

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA DEL CAROTENOIDE ASTAXANTINA EN
EL JERBO *MERIONES UNGUICULATUS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

FRANCISCO SANDOVAL BECERRIL



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Marina Gavilanes Ruiz

Vocal Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Secretario Prof. Gladis Coral Hinostrosa

1er Suplente Prof. Luis Tonatihut Sanchez Linares

2do. Suplente Prof. Vanessa Maya Ampudia

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

“Salvador Zubirán”

Departamento de Nutrición Animal y

Departamento de Bioquímica

Dra. Gladis Coral Hinostrosa

Asesor

Francisco Sandoval Becerril

Sustentante

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química por haberme dado la oportunidad de desarrollarme académicamente, profesionalmente y personalmente.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, en especial a los departamentos de Nutrición Animal y Bioquímica, por haberme dado las facilidades para la realización de esta tesis.

A la Dra. Gladis Coral por haber dirigido este trabajo y darme parte su experiencia, tiempo, dedicación, confianza, consejos y amistad. Además de brindarme la oportunidad de trabajar dentro de la investigación científica y siempre conducir mis pasos por un excelente camino.

A la QFB. Margarita Díaz por haber colaborado conmigo, sobre todo en aquellos momentos difíciles en el trabajo experimental, siempre fuiste una guía y aliada muy importante para mí. Además te agradezco haberme dado tu amistad.

A mis sinodales, la Dra. Marina Gavilanes y el Dr. Javier Plasencia por su aportación a esta tesis.

A todos mis compañeros dentro del Instituto de Nutrición por haber hecho mi estancia placentera y agradable.

DEDICATORIAS:

A mis padres: Benito y Amelia les dedico esta tesis ya que sin su apoyo no hubiera terminado todo este trabajo. Gracias por estar siempre conmigo. Los quiero mucho y para mi son los mejores padres del mundo.

Siempre sus consejos y guía fueron muy importantes, aunque a veces parezca que no los escucho.

A mis hermanos Rodrigo y Cristina que son parte importante en mi vida y gracias por su aguante para conmigo y les deseo mucho éxito en sus vidas profesionales. Sepan que estaré cuando me necesiten.

A mis tíos Pepe y Malenita por darme su apoyo en mis proyectos, además de siempre consentirme, sepan que son como unos segundos padres para mí. Muchas gracias.

A Tere y Pao que son parte de mi familia. Pao muy pronto aprenderás a leer y podrás leer mi tesis.

A mis amigos de la Facultad: Victor, Cynthia, Andrea, Ivan R., Ross, Nallely, Pepe, Physhu, Cesar, Alejandra, Antonieta, Susana, Lucy, Kyoko, Mario, Carlos, Griselda, Edwin, Viridiana, Saúl, Armando, Ivan, Jackie, Paulina, Yu, Martha, Silvia, Vanesa e Ivon; que sigamos siendo amigos por siempre.

A mis primos Cynthia, Erik, Katya, Saúl, Irais, Diego y Mauricio por que además de ser familiares somos amigos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. ANCECEDENTES	4
3.1 Marco teórico	4
3.1.1 Breve historia de la astaxantina	4
3.1.2 Propiedades físicas y químicas de la astaxantina	4
3.1.3 Distribución de la astaxantina en la naturaleza	8
3.1.4 Importancia de la astaxantina	14
3.1.5 Funciones biológicas de la astaxantina	15
3.2 Metabolismo de la astaxantina	17
3.2.1 Absorción	17
3.2.2 Distribución	19
3.2.3 Biotransformación	20
3.2.4 Eliminación	24
3.3 Farmacocinética	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Obtención de la astaxantina utilizada en el experimento	27
4.1.1 El acocil <i>Procambarus bouvieri</i>	27
4.1.2 Obtención de la harina de acocil	27
4.1.3 Extracción y cálculo de carotenoides en la harina de acocil	28

4.1.4 Estudio cualitativo y cuantitativo de astaxantina en la harina de acocil	30
4.2 Modelo experimental	32
4.2.1 El jerbo <i>Meriones unguiculatus</i>	32
4.2.2 Manejo de los animales	33
4.2.3 Elaboración de las dosis	33
4.3 Etapa I	34
4.3.1 Diseño experimental	34
4.3.2 Dosificación	34
4.4 Etapa II	36
4.4.1 Diseño experimental	36
4.4.2 Dosificación	36
4.5. Obtención de muestras en ambas etapas del estudio	37
4.5.1 Sacrificio de los jerbos	37
4.5.2 Sangre y Plasma	37
4.5.3 Lipoproteínas	38
4.5.3.1 Fraccionamiento del plasma	39
4.5.3.2 Determinación de densidad de las fracciones de plasma	40
4.5.3.3 Estudios bioquímicos de las fracciones de plasma	41
4.5.3.3.1 Proteínas	41
4.5.3.3.2 Colesterol	41
4.5.3.3.3 Triglicéridos	42
4.5.4 Intestino	42
4.5.5 Hígado	43
4.5.6 Heces	43

4.6 Estudio cualitativo y cuantitativo de astaxantina en ambas etapas del estudio	44
4.6.1 Extracción de astaxantina de las muestras	44
4.6.1.1 Del plasma y lipoproteínas	44
4.6.1.2 Del intestino, hígado y heces	44
4.6.2 Determinación de astaxantina por HPLC	45
4.6.2.1 Equipo y condiciones cromatográficas	45
4.6.2.2 Preparación de patrones	46
4.6.2.2.1 Patrón de astaxantina libre	46
4.6.2.2.2 Patrones de astaxantina esterificada	47
4.6.2.2.3 Patrón de β -caroteno	47
4.6.2.3 Determinación de astaxantina en plasma y lipoproteínas	48
4.6.2.4 Determinación de astaxantina en hígado, intestino y heces	49
4.7 Análisis estadístico	50
4.8 Farmacocinética de astaxantina en plasma	51

V. RESULTADOS

5.1 Estudio cualitativo y cuantitativo de carotenoides y de astaxantina en la harina de acocil	53
5.1.1 Valoración espectrofotométrica	53
5.1.2 Estudio cromatográfico en capa fina (TLC)	54
5.1.3 Estudio por cromatografía líquida (HPLC)	56

5.1.3.1 Patrones	56
5.1.3.2 Extracto crudo de la harina de acocil	58
5.2 Resultados de la etapa I	59
5.2.1 Astaxantina en plasma	59
5.2.2 Lipoproteínas de plasma	60
5.2.2.1 Determinación de densidad	60
5.2.2.2 Determinación de proteínas	60
5.2.2.3 Determinación de colesterol	61
5.2.2.4 Determinación de triglicéridos	61
5.2.2.5 Clasificación de las lipoproteínas	61
5.2.3 Astaxantina en lipoproteínas del plasma	62
5.2.4 Astaxantina en hígado	63
5.2.5 Astaxantina en intestino	64
5.2.6 Astaxantina en heces	66
5.3 Resultados de la etapa II	69
5.3.1 Astaxantina en plasma	69
5.3.2 Astaxantina en lipoproteínas	69
5.3.3 Astaxantina en hígado	70
5.3.4 Astaxantina en intestino	70
5.3.5 Asataxantina en heces	72
5.4 Farmacocinética de la astaxantina en plasma	74
5.4.1 Tiempo de máxima eliminación por heces	75
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76

VII. CONCLUSIONES	83
VIII. BIBLIOGRAFÍA	85

RESUMEN

Astaxantina, es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra en forma más abundante en invertebrados acuáticos como los crustáceos y en vertebrados como peces salmónidos. El compuesto, tanto en su forma natural como sintética, es utilizado tradicionalmente como aditivo pigmentante en la acuicultura, sin embargo, en la actualidad su utilización como suplemento dietético en humanos es creciente debido a sus propiedades benéficas en la salud. Investigaciones realizadas en las últimas dos décadas han demostrado que la astaxantina desempeña funciones biológicas importantes favorecidas por su alto poder antioxidante y reductor de radicales libres. Entre ellas, función antiinflamatoria, inmunoestimulante, inhibidora de crecimiento bacteriano, agente anticancerígeno y neuroprotector.

Los mamíferos, entre ellos el hombre, dependen de la dieta para poder beneficiarse de este compuesto. Por lo tanto, los crustáceos o peces salmónidos utilizados como alimento representan una fuente natural de astaxantina.

El objetivo de la presente investigación fue estudiar el aprovechamiento metabólico de la astaxantina del acocil *Procambarus bouvieri* en el jerbo *Meriones unguiculatus*, partiendo de la hipótesis de que este carotenoide puede ser absorbido en dicho modelo experimental a pesar de su alto nivel de esterificación. Un objetivo particular fue determinar los parámetros farmacocinéticos en plasma.

La astaxantina utilizada en las dosis experimentales fue extraída con disolventes orgánicos a partir de harina de acocil. Después de su obtención, ésta fue caracterizada y cuantificada por espectrofotometría, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El contenido de astaxantina en el extracto oleoso obtenido fue de 342 mg/kg, constituido por la forma diesterificada (28%), la monoesterificada (47%) y la libre (20%), de ésta última las proporciones de los isómeros geométricos *trans* y *cis* fueron del 85 y del 15%, respectivamente. La investigación contempló dos etapas: I, en la que se utilizaron 36 jerbos machos (82 g) distribuidos en 6 grupos (n=6) con una dosis oral única equivalente a 1mg de astaxantina por kg de peso vivo después de la cual fueron sacrificados

a las 6, 12, 18, 24, 48, y 96 h. Una etapa II, en la que se utilizaron 30 jerbos machos (85 g) distribuidos en 5 grupos (n=6) con una dosis oral única equivalente a 5 mg/kg y sacrificados después de las 3, 6, 12, 24 y 48 h. Un grupo adicional (n=6) sin dosis de astaxantina fue utilizado como testigo. Después del sacrificio se colectaron muestras de sangre (plasma), intestino (duodeno), hígado y heces para la determinación cuantitativa y cualitativa de astaxantina por HPLC. Se determinó también el contenido de astaxantina en lipoproteínas VLDL, LDL y HDL. Las lipoproteínas fueron obtenidas por el método de gradiente isopícnico con Iodixanol (Optiprep) y ultracentrifugación seguido de un fraccionamiento del plasma y caracterización bioquímica. En plasma y lipoproteínas, se detectó sólo astaxantina libre en ambas etapas de estudio con una concentración máxima de $0.023 \pm 0.014 \mu\text{g/mL}$ (etapa I) y $0.111 \pm 0.014 \mu\text{g/mL}$ (etapa II). En hígado no fue detectado este carotenoide. En intestino y heces, el compuesto se presentó con ligera modificación con respecto a la dosis en la etapa I, mientras que en la etapa II, éste se observó principalmente en forma libre y con mayor contenido de isómeros *cis*. El contenido de astaxantina en heces representó alrededor del 98% del total determinado en todas las muestras estudiadas.

Las lipoproteínas VLDL presentaron el mayor contenido de astaxantina (56%) a las 12 h seguido por las LDL (44%). El estudio farmacocinético se realizó con los datos obtenidos de la etapa I mediante un modelo abierto de un compartimiento de administración oral. Los parámetros calculados y obtenidos fueron: constante de eliminación ($K_e = 0.0152 \text{ h}^{-1}$), tiempo de vida media ($t_{1/2} = 45.6 \text{ h}$), tiempo de máxima absorción ($t_{\text{max}} = 12 \text{ h}$), tiempo de eliminación por heces ($t_e = 12 \text{ h}$).

Los resultados obtenidos permitieron concluir que en el jervo *Meriones unguiculatus* la astaxantina del acocil es absorbida en el intestino delgado después de una aparente hidrólisis favorecida por la mayor concentración del carotenoide. La astaxantina libre en su forma isomérica *trans* es captada selectivamente en plasma y es transportada principalmente por las lipoproteínas VLDL.

La presente investigación permite concluir además que el extracto oleoso obtenido de los residuos de crustáceos comestibles como el acocil puede ser utilizado como fuente de un micronutriente eficiente a juzgar por sus propiedades antioxidantes.

I. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides representan el grupo más grande de los pigmentos naturales y probablemente son los más importantes desde el punto de vista nutricional y de salud humana. El papel más importante de estos compuestos es el de servir de base estructural para la síntesis de vitamina A en mamíferos. Dada la incapacidad de estos organismos para sintetizar dicho micronutriente, dependen de la dieta para la incorporación de carotenoides precursores, los que a su vez se encuentran en el 20% de los 600 carotenoides hasta hoy descritos (Oslo, 1999).

