	3.03
7	0.099	3.13
8	0.094	2.87
9	0.100	3.18
10	0.094	2.87
11	0.096	2.97
12	0.097	3.03
13	0.100	3.18
14	0.099	3.13
15	0.103	3.33

Se usa la solución que es originada por la mezcla extractora acetona-hexano (1 + 1).

TABLA 22
CAROTENOIDES TOTALES

Extracción No.	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenoides ppm
1	0.246	10.52
2	0.260	11.23
3	0.261	11.28
4	0.273	11.88
5	0.255	10.98
6	0.272	11.83
7	0.263	11.38
8	0.256	11.03
9	0.274	11.93
10	0.254	10.93
11	0.245	10.47
12	0.253	10.88
13	0.251	10.78
14	0.257	11.08
15	0.247	10.57

Con mezcla extractora acetona-éter de petróleo.

TABLA 23
CAROTENOS SEPARADOS POR REPARTO

Extracción No.	Absorbancia	Concentración en la muestra Carotenos ppm
1	0.078	1.04
2	0.076	0.99
3	0.082	1.14
4	0.080	1.09
5	0.072	0.88
6	0.070	0.83
7	0.071	0.86
8	0.074	0.94
9	0.082	1.14
10	0.071	0.86
11	0.081	1.11
12	0.083	1.16
13	0.077	1.01
14	0.073	0.91
15	0.075	0.96

Se usa la solución que se origina con la mezcla extractora acetona-éter de petróleo.
 Todas estas extracciones se aforaron a 5 ml.

4.- CONCLUSIONES

El análisis realizado y la información obtenidas, nos lleva a concluir, que el alga *Spirulina* es una buena fuente de carotenoides.

Hay que tomar en cuenta, que se trabajaron con muestras almacenadas, en las que parte de los carotenoides originalmente presentes, pudieron haberse degradado. Por otra parte, pudo haberse hecho una extracción parcial, previa, de los pigmentos. Lo mejor sería cuantear los carotenoides en producto fresco.

El valor económico del alga *Spirulina* es notable, porque además de los carotenoides, su contenido proteínico es grande, lo que haría más costeable el proceso de extracción de los pigmentos.

Los métodos, tanto cromatográficos como de reparto, son caros y efectivos, pero pueden llevar a productos de alta pureza, que tienen aplicación como patrones, y en estudios biológicos. Por consiguiente, como los extractos crudos son más económicos, pueden ser usados directamente como colorantes de alimentos.

5.- BIBLIOGRAFIA

1. Abbot D.; Andrews R.S.
Introducción a la cromatografía
Editorial Alhambra, México, 1982
2. Association of official agricultural chemists
Official methods of analysis, 1965
3. Association of official agricultural chemists
Official methods of analysis, 1970
4. Braverman J.B.S.
Introducción a la bioquímica de los alimentos
Editorial El Manual Moderno S.A., México, 1980
5. Badui D.S.
Química de alimentos
Editorial Alhambra, México, 1981
6. Cassidy H.G.
Adsorption Analysis III
J. Am. Chem. Soc., 62, 3076 (1940)
7. Cassidy H.G.
Adsorption Analysis
Tswett Chromatographic Method
J. Chem. Ed., 16, 88, (1939)

8. Devore G. Muñoz M.E.
Química orgánica
Publicaciones Cultural S.A., México, 1979
9. Dominguez X.A.
Química orgánica experimental
Editorial Limusa, México, 1982
10. Fieser L.F., Fieser M.
Química Orgánica Superior
Ediciones Grijalbo S.A., México, 1966
11. Garcia B.S.E.
Estudio para la utilización de Spirulina sp como
nueva fuente de proteínas.
Tesis, ENCB, IPN, 1978
12. Guel M.R.M.
Análisis de métodos experimentales para la obten
ción de carotenos a partir de alfalfa.
Tesis, Facultad de Química, UNAM, 1979
13. Jacobs M.B.
The chemical Analysis of Foods and Food Products.
D. Van Nostrand Company Inc., 1958
14. Lederer E.; Lederer M.
Chromatography
Editorial Elsevier, N.Y., 1957

15. Martínez N.N.G., Wilfredo P.J.
Chromatographic separation of pigments in Spirulina maxima.
Carib. J. Sci., 211, 11 (3-4). Sep-Dec. 1971
16. Myer F.
Methods of vitamin assays
Interscience Publishers
John Wiley & Sons, 1965
17. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Organización mundial de la salud.
Normas de identidad y de pureza para los aditivos alimentarios.
Vol. II
FAO, ONU, 1963
18. Pontes M.A.
Estudio de la productividad de un cultivo semi natural de Spirulina, para explotación industrial.
Tesis, ENCB, IPN, 1973
19. Santillan C.
Las algas microscópicas, como fuente de alimentos.
XI Congreso Nacional de la Asociación de técnicos en alimentos de México.
Tecnología de Alimentos, 6(5), Sep-Oct, México, 1971.

20. Santillan C., Parra P., Romo L.
Avances en el desarrollo de productos alimenticios,
a partir de Spirulina.
IX Congreso Internacional de Nutrición. México, 1971
21. Shearon W.H. Jr., Gee F.O.
Carotene and Chlorophyll
Industrial and Engineering Chemistry; 41, 218 (1949)
22. Sosa Texcoco
Proyecto para la instalación de una planta piloto
de alga Spirulina, con capacidad de 1 Ton/día.
México, 1972
23. Smallwood W.L.; Green E.R.
Biología
Publicaciones Cultural S.A., 1974
24. Strain H.H.
Adsorption. Vol. II
Interscience Publishers
John Wiley & Sons, 1952
25. Strohecker R.; Henning H. W.
Vitamin Assay. Teste Methods
Verlag Chemie. GmbH, 1966

26. Winton A.L.; Winton K.B.
Análisis de alimentos
Editorial Reverte, 1958