Además de la importancia provitamínica de dichas sustancias, en la actualidad se les atribuye otras funciones biológicas no menos importantes, en particular, al grupo de xantofilas. Las xantofilas son carotenoides que poseen grupos oxigenados en su molécula. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en muchos casos, son depositadas selectivamente en tejidos animales con funciones biológicas no del todo conocidas hasta el presente. La astaxantina es una xantofila abundante en bacterias, algas marinas, levaduras, invertebrados marinos y de agua dulce y en peces, principalmente los salmónidos. Durante las dos últimas décadas las investigaciones sobre este compuesto se han incrementado vertiginosamente demostrando su poder antioxidante como reductor de radicales libres y singuletes de oxígeno, mayor aún que del β -caroteno y del α -tocoferol (Kurashige y col., 1990; Palozza y col., 1992; Matsushita y col., 2000; Kurihara y col., 2002). A estas funciones bien caracterizadas con anterioridad, se han añadido otras, como por ejemplo el papel estimulante de la respuesta inmune (Jyonouchi y col., 1995), el efecto antiinflamatorio (Suzuki y col., 2005) y el anticancerígeno (Chew y col., 1999), funciones que ilustran la relevancia de este carotenoide en el campo de salud preventiva.

Los antecedentes que alentaron la realización del presente estudio fue la demostración en humanos del efecto antioxidante de la astaxantina de krill en lipoproteínas de baja densidad (Iwamoto, 2000), y de la astaxantina disuccinato de sodio (Cardax TM) en neutrófilos humanos (Cardounel y col., 2003).

Tomando en consideración que la astaxantina y sus ésteres, son los principales carotenoides en los crustáceos (Goodwin, 1986), se podría afirmar que estos invertebrados en la dieta humana representan una de las principales fuentes del pigmento, capaz de ser absorbido eficientemente. Adicionalmente, es sabido que el caparazón o exoesqueleto de los crustáceos poseen un alto contenido de astaxantina (Schiedt, 1998), por lo que la utilización de este subproducto como tal, podría servir de fuente alterna del carotenoide para uso animal o humano. Sin embargo, como sucede con todos los carotenoides, el aprovechamiento metabólico de estos compuestos depende de muchos factores entre los más importantes, su composición química, el contenido de lípidos en la dieta, el tamaño de la dosis, la forma de preparación antes de ser ingeridos, más otros inherentes a los organismos consumidores. Las investigaciones a este respecto en peces salmónidos son numerosas (Liaasen-Jesen, 1990; Page y col., 2005) pero en lo correspondiente a mamíferos y más aún en humanos, es todavía bastante escasa.

Los resultados de este trabajo permitirán obtener información valiosa para futuras investigaciones sobre la biodisponibilidad de la astaxantina de recursos comestibles y un mejor entendimiento sobre la utilidad potencial de un recurso hasta hoy no aprovechado, como son los desechos de crustáceos.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio fue investigar el metabolismo de la astaxantina proveniente del cefalotórax del acocil *Procambarus bouvieri* en el jerbo *Meriones unguiculatus*, después de la administración oral de dos dosis únicas de concentraciones diferentes.

Objetivos particulares.

- 1.- Determinar las diferencias metabólicas de las dosis de 1 mg de astaxantina por kg de peso vivo (1 mg/kg) y de 5 mg/kg, en el jerbo después de su dosificación oral única.
- 2.- Calcular los parámetros farmacocinéticos de la astaxantina en el plasma durante 96 h después de la dosis de 1 mg/kg.

III. ANTECEDENTES

3.1. MARCO TEÓRICO

3.1.1. Breve historia de la astaxantina

En 1933, Karrer y colaboradores aislaron por primera vez un pigmento rojo-naranja del crustáceo *Astacus spp* al cual denominaron astaceno. Años después, Kunh y Sörensen encontraron en los huevos del mismo crustáceo un pigmento diferente al compuesto anterior y de naturaleza esterificada, al que nombraron astaxantina (Karrer y col., 1950). En 1938, se caracterizó por primera vez tanto la estructura molecular de la astaxantina como la del astaceno, definiéndose a este último como un subproducto de la autoxidación de la primera, y a ambos, como los principales carotenoides que caracterizan a los crustáceos.

3.1.2. Propiedades físicas y químicas de la astaxantina

Como la mayoría de los carotenoides, la astaxantina posee 40 carbonos en su estructura. En su forma libre tiene como fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ con un peso molecular de 596.86 g/mol. Su estructura poliénica es similar al β -caroteno con 9 dobles enlaces conjugados y un anillo terminal en ambos extremos de la molécula, el cual posee dos grupos oxigenados, uno cetónico y otro hidroxilo, que la caracterizan como xantofila (Figura 1).

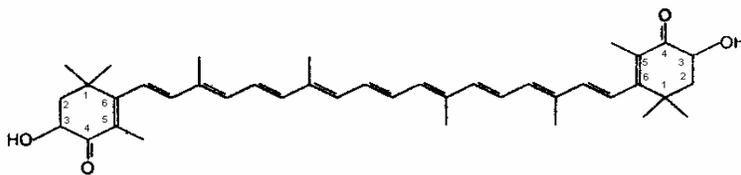


Figura 1. Estructura química de la astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno 4,4'-diona)

La astaxantina cristalina aislada tiene un punto de fusión de 224°C, es insoluble en soluciones acuosas y soluble en disolventes orgánicos (Karrer y col., *opcit*).

Debido a los grupos cromofóricos formados por 11 dobles enlaces conjugados, la máxima absorción de la astaxantina se presenta en el intervalo de luz visible entre 468-470 nm en hexano. Por la presencia de los dobles enlaces conjugados, la astaxantina, como todos los carotenoides, es poco estable, razón por la cual se puede degradar fácilmente con calor, luz blanca o solar, oxígeno, o con sustancias ácidas y alcalinas (Miki, 1990).

Los dos carbonos asimétricos de su molécula en las posiciones 3 y 3' permiten que la astaxantina presente tres isómeros ópticos, los cuales incluyen los enantiómeros idénticos (3S, 3'S), (3R, 3'R) y las formas racémicas (3R, 3'S), (3'R, 3S) (Johnson, 1991) (Figura 2).

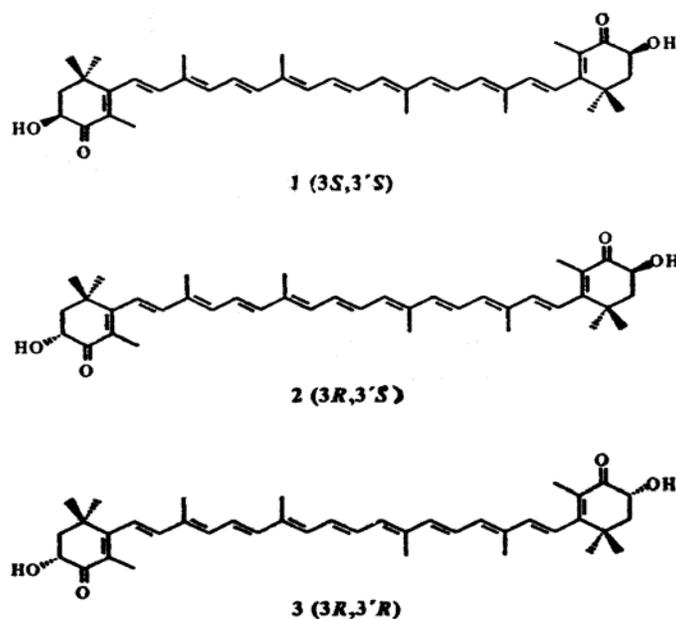


Figura 2. Isómeros ópticos de la astaxantina

La molécula presenta también isómeros geométricos. El isómero *trans* (*All-E*), forma más abundante de la astaxantina en la naturaleza, y los isómeros *cis* (*Z*), entre los cuales los más frecuentes son 9 *cis* (*9Z*), 13 *cis* (*13Z*) y 15 *cis* (*15Z*), como se muestra en la figura 3.

Las proporciones de dichos isómeros en los diferentes organismos vivos varían de especie a especie (Schiedt, 1990).

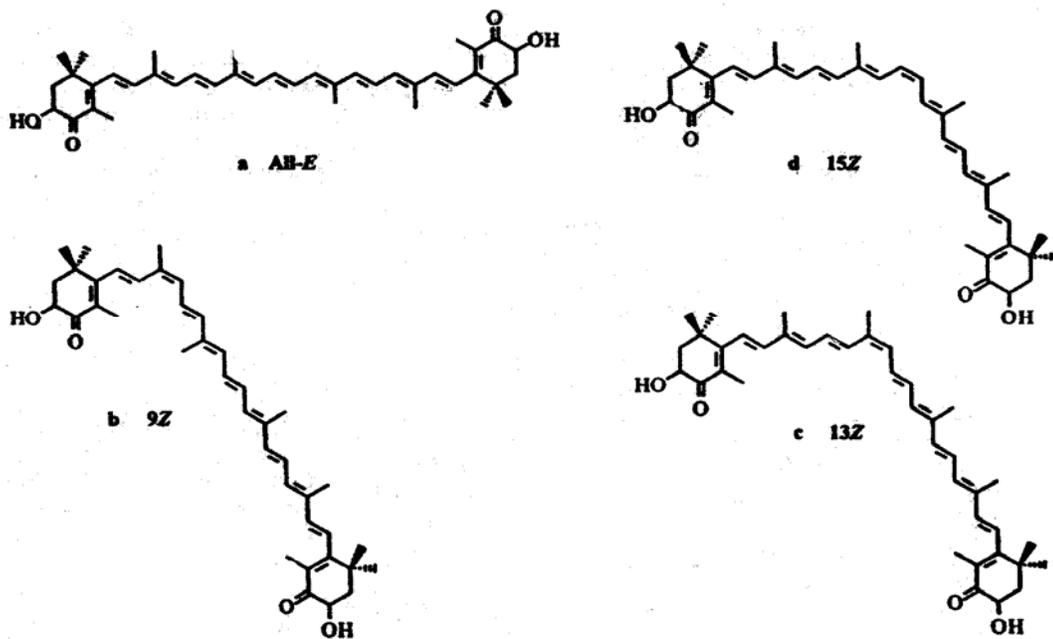


Figura 3. Isómeros geométricos más frecuentes de la astaxantina.

En los organismos vivos este carotenoide se encuentra generalmente unido a moléculas orgánicas como lípidos y proteínas, compuestos más complejos en los que la astaxantina posee mayor estabilidad química. Dichas asociaciones son denominadas carotenoproteínas o carotenolipoproteínas, dependiendo de las moléculas acompañantes de la astaxantina. En los crustáceos, la carotenoproteína más abundante es la crustacianina, compuesto hidrosoluble de color azul-verdoso (Goodwin, 1986).

La astaxantina se obtiene de tres principales maneras: por síntesis química, por biosíntesis y por extracción directa a partir de crustáceos o de sus desechos.

La síntesis química tuvo lugar por primera vez en 1984 en los laboratorios de la compañía Hoffman-La Roche (Suiza) con el propósito de suministrar este compuesto a la industria acuícola frente a las necesidades de pigmentación de peces salmónidos en cultivo, práctica que continúa hasta el presente.

La segunda manera de obtención es por biosíntesis microbiana utilizando la levadura *Xanthophylomyces dendrorhous* (anteriormente conocida como *Phaffia rhodozyma*) (Fang y col., 1993), cuyas colonias en su estado natural tienen un color rojo-anaranjado característico de la astaxantina, el cual se intensifica en condiciones de estrés como bajo pH, característica común en la producción de astaxantina (Hu y col., 2005). Otro organismo utilizado para la obtención de astaxantina es la microalga *Haematococcus pluvialis*, cuya utilización es relativamente reciente, mediante un proceso de dos etapas: 1) crecimiento del alga y 2) inducción de la carotenogénesis por medio de estrés generado por el recambio de células del cultivo (Guerin y col., 2003).

Los crustáceos y sus subproductos son igualmente fuente de obtención de astaxantina como el krill (*Euphasia superba*) (Yamaguchi y col., 1993) o desechos de crustáceos de alto valor comercial como el camarón, los cuales son fuente rica de este carotenoide (Cañipa, 1994).

3.1.3 Distribución de la astaxantina en la naturaleza

La astaxantina se encuentra ampliamente distribuida en los diferentes niveles tróficos de los ecosistemas (Figura 4), en donde se encuentra principalmente esterificada con una o dos moléculas de ácidos grasos (Renstrøm y col., 1981).

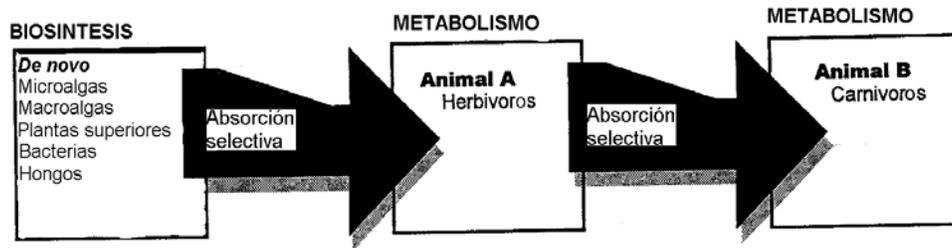


Figura 4. Esquema representativo de los diferentes niveles tróficos en los que se distribuye la astaxantina.

Algunos organismos poseen la capacidad de biosíntesis *de novo* de la astaxantina, entre ellos se encuentran las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum*, en las que este carotenoide se presenta en sus tres isómeros ópticos (Yokoyama y col., 1994). Otras bacterias que pueden sintetizar este carotenoide son *Pseudomonas ssp* y *Flavobacterium ssp* (Yokoyama y col., 1996).

En algas de la especie *Haematococcus pluvialis*, la astaxantina se puede encontrar en cantidades mayores a 30 mg/g (Olaizola y col., 2003), pudiendo representar el 3.7% (w/w) del peso total del alga (Jia-Ping Lai y col., 2004), mientras que las algas euglenofitas y clorofitas presentan sólo pequeñas cantidades de este carotenoide (Britton y col., 1998). En el alga *Haematococcus pluvialis*, el carotenoide se encuentra principalmente como su isómero óptico (3S, 3'S) (Renstrøm B. y col. 1981).

Las levaduras de la especie *Xanthophylomyces dendrorhous* poseen colonias pigmentadas de color rojo-amarillento debido a su contenido de astaxantina, la cual se presenta únicamente en forma libre y en su forma isomérica (3R, 3'R) (Britton y col., 1998). En esta especie la astaxantina se encuentra en una proporción de 0.041% con respecto al peso total (Jia-Ping Lai y col., 2004).

Análogamente, se ha reportado la presencia de astaxantina en su forma (3R, 3R') en hongos (*Deuromyces ssp*) de la familia Eukaryota (Britton y col., 1998).

La astaxantina natural comercializada actualmente como suplemento alimenticio para humanos proviene de la producción a partir de cultivos de *Haematococcus pluviales* y de *Xanthophylomyces dendrorhous*.

Entre las plantas fanerógamas se tiene conocimiento de que la especie *Adonis aestivalis* posee astaxantina esterificada (3S, 3'S) (Kamata y col., 1987), siendo hasta hoy la única planta superior conocida que posee astaxantina.

Debido al hábito herbívoro de los organismos del zooplancton que les permite acumular el pigmento de la dieta o de su capacidad de transformar carotenoides precursores en astaxantina, este compuesto se encuentra también en ellos formando parte importante en su composición química.

En la tabla 1 se concentra la información de las especies del zooplancton más importantes que presentan astaxantina en sus diferentes conformaciones isoméricas (Britton y col., 1998).

Tabla 1. Distribución de isómeros ópticos de la astaxantina en algunos organismos del zooplancton (Britton y col., 1998).

Organismo	Proporción isomérica de Astaxantina		
	(3S,3'S)	(3R,3'S,meso)	(3R,3'R)
<i>Halopedium gibberum</i>	95	1	4
<i>Daphnia longispina</i>	87	2	11
<i>Calanus finmarchicus</i>	83	4	13
<i>Gammarus lacustris</i>	63	11	26
<i>Meganyctiphanus norvegicus</i>	64 - 81	11 - 13	8 - 23
<i>Thysanoessa inermis</i>	50 - 55	7 - 24	26 - 38
<i>Acanthephyra purpurea</i>	41	44	15
<i>Cancer pagurus</i>	20	24	56
<i>Pandalus borealis</i>	12 - 25	46 - 52	23 - 43
<i>Euphausia superba</i>	25	11	64
<i>Euphausia superba</i>	8 - 21	3 - 5	74 - 90
<i>Euphausia superba</i>	9	21	70

Así como en el zooplancton, la astaxantina es un carotenoide típico en otros invertebrados mayores como los crustáceos marinos o de agua dulce, en los cuales se encuentra en forma de un complejo carotenolipoproteico que puede estar unido a partes estructurales de los organismos como el citoesqueleto, la quitina ó el carbonato de calcio, confiriéndole a éste una coloración azul verdosa en su estado natural (Fox, 1973).

Las carotenolipoproteínas son compuestos degradables con disolventes orgánicos o calor, liberando por consecuencia al grupo prostético astaxantina. Un ejemplo común de este fenómeno ocurre cuando los crustáceos cambian del color azul verdoso en su estado crudo al rojo brillante después de ser cocidos.

En los crustáceos como el camarón, acocil, langosta y cangrejo, la astaxantina es muy abundante, principalmente en el caparazón e hipodermis. Estos organismos poseen diversas rutas metabólicas mediante las cuales pueden transformar los carotenoides de la dieta en astaxantina. La composición predominante del pigmento es principalmente esterificada y consiste en una mezcla de isómeros (3R, 3'R):(3R, 3'S):(3S, 3'S) en proporción de 1:2:1 (Schiedt, 1990). Entre los crustáceos con mayor contenido de astaxantina podemos citar al acocil *Procambarus clarkii* y la langostilla *Pleuroncodes planipes*, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido y distribución de astaxantina en algunos crustáceos

	Contenido de Ax µg/g	% Diester	% Monoester	% Libre	Isómeros ópticos	Referencia
<i>Penaeus vannamei</i>	36.4	50.8	44.6	4.6	3	Schiedt, 1990
<i>Penaeus monodon</i>	51	27.5	58.2	14.3	3	Schiedt, 1990
<i>Penaeus japonicus</i>	30	46.8	36.7	16.5	3	Schiedt, 1990
<i>Metapenaeus conoceros</i>	31.7	30.6	52.8	16.6	3	Schiedt, 1990
<i>Pandalus boreales</i>	30.9	75.9	18.5	5.6	3	Guillou y col., 1995
<i>Pleuroncodes planipes</i>	79.7	70	12	10	3	Coral y col, 2002
<i>Procambarus clarkii</i>	153	49.4		40.3	3	Meyers y col., 1981
<i>Euphasia suprema</i>	-	46	34	20	3	Takaichi y col., 2003

En peces vertebrados como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón (*Salmo salar*), la astaxantina es abundante sobre todo en piel y músculo, en donde se encuentra el 95% y 93%, respectivamente, del total de este carotenoide en el organismo, además de encontrarse en gónadas, plasma, riñón e hígado (Page y col., 2005).

Se han reportado proporciones similares de isómeros ópticos en las especies de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón del Antártico (*Salmo oncorchyncus*); alrededor de 78-85% para la forma (3S, 3'S), 2-6% para la forma (3S, 3R) y 2-17% para la forma (3R, 3'R) (Liaaen-Jesen, 1990).

Los niveles de astaxantina son notoriamente altos en aves como el flamenco (*Phoenicopterus ruber ruber*) responsable del color rosado típico de su plumaje. Se ha encontrado de igual manera presencia de astaxantina en el plumaje y piel del faisán y perdiz (Negro y col., 2000). En la especie pinzón real (*Pyrrhula pyrrhula*) se encuentra también este pigmento y representa el 20% del total de los carotenoides. Como se ha dicho anteriormente, la forma isómerica más abundante en la naturaleza y en particular en estas aves, es la *trans* y en menor proporción la forma *cis* (Stradi y col., 2001). En otras aves, como la cigüeña (*Ciconia ciconia*), que obtienen astaxantina de manera exógena al ser alimentadas con el acocil, *Procambarus clarkii*, se puede encontrar astaxantina en piel, tejido adiposo y plasma, en los cuales se han encontrado los isómeros geométricos *trans* y *cis* (Negro y col., 2000).

En plasma humano también se ha detectado este carotenoide después de la ingestión de salmón pigmentado con astaxantina y cantaxantina (Elmadfa y Majchrzak, 1999; citado por Østerlie y col., 2000). Después de una dosis experimental de 100 mg de astaxantina sintética en humanos Østerlie y col. (2000) detectaron en plasma una concentración de 1.3 mg/mL, principalmente en su isómero geométrico *trans* e isómero óptico (3R, 3'R) (Østerlie y col., 2000). Coral y col. (2004) a su vez encontraron 0.28 mg/mL de astaxantina en plasma después de una dosis de 100 mg de astaxantina esterificada.

Dada la incapacidad de biosíntesis de carotenoides en el hombre, como ocurre en la mayoría de animales vertebrados, la presencia de estos compuestos y en particular de la astaxantina en sus tejidos está determinada por el consumo de alimentos que lo contienen como el salmón, trucha, camarón, acocil, langosta, entre otros, o por la suplementación de la dieta con astaxantina comercial.

3.1.4 Importancia de la astaxantina

La primera utilidad de la astaxantina fue aplicada en la industria acuícola, particularmente en el cultivo de peces salmónidos como la trucha y el salmón (Latscha, 1990). En condiciones de cautiverio, estos organismos poseen una coloración muscular blanquecina. Para conferirles el color rojo-naranja típico de los peces en condiciones silvestres, y que son determinantes en su alto valor comercial, se utiliza la astaxantina sintética o natural como aditivo en el alimento. Ésta es una práctica ampliamente utilizada en los países altamente productores como Chile, Noruega y Canadá. Menos frecuente y en menor escala, la astaxantina también es utilizada para la pigmentación de productos avícolas como la yema de huevo (Carrillo, 1993).

Los hallazgos más recientes sobre algunos efectos de la astaxantina en la fisiología de los organismos, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, han colocado a la astaxantina en un nuevo nivel de importancia por su posible utilidad médica. Por dicha razón, tanto la industria farmacéutica como la alimenticia muestran interés en la obtención, comercialización y aplicación de la astaxantina. En la actualidad, ya se pueden encontrar en el mercado cápsulas y comprimidos de astaxantina para ser ingeridas como complemento alimenticio y antioxidante, a unas dosis que oscilan entre 2 a 8 mg al día por adulto según el laboratorio productor (Figura 5).



Figura 5. Presentaciones comerciales de astaxantina.

3.1.5. Funciones biológicas de la astaxantina

A este carotenoide se le atribuyen diversas funciones biológicas. En primer lugar, fue demostrado su papel antioxidante y sofocador de los radicales libres, así como de las formas reactivas del oxígeno (ROS). Su capacidad antioxidante ha sido calificada como superior a la del β -caroteno y el α -tocoferol (Kurashige y col., 1990; Palozza y col., 1992; Matsushita y col., 2000; Kurihara y col., 2002). Para explicar su mecanismo de acción como antioxidante, Goto y col. (2001) estudiaron las propiedades fisicoquímicas de la molécula y de los enlaces de hidrógeno formados durante la peroxidación de lípidos en membranas biológicas. En dichos modelos, los investigadores observaron que la capacidad del carotenoide para atrapar radicales libres, como el superóxido (O_2^\ominus), hidróxido ($^\ominus OH$) y peróxido ($^\ominus OOR$), no se debe únicamente a los dobles enlaces conjugados de su molécula, sino además, a la interacción de los átomos de hidrógeno del C3 de ambos anillos terminales con la región hidrofílica de la membrana mediante puentes de hidrógeno (Figura 6). En la región hidrofóbica, los radicales carbonilo e hidroxilo interactúan entre sí mediante puentes de hidrógeno intramoleculares, permitiendo de este modo, mayor estabilidad a la molécula en el medio y eficiente captación de radicales libres.

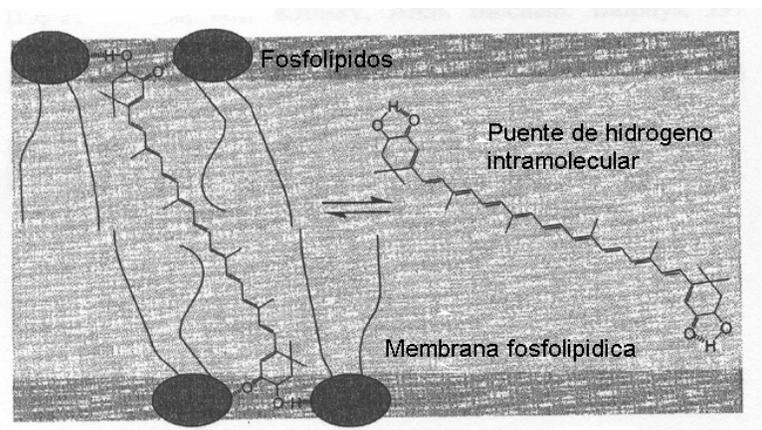


Figura 6. Esquema que representa la interacción intermolecular e intramolecular de la astaxantina con una membrana celular (Goto y col.,2001).

A la astaxantina se le atribuye también una función realzante del sistema inmunológico debido a su efecto estimulador de la proliferación de células linfocíticas T1 y T2 aumentando en consecuencia la respuesta inmunológica (Jyonouchi y col., 1995).

Su capacidad de atrapar radicales libres ha sido interpretada por otros investigadores como la razón causal de la inhibición del crecimiento y la prevención de la transformación de un tumor benigno a maligno. Por esta razón, y por activar ciertos genes involucrados en la protección contra el cáncer, la astaxantina es calificada como anticancerígena (Chew y col., 1999; Jyonouchi y col., 2000). En otro estudio se demostró que este carotenoide posee además una acción antimicrobiana dada su capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*, responsable de la gastritis tipo B (Wang y col., 2000). La astaxantina tiene también importancia en la salud visual en virtud de su capacidad de atravesar la barrera hematoretinal. Dicha característica no es mostrada por otros carotenoides que protegen a la retina de la luz y de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño en las células receptoras del ojo (Maher, 2000)(Guerin y col., 2003).

Un hallazgo más reciente corresponde al efecto antiinflamatorio de la astaxantina que Susuki y col. (2005) demostraron que este compuesto bloquea la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), el cual activa al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), óxido nítrico, interleucina 1 (IL-1) y otras citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria. Del mismo modo, se demostró recientemente que la astaxantina influye en la reducción de la presión arterial y del posible daño isquémico, asignándole por lo tanto un papel neuroprotector y antihipertensivo (Hussein y col., 2005).

3.2 METABOLISMO DE LA ASTAXANTINA

El conocimiento sobre el metabolismo de los carotenoides (Figura 7) parte de los estudios realizados principalmente con β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, carotenoides más abundantes en la dieta humana y cuyas funciones biológicas son ampliamente conocidas (Parker, 1996; Deming y col. 1999). En el caso de la astaxantina su metabolismo ha sido principalmente estudiado en peces salmónidos y crustáceos (Liaaen-Jensen J., 1990; Schiedt, 1990).

3.2.1 Absorción

La baja polaridad de la astaxantina esterificada impide la buena solubilización y por consiguiente su buena absorción. Para remontar dicha limitación, ésta debe ser hidrolizada en el estómago e intestino mediante la participación de enzimas como la colesterol esterasa y sales biliares (Britton y col., 1998; Breithanpt y col., 2001).

Una vez en forma libre, la astaxantina es solubilizada en lípidos de varios tamaños y emulsificada en pequeñas partículas o micelas, gracias a la motilidad propia del estómago. Los carotenoides no polares como los carotenos migran a la región rica en triacilgliceroles en las micelas, mientras que las xantofilas como la astaxantina que son más polares, permanecen principalmente en la superficie junto a las proteínas ó fosfolípidos (Deming y col. 1999).

Dada la naturaleza lipofílica de los carotenoides, aumentada por la composición esterificada con ácidos grasos, la cantidad de lípidos presentes en la dieta afecta positivamente la solubilidad de éstos.

Por el contrario, la presencia de fibra en la dieta y sustancias inhibidoras de lipasas pueden afectar negativamente dicho proceso (Deming y col., *op. cit.*).

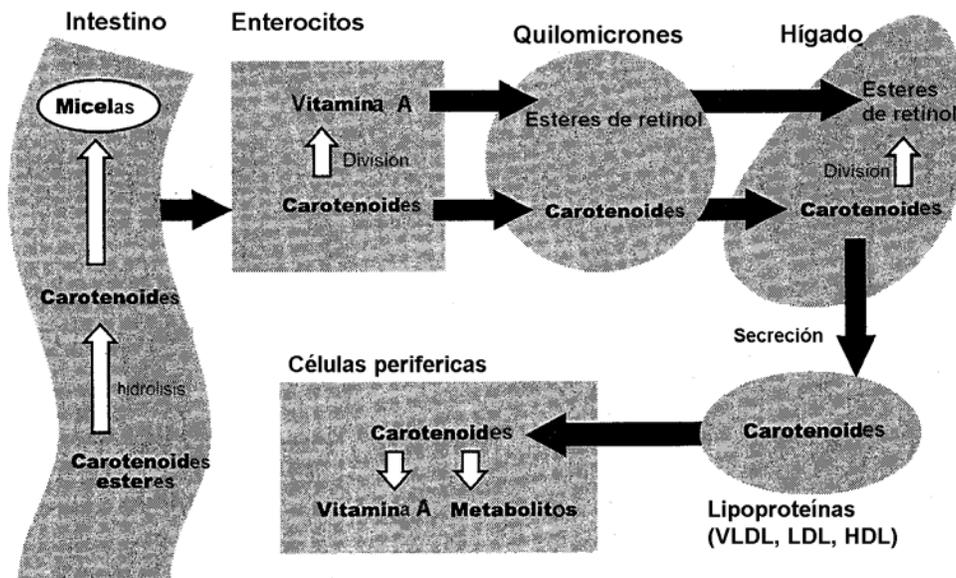


Figura 7. Esquema general que representa los órganos y partículas involucradas en el metabolismo de carotenoides.

El proceso de absorción ocurre en los intersticios del intestino delgado por medio de difusión pasiva de las partículas emulsificadas que atraviesan la membrana de los enterocitos. Una vez en los enterocitos, los carotenoides son ensamblados en quilomicrones en el aparato de Golgi (Deming y col., *op. cit.*). Se sabe que debido a su polaridad, las xantofilas tienen cierta preferencia de transpaso en el intestino con respecto a los carotenos (Pérez-Gálvez y col., 2005).

Una vez que los carotenoides son captados por los quilomicrones son llevados al hígado a través del plasma en donde pueden ser esterificados nuevamente con la participación de la acetil coenzima A del órgano correspondiente (Pérez-Gálvez y col., *op. cit.*), para permanecer ahí o pasar mediante las lipoproteínas del torrente sanguíneo hacia otros tejidos u órganos (Deming y col., 1999).

3.2.2 Distribución

Las partículas encargadas del transporte y distribución de los carotenoides son las lipoproteínas. Éstas son agregados moleculares de proteínas transportadoras específicas llamadas apolipoproteínas acopladas a diversas combinaciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles (Lehninger 1990). Dependiendo de la combinación de lípido y proteína, estas partículas poseen diferentes densidades que van desde 0.95-1.019 g/mL y corresponden a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL) que van de 1.019-1.063 g/mL y lipoproteínas de 1.063-1.210 g/mL que corresponden a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Voet y col., 1995).

La astaxantina puede ser transportada por uno o dos tipos de lipoproteínas dependiendo de su polaridad y de la especie de la que se trate. Por ejemplo, en humanos se ha observado al carotenoide en las lipoproteínas LDL, VLDL y HDL, aunque principalmente en las primeras (Østewrlie y col. 2000) (Coral y col., 2004), mientras que en peces es transportada principalmente en las lipoproteínas VLDL, como en el caso del salmón (*Oncorhynchus keta*) (Schiedt, 1990). En aves, el transporte de xantofilas, entre ellas la astaxantina, se lleva a cabo por las lipoproteínas HDL (Schiedt, *op. cit.*).

Cabe subrayar que en el plasma no se ha detectado un carotenoide en forma esterificada.

3.2.3 Biotransformación

Durante el metabolismo, los carotenoides pueden ser transformados en otros compuestos u otros carotenoides para realizar diversas funciones, tal es el caso de la astaxantina y del β -caroteno que son transformados en vitamina A (retinol), ante una deficiencia de ésta en peces y humanos, respectivamente (Britton y col. 1998) (Schiedt 1990). Dichas transformaciones son asistidas por enzimas como se muestra en las figuras 8 y 9.

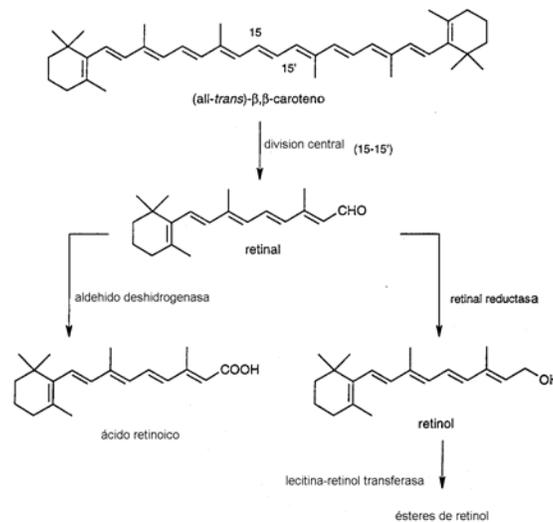


Figura 8. Transformación enzimática de β -caroteno en retinol.

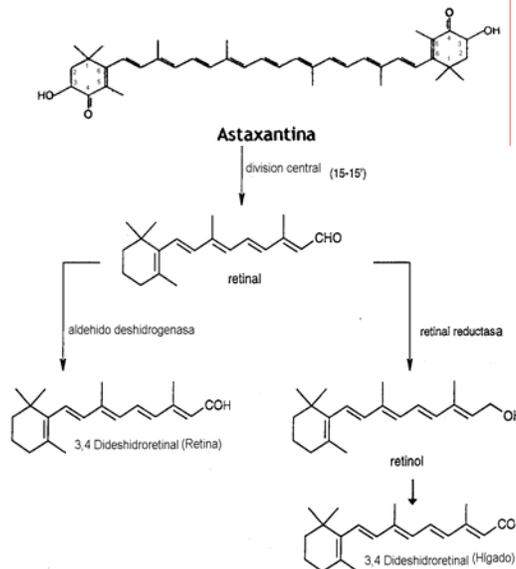


Figura 9. Transformación enzimática de astaxantina en retinol

En la trucha arcoiris, la astaxantina, cantaxantina y zeaxantina pueden ser transformadas en retinol ó en deshidroretinal en la retina e hígado, respectivamente, cuando hay deficiencia de vitamina A en la dieta (Figura 9) (Schiedt, *op. cit.*). En el pez dorado (*Tilapia nilotica*) también ocurre una biotransformación de β -caroteno ó luteína a astaxantina y por ambas vías, se obtiene principalmente el mismo tipo de astaxantina (3R, 3'R) (Goodwin, 1986).

En peces en desarrollo, la astaxantina con la cual son alimentados se transforma en idoxantina, como es el caso del salmón, especie en la que la concentración de astaxantina va disminuyendo con el desarrollo del organismo, mientras que la concentración de idoxantina va aumentando (Figura10).

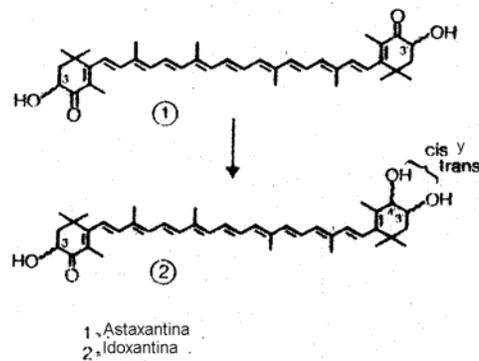


Figura 10. Metabolismo de astaxantina en peces

El cambio en la quiralidad de algunos carbonos en la molécula, y por lo tanto en sus isómeros ópticos, también es frecuente durante la transformación metabólica de los carotenoides (Liaaen-Jesen, 1990; Britton y col., 1998).

Durante el metabolismo es posible también que exista una reducción estereoespecífica de la astaxantina, como fue observada en la piel del salmón, en donde los tres isómeros ópticos de la astaxantina son transformados en tres isómeros ópticos de zeaxantina (Goodwin, 1986; Schiedt, 1990) (Figura 11).

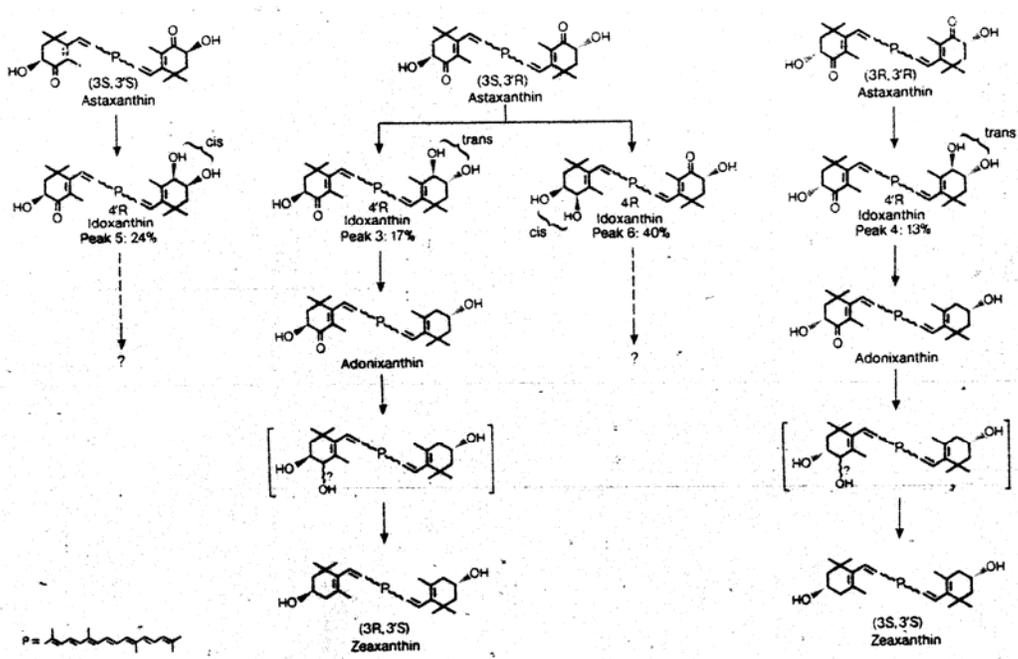


Figura 11. Reacciones de conversión de los tres isómeros ópticos de astaxantina en el salmón.

La existencia de una mezcla racémica (1:2:1) en la que se encuentran los tres isómeros ópticos de astaxantina en crustáceos, como el camarón, es aún una interrogante. La hipótesis supone una racemización a través de un intermediario enol- α -hidroxi-cetona ó isoastaxantina en la célula (Schiedt, 1990) (Figura 12).

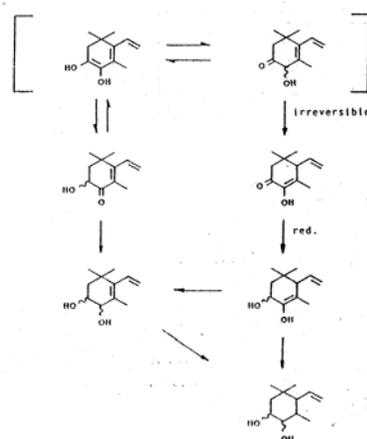


Figura 12. Formación de mezcla racémica de astaxantina en crustáceos.

En estos procesos de transformación también es frecuente el cambio en la configuración geométrica de la molécula de los carotenoides. La configuración geométrica *trans*, más frecuente, puede ser modificada con la participación de enzimas isomerasas particulares de cada especie (Liaaen-Jensen, 1990).

Dicho cambio en los carotenoides *trans* obedece a que en algunas especies, el doblamiento *cis* está más favorecido debido a efectos estéricos y electrónicos; algunos grupos químicos que favorecen la configuración *cis* son el metilo oxigenado o un enlace acetileno dentro de la cadena poliénica. Por ejemplo, cuando los peces *Oncorhynchus mykiss* e *Hippoglossus hippoglossus*, son alimentados con una mezcla de isómeros geométricos de astaxantina, hay mayor depósito de ésta en el músculo, que cuando son alimentados únicamente con astaxantina *trans*.

Como parte de estos procesos de biotransformación, la astaxantina, al igual que todos los carotenoides puede también ser oxidada o reducida dependiendo del tipo de enzimas presentes en la especie en la cual se encuentre (Britton y col. 1998). En otros casos, ésta puede esterificarse o desesterificarse antes o después de ser depositada en diferentes tejidos. Los mecanismos del proceso de esterificación no son aún bien conocidos aunque se cree que la acetil coenzima A participa en la esterificación de las xantofilas en el hígado (Pérez-Gálvez y col., 2005).

3.2.4 Eliminación

En general, el nivel de absorción de los carotenoides en los organismos es relativamente bajo. En mamíferos, éstos son absorbidos alrededor del 10%, en tanto que los restantes son desechados en forma casi intacta a través de las heces, en donde se han podido observar recubiertos de queratina de las células epiteliales.

Es posible que los metabolitos polares de carotenoides, como aquellos conjugados con carbohidratos, sean excretados en la orina o la bilis (Britton y col. 1998).

Existe muy poca información acerca de la eliminación de astaxantina. Los únicos estudios que abordan el tema son los realizados en peces salmónidos en los que se ha podido una observar una eliminación cercana al 90% en heces.

3.3 FARMACOCINÉTICA. CONCEPTOS GENERALES

La farmacocinética se define como el paso de un fármaco a través de barreras biológicas en función del tiempo. Para que un fármaco actúe es necesario que llegue al sitio de acción, para lo cual debe ser absorbido, transportado y retenido para después ser eliminado. La absorción y el aprovechamiento de un fármaco dependen de su biodisponibilidad. El volumen de distribución de una sustancia es determinante en la compartimentalización o atrapamiento de éste y en un posible efecto de toxicidad, en tanto que la excreción representa el mecanismo predominante de eliminación del organismo.

Dada la efectividad demostrada de la astaxantina como antioxidante, se incluye en el presente estudio la valoración farmacocinética, en el entendido de que la eficacia de un compuesto guarda relación con el tiempo durante el cual sus niveles en el organismo son adecuados para dicho efecto.

La constante de eliminación indica la rapidez con la cual un fármaco es eliminado del cuerpo. A partir de la constante de eliminación se puede obtener el tiempo de vida media, que es el tiempo al cual ya se ha eliminado el 50% del fármaco en el organismo y con este dato predecir el tiempo de eliminación total. Y finalmente el establecimiento de los tiempos de máxima absorción y eliminación, que son los tiempos en los cuales hay una mayor concentración de la sustancia en la absorción y en la eliminación, contribuyen a evaluar los efectos biológicos de un fármaco.

Existen escasos estudios previos sobre la farmacocinética de la astaxantina en los cuales se han reportado diferentes parámetros con alguna variabilidad en los resultados. La dosificación oral única de astaxantina libre sintética en humanos presentó una constante de eliminación de 0.033 h^{-1} , un tiempo de vida media de 21 h y una máxima absorción en plasma ($C_{\text{max}}=1.3 \text{ mg/mL}$) a las 7 h (Østewrlie y col. 2000), mientras que la dosis única de astaxantina diesterificada en humanos, dio como resultado valores similares en cuanto a la constante de eliminación ($K_e= 0.033 \text{ h}^{-1}$), tiempo de vida media ($t_{1/2}=21.2 \text{ h}$), sólo variando en el tiempo de máxima absorción ($C_{\text{max}}= 0.28 \text{ mg/mL}$) observado a las 11.5 h (Coral y col., 2004).

Otros carotenoides que han sido estudiados en humanos en cuanto a su farmacocinética han mostrado valores disímiles como en el caso de la capsantina ($t_{1/2}=20.1 \text{ h}$) (Oshima y col., 1997) y el licopeno ($t_{1/2}=222 \text{ h}$) (Romanchik y col. 1995).

Se ha reportado el tiempo de máxima absorción para otros carotenoides, por ejemplo, para el 5,6-epoxi- β,β -caroteno (Barua, 1999) y la β -criptoxantina (Wingerat y col., 1998) fue de 6 h; para cantaxantina, se han reportado valores desde 7 h (White y col., 1994) hasta de 12 h (Paetau y col., 1997); para luteína, valores que van desde 9 h (Gärther y col., 1996) hasta 16 h (Kostic y col., 1995) y de 8 h para la capsantina (Oshima y col., 1997). En todos los casos, los estudios fueron hechos en plasma humano y no son idénticos porque no fueron realizados bajo las mismas condiciones experimentales de dosis o fuente del carotenoide.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE LA ASTAXANTINA UTILIZADA EN EL EXPERIMENTO

4.1.1 El acocil *Procambarus bouvieri*

El acocil *Procambarus bouvieri*, es un crustáceo astácido de hábitat dulceacuícola que vive en ríos y lagunas. Aunque es utilizado como fuente de alimento en las localidades donde se produce naturalmente, su cultivo no ha sido objeto de atención hasta el presente. Los organismos utilizados como proveedores de astaxantina en el presente estudio fueron colectados en las lagunas de Uruapan, Michoacán y enviados vivos al laboratorio de Bioquímica del INCMN “Salvador Zubirán”, lugar en donde se llevaron a cabo los análisis.



Figura 13. Acocil *Procambarus bouvieri*

4.1.2 Obtención de la harina de acocil

Una vez en el laboratorio, los acociles fueron descabezados y lavados, dejando disponibles para los fines del presente trabajo únicamente los cefalotórax desprovistos de los órganos internos como estómago, hepatopáncreas, gónadas y branquias. Dicha selección se realizó con el objeto de no mezclar los carotenoides de las partes blandas

del cefalotórax como el β -caroteno, zeaxantina y luteína, con los carotenoides del cefalotórax (exoesqueleto) representado principalmente por la astaxantina.

Los cefalotórax limpios fueron colocados en charolas de una estufa APEX (48BE) con circulación continua de aire y secados a $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, a fin de facilitar el proceso de molienda.

Una vez secos los cefalotórax se molieron en molino de martillo para cereales, provisto de una criba con tamaño de malla menor de 2 mm; el material obtenido fue tamizado para obtener harinas con tres tamaños de partícula: menor a 0.85 mm (malla No. 20), menor a 0.425 mm (malla No. 40) y menor a 0.180 mm (malla No.80). La harina utilizada para la extracción de astaxantina necesaria para este estudio tuvo partículas menores a 0.180 mm. Este material fue almacenado en bolsas oscuras de plástico y conservadas a -70°C hasta el momento del análisis químico.

4.1.3 Extracción y cálculo de carotenoides en la harina de acocil

La extracción, análisis y cuantificación de los pigmentos carotenoides en la presente etapa así como en las siguientes etapas, se realizaron utilizando disolventes orgánicos de grado analítico y de grado HPLC cuando fue necesario, bajo condiciones de luz reducida y bajo atmósfera poco oxidativa.

Una muestra de 20 g de harina con humedad relativa de 10% (Humedad en condiciones de refrigeración) fue colocada en un mortero con pistilo en donde se extrajeron los pigmentos por repetidas veces con acetona hasta alcanzar la extracción completa de los mismos. Dicho paso fue verificado por la ausencia de coloración del disolvente en el último paso de extracción.

El extracto total en acetona fue obtenido por la reunión de los extractos parciales, el cual fue filtrado con embudo de filtración de porosidad media, kitasato y vacío. Posteriormente, el extracto fue lavado por el método de reparto de disolventes utilizando éter de petróleo (EP).

La fase orgánica (EP) fue reunida en un matraz y deshidratada con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), para eliminar los posibles restos de agua en esta fase, dicha fase se decantó para ser posteriormente evaporada a sequedad en un equipo de destilación con la ayuda de un baño maría a 45°C y vacío. El extracto obtenido de apariencia oleosa fue reconstituido con hexano y aforado a un volumen conocido para su análisis espectrofotométrico en un espectrofotómetro Beckman Du-64, el cual consistió en obtener un barrido con las características de absorbencia en el intervalo de luz visible de 330-600 nm en hexano. Una vez obtenida la curva espectral, se identificó el pico máximo de absorción para determinar a dicha longitud de onda la absorbencia puntual del extracto. Con esta información se calculó el contenido de carotenoides en el extracto mediante la fórmula:

$$\text{Carotenoides } \mu\text{g/g} = \frac{V * A * 10^6}{1 * 100 * P * E_{1\text{cm}}^{1\%}} \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

V= Volumen total (mL)

A= Absorbencia

P= Tamaño de muestra (g)

10⁶ =Factor para que el resultado se exprese en µg de carotenoides

E^{1%}_{1cm} = Coeficiente de extinción molar del carotenoide mas abundante en el extracto (Astaxantina) en hexano.

Paralelamente al estudio espectrofotométrico del extracto en hexano, se realizó una prueba cromatográfica en capa delgada (TLC) para investigar la naturaleza de los carotenoides presentes en la muestra. Para este propósito, se utilizaron placas cromatográficas de 20x20 cm de silica gel aluminizadas de 0.25 mm de grosor de la marca Merk y una fase móvil compuesta por hexano:acetona (70:30). Dichas pruebas fueron hechas en paralelo con patrones conocidos de astaxantina como la astaxantina sintética (Astaxantina libre) del laboratorio Hoffman-LaRoche (Basilea, Suiza) y astaxantina del crustáceo langostilla *Pleuroncodes planipes* (mezcla de ésteres de astaxantina) obtenida de acuerdo al método descrito por Coral y Bjerkeng (2002).

4.1.4 Estudio cualitativo y cuantitativo de astaxantina en la harina de acocil

Una vez identificada a la astaxantina como el pigmento más abundante en el extracto crudo de la harina de acocil, la determinación de carotenoides en las muestras posteriores fue referida como concentración de astaxantina y calculadas por triplicado con la fórmula 1.

Con el fin de conocer la proporción de las formas esterificadas y libre de astaxantina en el extracto crudo, las muestras se sometieron a una cromatografía en capa fina y se colocaron en forma de banda y fueron eluidas durante 15 min, tiempo después del cual se determinaron los Rf de las bandas obtenidas.

Las diferentes bandas de astaxantina en el extracto crudo fueron extraídas individualmente por raspado, disueltas en acetona, lavadas y redisueltas en hexano para su estudio espectrofotométrico y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El estudio espectrofotométrico de cada banda tuvo el propósito de obtener la curva espectral y el cálculo de contenido de astaxantina. Una vez redisueltas las bandas en volumen conocido de hexano (5 mL), éstas fueron leídas en el espectrofotómetro a 470 nm. La cantidad relativa de astaxantina fue determinada en función de las absorbencias, y su porcentaje con respecto a la absorbencia total en la muestra.

Los estudios por HPLC se explicarán en la sección de preparación de patrones.

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

4.2.1 El jerbo *Meriones unguiculatus*

En la actualidad, el jerbo es un modelo animal muy utilizado en estudios relacionados con alteraciones del sistema nervioso, así como en estudios del metabolismo de lípidos y carotenoides. House y col. (1997), afirman que este organismo tiene la propiedad de utilizar carotenoides siguiendo una ruta metabólica parecida a la observada en humanos, mientras que el ratón o la rata, no absorben del todo estos pigmentos y los que son absorbidos, son transformados en metabolitos diferentes que en humanos. Por esta razón, se eligió a esta especie como modelo experimental en el presente estudio. Otro modelo animal utilizado en estudios de carotenoides son los hurones, pero éstos son más costosos y se encuentran menos disponibles (House y col., 1997)(Lee y col., 1999).



Figura 14. Jerbo *Meriones unguiculatus*

4.2.2 Manejo de los animales

El cuidado y manipulación de los animales fueron realizados siguiendo los criterios del reglamento y guías de procedimientos del Departamento de Investigación Experimental y Biotecnología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”; mismos que contienen los lineamientos de la NOM-062-200-1999 que se refieren al manejo, uso y cuidado de animales de laboratorio.

Los jerbos utilizados fueron machos de 6 meses de edad, producidos en el bioterio del INCMNSZ, lugar en donde se llevó a cabo el experimento a partir de pies de cría provenientes del laboratorio proveedor de animales Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianápolis, Indiana, EUA). Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato transparente de 56x28x23 cm, provistos de alimento y agua *ad libitum*. El alimento utilizado fue Purina 5001, el cual contenía 4.5 ppm de β -caroteno.

La temperatura de la habitación se mantuvo entre 21-23 °C, humedad relativa de 40-60%, con ciclos de luz y oscuridad de 12 h x 12 h.

4.2.3 Elaboración de las dosis

Las concentraciones de las dosis fueron elegidas teniendo en cuenta que en humanos las dosis recomendadas de astaxantina por algunos laboratorios oscilan entre 2 a 8 mg/kg. Por esta razón, se eligió una dosis aún menor al límite inferior de la recomendada (1mg/kg) y otra intermedia (5 mg/kg). Éstas fueron elaboradas diluyendo el extracto oleoso de astaxantina de harina de acocil con aceite de soya, el cual sirvió como vehículo. Dichas concentraciones fueron preparadas para alcanzar un volumen máximo de 0.2 mL de aceite de soya para evitar laxar a los animales.

4.3 ETAPA I

4.3.1 Diseño experimental

En esta etapa se empleó una dosis equivalente a 1mg de astaxantina/kg de peso vivo.

Se utilizaron un total de 36 jerbos machos adultos de 5 a 6 meses de edad y peso promedio de 82 ± 11 gramos, los cuales tuvieron un periodo de aclimatación al manejo y manipulación durante ocho días previos a la dosificación.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 6 individuos cada uno, cuyos tiempos de muestreo fueron a las 6, 12, 18, 24, 48, 96 h después de la aplicación de la dosis. Un grupo adicional de 6 jerbos sirvió de testigo el cual no recibió dosis de astaxantina (0 h).

A partir de los organismos se obtuvieron muestras de sangre (plasma y lipoproteínas), hígado, intestino delgado y heces para la cuantificación de astaxantina.

Como variable independiente se consideró el tiempo postprandial y como variable dependiente la concentración de astaxantina en cada uno de las muestras estudiadas.

El estudio farmacocinético fue realizado con los datos de concentración de astaxantina en plasma mediante un modelo abierto de un compartimento de dosis oral.

4.3.2 Dosificación

Los jerbos fueron sometidos a un ayuno de 13 -14 h previamente a la dosificación.

Las dosis fueron únicas aplicadas a las 8 h de la mañana con la ayuda de una jeringa de 1mL adaptada con una sonda esofágica de acero inoxidable y punta redonda de 3 pulgadas de largo y 0.5 mm de diámetro interno.

Los volúmenes administrados estuvieron en función del peso de los organismos como se ilustra en la tabla 3

Tabla 3. Volumen de extracto de astaxantina en aceite según el peso de los animales

Peso (g)	Volumen (mL)
70-80	0.10
80-90	0.15
90-100	0.20

Después de la dosificación, los jerbos fueron colocados nuevamente en las cajas de policarbonato transparente (56x28x23 cm) hasta el momento del sacrificio. Durante este periodo los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento.

Posteriormente, pasado el tiempo previsto (6, 12, 18, 24, 48, 96 h), los jerbos fueron sacrificados para la obtención de muestras.

4.4 ETAPA II

4.4.1 Diseño experimental

En esta etapa se utilizó una dosis equivalente a 5 mg de astaxantina/kg de peso vivo.

Como tratamiento experimental 30 jerbos machos adultos de 5 a 6 meses de edad y peso promedio de 85 ± 9 gramos fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 6 individuos cada uno después de un periodo de aclimatación de ocho días previamente al experimento.

Después de recibir las dosis, los grupos fueron sacrificados a las 3, 6, 12, 24, 48 h. Como testigo fue utilizado el mismo grupo de la etapa I, los cuales no recibieron dosis de astaxantina.

De los organismos se obtuvieron muestras de plasma, hígado, intestino delgado y heces para la cuantificación de astaxantina.

Como en la etapa I, se consideró como variable dependiente la concentración de astaxantina en los tejidos estudiados y como variable independiente los tiempos postprandiales.

4.4.2 Dosificación

Los animales fueron dosificados con 5 mg de astaxantina del extracto de acocil por kg de peso, después de un periodo de ayuno de 13-14 h. La aplicación de la dosis y volúmenes de extracto fueron semejantes a los utilizados en la etapa I.

Después de la dosificación, los jerbos fueron colocados en las cajas de policarbonato transparente (56x28x23 cm) hasta el momento del sacrificio previsto a las 3, 6, 12, 24, 48 h. Durante este periodo los animales tuvieron agua y alimento *ad libitum*.

4.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS EN AMBAS ETAPAS DEL ESTUDIO

4.5.1 Sacrificio de los jerbos

Los jerbos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y xilazina a una dosis de 7 mg y 0.8 mg por 100 g de peso, respectivamente. La mezcla se preparó poniendo en un matraz aforado de 25 mL, 3.5 mL de Anesket (Clorhidrato de Ketamina 50mg/mL solución inyectable) y 1mL de Rompun (Hidrocloruro de Xilazina 20mg/mL solución inyectable), y llevado al aforo con solución salina (0.9% NaCl).

La dosis de la mezcla anestésica aplicada a los jerbos fue de 0.1mL/10g de peso vivo. Una vez anestesiados se procedió al desangrado tiempo después del cual los animales fueron desnucados antes de la necropsia y obtención de muestras.

4.5.2 Sangre y Plasma

La obtención de muestras de sangre se realizó por punción cardíaca con jeringas de 3 mL y aguja 21G de 32 mm, las cuales se bañaron previamente con heparina. Dicho tratamiento de las jeringas fue necesario para asegurar que el tejido no se hemolizara durante la succión.

Los eritrocitos del jerbo muestran alta fragilidad frente la presión del émbolo como al vaciado de la sangre en los tubos. Por esta razón se procuró manipular lo menos posible la sangre en la jeringa así como extraer en una sola punción. Los tubos de sangre (Vacutainer, Becton Dickinson) con las muestras fueron mantenidos sobre hielo inmediatamente después de la colecta y llevados a la centrifuga.

La separación del plasma se realizó por centrifugación a 1240g/15min/4°C en una centrífuga Sorvall RT 6000. El volumen máximo de plasma obtenido por jerbo fue aproximadamente de 1.5 mL, del cual se asignaron 0.9 mL para la obtención de lipoproteínas, y el restante, para la determinación de astaxantina total en plasma. Esta última fracción fue guardada en tubos eppendorf a -70°C hasta el momento de los análisis. Por el contrario, el plasma asignado para las lipoproteínas fue procesado inmediatamente el mismo día.

4.5.3 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son partículas esféricas compuestas por lípidos poco polares como triglicéridos y ésteres de colesterol, contenidos en el centro hidrófobo, y lípidos más polares como fosfolípidos y colesterol libre, forman una monocapa superficial junto a apolipoproteínas anfipáticas. Estas partículas poseen características fisicoquímicas y propiedades diferentes a partir de las cuales se clasifican en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Tabla 4).

Tabla 4. Características fisicoquímicas de las principales clases de lipoproteínas.

Clase de lipoproteína	Densidad (g/mL)	Diámetro (nm)	% Proteínas	% Triglicéridos	% Ésteres de Colesterol
Quilomicrones	<0.95	500 a 80	1.5-2.5	84-89	3-5
VLDL	0.95 a 1.019	80 a 30	5-10	50-65	10-15
LDL	1.019 a 1.063	25 a 18	20-25	7-10	35-40
HDL	1.063 a 1.210	5 a 12	40-55	3-4	12

(Tomada de Voet y col., 1995).

Las muestras de suero que fueron utilizadas para la obtención de lipoproteínas corresponden a los tratamientos de 6, 12 y 24 h postprandiales de la Etapa I (n=6).

4.5.3.1 Fraccionamiento del plasma

La obtención de lipoproteínas se realizó por fraccionamiento de las muestras de plasma mediante el método de gradiente isopícnico descrito por Grahman y col. (1996), en el cual se utiliza Optiprep, un reactivo no iónico (Iodixanol 60%) de los laboratorios Nycomed AS (Noruega). Para el procedimiento se requirió la disolución A compuesta por Optiprep (Iodixanol 60%) al 50% en NaCl 0.8% y disolución B compuesta por 60 mM de Hepes-NaOH en NaCl 0.8%, pH= 7.4.

En un tubo de policarbonato para microcentrífuga de 2 mL se colocaron 0.2 mL de Iodixanol 60% a manera de cojín seguido de una mezcla de 3 partes de suero con una parte de disolución A (Iodixanol 50%) y terminando con 0.2 mL de disolución B. Se procuró que el llenado fuera sin producir burbuja alguna. Una vez preparados los tubos se procedió a centrifugar a 356000g/16°C/4 h en una microcentrífuga de mesa con rotor de ángulo fijo (Beckman TL-100).

Pasado dicho tiempo se sacaron los tubos con cuidado de no romper el gradiente y se procedió al fraccionamiento manual con la ayuda de una micropipeta extrayendo desde la parte superior del tubo microvolúmenes de 100 μ L hasta terminar todo el volumen. Las fracciones se colocaron en forma individual en microtubos eppendorf de 500 μ L de capacidad colocándolos sobre hielo y procurando no exponerlas a la luz directa para evitar dañar a la astaxantina. Se colectaron de este modo un total 14 fracciones por tubo.

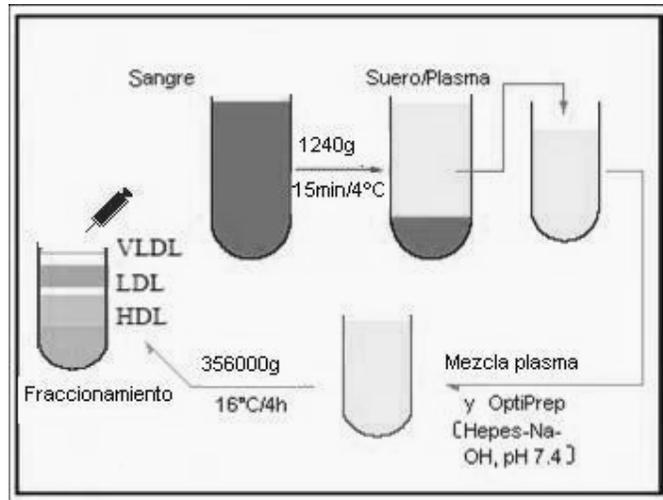


Figura 15. Diagrama que esquematiza la obtención de lipoproteínas por el método de gradiente isopícnico y la utilización de Iodixanol 60% (Optiprep).

4.5.3.2 Determinación de densidad de las fracciones de plasma

Inmediatamente después de finalizar el fraccionamiento del plasma se determinó el índice de refracción de cada una de las fracciones obtenidas con la ayuda de un refractómetro (ABBE, American Optical Corporation, NY). Los valores de densidad fueron calculados a partir de los valores de refracción de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Densidad \left(\frac{mg}{L} \right) = (IR * 3.298) - (3.396) \dots\dots\dots(2)$$

IR = índice de refracción

Al término de las mediciones de IR, se guardaron las fracciones a -70°C hasta el momento de su análisis bioquímico.

4.5.3.3 Estudios bioquímicos de las fracciones de plasma

El estudio bioquímico de las fracciones de plasma para la identificación de lipoproteínas se realizó en condiciones de refrigeración y baja luminosidad, con la ayuda de estuches comerciales de reactivos de la marca bioMérieux.

4.5.3.3.1 Proteínas

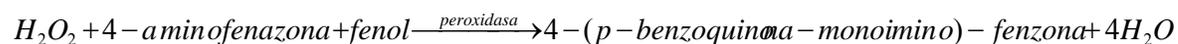
Las proteínas de las fracciones de plasma fueron determinadas por una reacción colorimétrica tipo Biuret (sales de cobre), leídas a 545 nm. En el cálculo de proteínas totales en las muestras se utilizó la siguiente fórmula:

Cálculo

$$\text{Proteínas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) / \text{Abs.Std}) * \text{Conc.Std.} \dots\dots\dots(3)$$

4.5.3.3.2 Colesterol

Éste es un ensayo indirecto que consiste en reacciones enzimáticas, la última de las cuales produce una coloración (quinoneimina), medida a 500 nm, proporcional a la cantidad de colesterol presente en la muestra. Las reacciones enzimáticas que ocurren durante el procedimiento son:

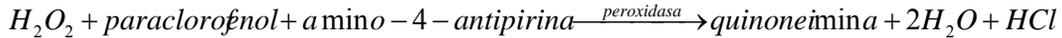
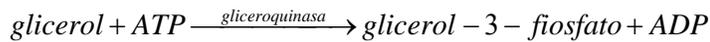
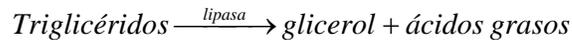


Cálculo

$$\text{Colesterol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) / \text{Abs.Std}) * \text{Conc.Std.} \dots\dots\dots(4)$$

4.5.3.3 Triglicéridos

La prueba se fundamenta en una serie de reacciones enzimáticas en donde la última da una coloración (quinoneimina), medida a 505 nm, que es proporcional a la cantidad de triglicéridos. Las reacciones enzimáticas de determinación de triglicéridos son:



Cálculo

$$\text{Triglicéridos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) / \text{Abs.Std}) * \text{Conc.Std.} \dots\dots\dots(5)$$

Una vez terminados los análisis bioquímicos, las fracciones fueron clasificadas y guardadas inmediatamente a -70°C hasta los análisis para la determinación de astaxantina por HPLC.

4.5.4 Intestino

La porción estudiada de intestino fue el duodeno, el cual en el jerbo mide de 5 a 6 cm de longitud a partir del estómago. Una vez extraída dicha porción, se lavó con disolución salina fría en una caja de petri y sobre una cama de hielo. Una vez limpio se guardó en tubos eppendorf, que se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y fiablemente se almacenaron en el congelador de -70°C hasta el momento de la extracción de astaxantina.

4.5.5 Hígado

Una vez extraído el hígado, se colocó en una caja petri con disolución salina isotónica fría sobre una cama de hielo, en la cual se lavó el órgano seccionándolo repetidas veces para permitir la eliminación de sangre del tejido.

Una vez limpias, las porciones de hígado fueron colocadas en tubos eppendorf y sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido. En el laboratorio, las muestras fueron conservadas en congelación a -70°C hasta el momento de la extracción de astaxantina.

4.5.6 Heces

Las heces fueron colectadas de la última porción del intestino grueso, y colocadas en tubos eppendorf y sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido para ser almacenados en el laboratorio a una temperatura de -70°C , hasta el momento de la extracción de astaxantina.

4.6 ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE ASTAXANTINA EN AMBAS ETAPAS DEL ESTUDIO

4.6.1 Extracción de astaxantina de las muestras

4.6.1.1 Del Plasma y Lipoproteínas

La extracción de astaxantina de plasma y lipoproteínas se realizó de acuerdo al método descrito por Østerlie y col. (2000), y fue adaptado a las condiciones del presente estudio. A 200 μ L de muestra (plasma o lipoproteínas), se agregó un volumen igual de metanol al 60% que contenía 0.05% de Butilhidroxitolueno (BHT) con el propósito de proteger a las muestras de posible oxidación. La mezcla se agitó en vortex por 20 seg, pasado este tiempo se agregaron 600 μ L de cloroformo y nuevamente se agitó por 20 seg. Después de un reposo de 10 min en oscuridad, la mezcla fue centrifugada a 11750g/4°C/10min en una centrífuga Eppendorf 5415; después se recuperaron 500 μ L de fase orgánica (cloroformo), la cual se filtró con un filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro. El extracto filtrado se colocó en un tubo eppendorf para la evaporación del cloroformo mediante un microevaporador de nitrógeno gaseoso hasta alcanzar sequedad completa del residuo y finalmente el tubo se mantuvo a -70°C, cubierto con papel aluminio hasta su análisis por HPLC.

4.6.1.2 Del Intestino, Hígado y Heces

El método empleado para la extracción de astaxantina fue tomado de Schmitz (1993) y modificado a las presentes condiciones. Se pesaron muestras de 1 g, 0.5 g y 0.3 g de hígado, intestino y heces, respectivamente, en tubos de vidrio corex y se agregaron 5 mL(hígado), 3 mL(intestino) y 4 mL(heces) de metanol al 60% con 0.05% de BHT.

Las muestras fueron homogeneizadas por 20 seg con un homogeneizador de tejidos Polytron y luego sonicadas por 10 seg, con el fin de romper las membranas plasmáticas y liberar a la astaxantina. Posteriormente, se agregaron volúmenes de 5 mL, 3 mL y 5 mL de cloroformo para las muestras de hígado, intestino y heces, respectivamente, y se centrifugaron a 1240g/20min/0°C en una centrifuga Sorvall RT6000. De la fracción de cloroformo se recuperaron 3mL de extracto, el cual fue filtrado con un filtro de 0.45µm de tamaño de poro. El extracto filtrado fue colocado en un tubo de rosca pyrex para la evaporación del cloroformo con nitrógeno gaseoso. Finalmente se guardaron las muestras a -70°C bajo oscuridad hasta su análisis por HPLC.

4.6.2 Determinación de astaxantina por HPLC.

4.6.2.1 Equipo y condiciones cromatográficas

Para la cuantificación de astaxantina se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters modelo 510 WAT con un detector 486 UV/VIS, un automuestreador 717 WAT, dos bombas modelo 510 WAT y un calentador de columna. La integración de los cromatogramas se hizo utilizando el software Millennium 2010 WAT. La fase móvil empleada para el análisis fue una mezcla de hexano:acetona (86:14) a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. La longitud de onda del detector fue de 470 nm, la temperatura de columna de 30°C y la presión de 50-80 bar. La columna empleada fue de silica gel de fase normal Spherisorb (Waters S_{5W}) de 4x125 mm, y fue acidificada previamente con H₃PO₄ al 1% en metanol de acuerdo a Vechi y col. (1987) para permitir la separación de isómeros geométricos de la astaxantina. Dicha columna estuvo protegida con una precolumna de silica gel Spherisorb 5M de 4.6x10 mm y 5 µm de tamaño de partícula.

4.6.2.2 Preparación de patrones

4.6.2.2.1 Patrón de astaxantina libre

Se pesaron 1.5 mg de astaxantina sintética (Hoffman-La Roche) en un matraz volumétrico de 50 mL, disolviéndose con 5mL de cloroformo para luego aforar con hexano (Disolución stock). De esta disolución stock se tomaron 2.5 mL y se transfirieron a un matraz de 50 mL, se agregaron 2 mL de cloroformo y se aforó con hexano. De este modo, se obtuvo una disolución patrón en 4.5% de cloroformo en hexano. La preparación siempre estuvo protegida de la luz y en refrigeración.

La determinación espectrofotométrica se realizó por triplicado a 470 nm utilizando como blanco una disolución de 4.5% de cloroformo en hexano. El cálculo de concentración se hizo utilizando la fórmula siguiente:

Cálculo de concentración

$$\text{Conc. Ax (mg/L)} = \frac{\text{Absorbencia} \times 10,000}{2100} \dots\dots\dots(6)$$

Donde:

2100 = ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) = Coeficiente de extinción molar de una disolución de astaxantina al 1% (p/v) en una celda de 1cm, a una longitud de onda de 470 nm en hexano.

10 000 es un factor para que el resultado se exprese en mg.

Inmediatamente después de su preparación, se inyectaron por triplicado 20 μ L de disolución estándar en el equipo HPLC. De este modo se obtuvo el pico de astaxantina correspondiente al isómero *trans*, así como los isómeros *cis* (9*cis* y 13 *cis*).

La astaxantina total en el patrón está representada por la suma de las áreas del isómero *trans* , el isómero 9 *cis* y el isómeroa 13 *cis* y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Área de astaxantina total} = (\text{Área } \textit{trans}) + 1.2 (\text{Área } 9\textit{cis}) + 1.6 (\text{Área } 13\textit{cis}) \dots\dots\dots(7)$$

Los valores de 1.2 y 1.6 representan un factor de corrección al factor de extinción molar por tratarse de las formas *cis* de astaxantina.

4.6.2.2 Patrones de astaxantina esterificada

Con el objeto de identificar las posibles formas esterificadas de astaxantina en las muestras biológicas del jerbo, se utilizaron como patrones las muestras de astaxantina extraídas de langostilla *Pleuroncodes planipes* caracterizadas por Coral y col. (2002). Después de la separación por cromatografía en placa (TLC) de las bandas correspondientes a la astaxantina monoesterificada y diesterificada, éstas fueron extraídas y repurificadas por TLC y después inyectadas en el HPLC para su detección a las mismas condiciones cromatográficas que el estándar sintético. El T_R característico de la fracción monoesterificada de astaxantina fue de 4 min en tanto que la fracción diesterificada fue de 2 min. El área de los picos fue dependiente de su concentración.

4.6.2.3 Patrón de β -caroteno

Con el objeto de identificar la presencia de β -caroteno en las muestras se preparó un estándar, para lo cual se disolvió 1mg de β -caroteno (Sigma) en 100 mL de hexano (Solución stock). De esta solución se tomó 1 mL para aforar a 10 mL de hexano. Se realizó un estudio espectrofotométrico para obtener el espectro de absorción de la muestra de 330-600 nm UV/VIS. Posteriormente se inyectaron 20 μ L al equipo de HPLC para obtener el T_R . Como el objetivo era solo identificar al β -caroteno en el estudio, no fue necesario calcular su concentración.

4.6.2.3 Determinación de astaxantina en plasma y lipoproteínas

Para la determinación de astaxantina por HPLC se inyectaron primero los patrones, en volúmenes de 20 µL por triplicado utilizando como fase móvil una mezcla de acetona-hexano (14:86), en tiempo de corrida de 12 min aproximadamente. Después de los patrones, las muestras fueron reconstituidas previamente con 100 µL de fase móvil e inyectadas en el equipo en volúmenes de 30 µL en el mismo tiempo de corrida que los estándares (Alrededor de 10 min). Una vez obtenidos los cromatogramas, los picos de interés fueron integrados y analizados al momento.

El cálculo de concentración de astaxantina en las muestras se hizo con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración [Ax]} = \frac{(AM)(V.\text{CH}_3\text{Cl})(VR)(CP)(VP)}{(AP)(MT)(VE)(VM)} \dots\dots\dots(8)$$

AM= Área total de la muestra

VCH₃Cl = Volumen de cloroformo utilizado en la extracción (µL)

VR= Volumen de reconstitución antes de inyectar al HPLC (µL)

CP= Concentración del patrón (µg/mL)

VP= Volumen de inyección del patrón (µL)

AP= Área del pico del patrón

MT= Volumen o Peso total del cual se extrajo la astaxantina (µL o g)

VE= Volumen de disolvente evaporado (µL)

VM= Volumen de inyección de la muestra (µL)

Para calcular el área de astaxantina libre total en la muestra se sumaron las áreas de astaxantina *trans* y astaxantina *cis* (*9cis* y *13cis*) recurriendo a la fórmula 7. Dicho valor obtenido (AM) fue incorporado en la fórmula 8.

4.6.2.4 Determinación de astaxantina en intestino, hígado y heces

Para la determinación de astaxantina por HPLC de estas muestras, se inyectaron primero los patrones, en volúmenes de 20 µL por triplicado con la fase móvil de acetona-hexano (14:86) y con tiempo de corrida de 12 min. Posteriormente las muestras fueron reconstituidas con 500 µL de fase móvil en el caso de heces y 100 µL en el caso de hígado e intestino. Éstas fueron inyectadas al equipo en volúmenes de 30 µL en el caso de heces y 100 µL en el caso de hígado e intestino. Lo último fue necesario debido a la poca concentración de astaxantina en la muestra, mientras que en el caso de heces, su detección no presentó obstáculos con 30 µL. Una vez obtenidos los cromatogramas de las muestras fueron integrados los picos de interés el mismo día del análisis.

El cálculo de la concentración de astaxantina en las muestras se hizo con la fórmula (8).

Como en el caso anterior el cálculo del área de la astaxantina libre total en las muestras se sumaron las áreas de astaxantina *trans* y astaxantina *cis* (*9cis* y *13cis*) recurriendo a la fórmula 7. El valor obtenido (AM) fue incorporado a la fórmula 8.

Para el cálculo de la concentración de astaxantina monoesterificada y diesterificada se tomaron en cuenta las concentraciones de los patrones correspondientes, calculadas por espectrofotometría, y las áreas obtenidas por HPLC, utilizando la fórmula 8.

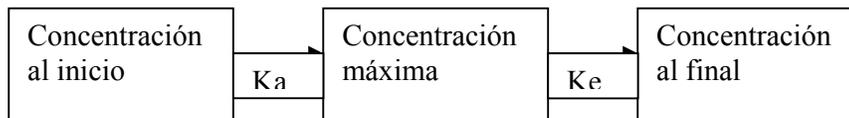
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de las dosis en los organismos fue analizado en forma independiente. En cada caso (Etapa I y II), el efecto del tiempo postpandrial en el contenido de astaxantina fue determinado mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 5% ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas entre las medias obtenidas en cada tiempo postpandrial fueron compradas con la prueba Duncan ($\alpha=0.05$).

Ambas determinaciones fueron hechas en el programa estadístico SPSS, versión 10.0 para Windows.

4.8 FARMACOCINETICA DE ASTAXANTINA EN PLASMA

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados a partir de las concentraciones de astaxantina en plasma de la etapa I debido a que en dicho estudio se tuvo el número de datos suficientes para los cálculos. Con este propósito, se utilizó un modelo abierto de un compartimento (MAUC) de administración oral, el cual se esquematiza como sigue:



Donde K_a es la constante de absorción y K_e la constante de eliminación.

Los parámetros determinados fueron el tiempo de máxima absorción (t_{max}), la constante de eliminación (K_e) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) a partir de datos plasmáticos. Como un dato adicional, se determinó el tiempo de máxima eliminación de astaxantina a partir de los datos de heces.

El uso de este modelo parte de las siguientes suposiciones como ciertas:

- En el compartimento, en este caso plasma, hay una distribución uniforme de astaxantina y se presentan las mismas propiedades cinéticas.
- Toda la astaxantina se encuentra en el sitio de absorción.
- La astaxantina se absorbe mediante un proceso de primer orden y una constante K_a .
- La astaxantina se elimina mediante un proceso de primer orden y una constante K_e .
- El proceso de absorción es más rápido que el proceso de eliminación.
- Se requieren cuatro datos para calcular la constante de eliminación.

Ecuación de velocidad

$$dC_{Ax}/dt = k_e C_{Ax}$$

En donde:

dC_{Ax}/dt : Es el cambio de concentración de astaxantina en plasma a través del tiempo.

k_e : La constante de eliminación de astaxantina

C_{Ax} : La concentración del fármaco en plasma en cierto momento

La constante de eliminación (k_e) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), fueron calculadas a partir del logaritmo natural (\ln) de las concentraciones en plasma, para después ser graficadas en función del tiempo. Posteriormente se utilizaron solo los datos correspondientes al proceso de eliminación para obtener una recta cuya pendiente fue negativa y corresponde a la k_e . El tiempo de vida media se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$t_{1/2} = 0.693/k_e \dots\dots\dots(9)$$

Por otro lado los tiempos de máxima absorción y eliminación se obtienen de las gráficas de concentración de astaxantina en función del tiempo en plasma y en heces, respectivamente.

V. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE CAROTENOIDES Y ASTAXANTINA EN LA HARINA DE ACOCIL

5.1.1. Valoración espectrofotométrica

El análisis espectrofotométrico del extracto crudo (EC) de la harina de acocil en el intervalo de 330 a 600 nm (VIS) en hexano, mostró una curva espectral monofásica, con un pico de máxima absorbencia a los 470 nm (Figura 16) y semejante a la curva del carotenoide patrón (astaxantina sintética de Hoffman-Roche, Basilea, Suiza). De este modo se constató que el carotenoide predominante en el extracto crudo es la astaxantina

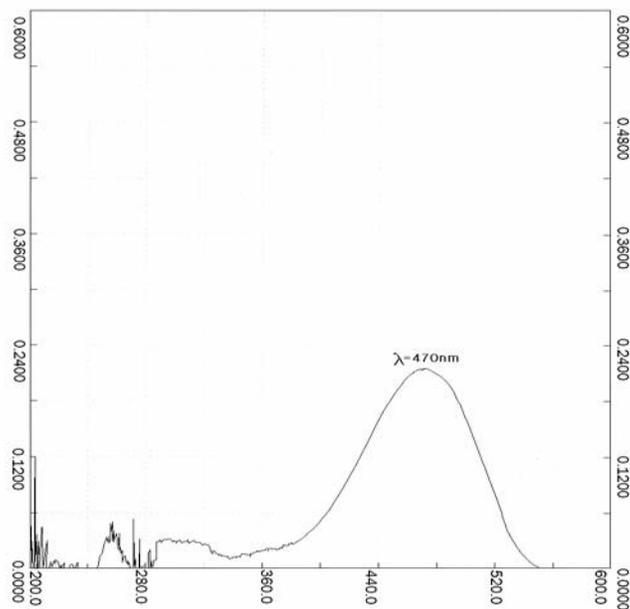


Figura 16. Curva espectral del extracto crudo de la harina de acocil en hexano.

El contenido de carotenoides totales determinado en dicho extracto fue de 342 ± 1.45 mg/kg.

5.1.2. Estudio cromatográfico en capa fina (TLC)

El análisis cromatográfico en capa fina (TLC) (Figura 17), permitió observar en el EC la presencia de cuatro bandas de carotenoides, las cuales por medio de sus parámetros espectrofotométricos y en comparación con la de los patrones, fueron identificadas como astaxantina libre (AxL), astaxantina monoesterificada (AxM), astaxantina diesterificada (AxD) y β -caroteno (Tabla 5 y Figura 17).

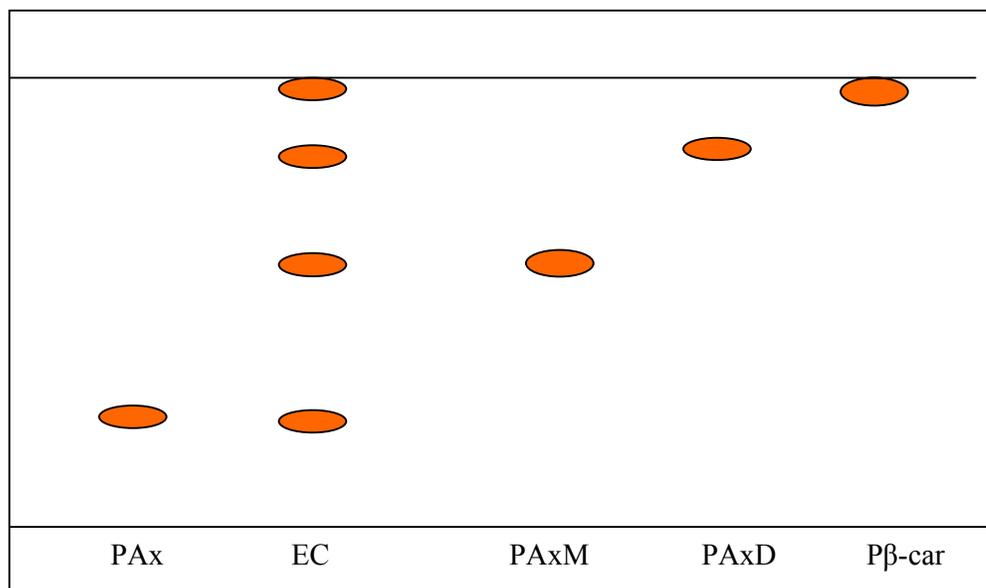


Figura 17. Esquema que representa el desarrollo cromatográfico en capa fina (TLC) del extracto crudo de la harina de acocil en paralelo con los patrones. PAx: Patrón de astaxantina libre sintética (Hoffman-LaRoche); EC: Extracto crudo; PAxM: Patrón de astaxantina monoesterificada (langostilla); PAxD: Patrón de astaxantina diesterificada (langostilla); Pβ-car: Patrón de β -caroteno sintético (Sigma). Fase móvil: mezcla de hexano:acetona (70:30, v/v).

Tabla 5. Parámetros cromatográficos (TLC) de los carotenoides encontrados en el extracto crudo de harina de acocil.

	Carotenoides en los patrones Rf Hx:Ac (70:30)	Carotenoides en el extracto de acocil Rf Hx:Ac (70:30)	λ_{\max} (nm)
Patrón β -Caroteno	> 0.95	>0.95	437-450
Ax Diéster	0.93	0.93	469
Ax Monoéster	0.60	0.56	468
Patrón Roche de Ax	0.40	0.39	470

Entre los carotenoides encontrados en el extracto crudo de la harina de acocil, la astaxantina representó entre el 95 a 98% del total, seguido por el β -caroteno con una abundancia menor al 5% como se presenta en la figura 18. Por esta razón, se consideró al residuo oleoso de dicho extracto como fuente de astaxantina natural.

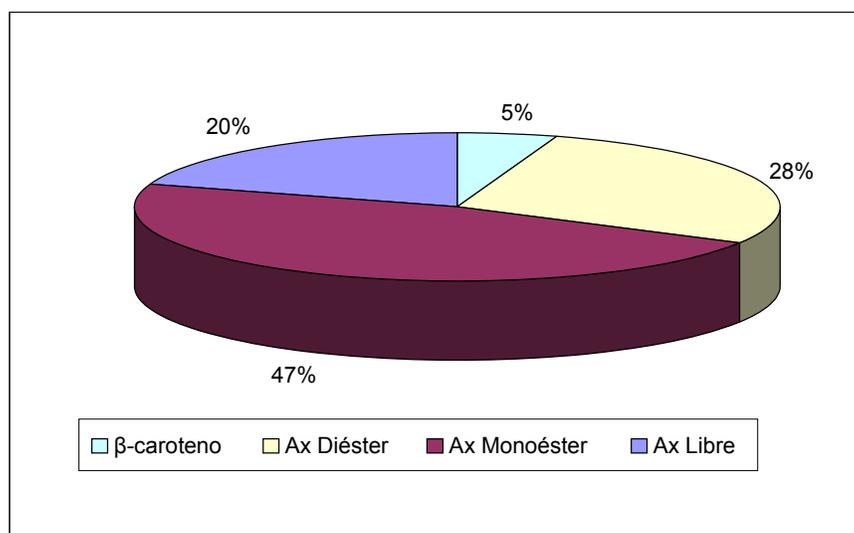


Figura. 18. Representación proporcional de los carotenoides encontrados en el extracto de acocil. Astaxantina libre (AxL), astaxantina monoesterificada (AxM), astaxantina diesterificada (AxD) y β -caroteno.

Particularmente, la astaxantina en dicho extracto estuvo compuesta por 20% en forma libre y 75% esterificada (monoésteres y diésteres de astaxantina). Dicha composición es semejante a la observada en otros crustáceos comestibles como el camarón *Penaeus vanamei* (Schiedt, 1990), *Pandalus borealis* (Guillou y col., 1995), el acocil *Procambarus clarkii* (Meyers y col., 1981). Un hecho que podría explicar la baja cantidad de β -caroteno en el extracto es la remoción total del tejido blando de los cefalotórax que se hizo antes de la elaboración de la harina. Es bien sabido que el hepatopáncreas de los crustáceos es un órgano rico en carotenoides, principalmente en β -caroteno (Britton y col., 1998).

5.1.3. Estudio por cromatografía líquida (HPLC)

5.1.3.1 Patrones

Las cromatografías de los patrones utilizados están representadas en las Figuras 19 a 22.

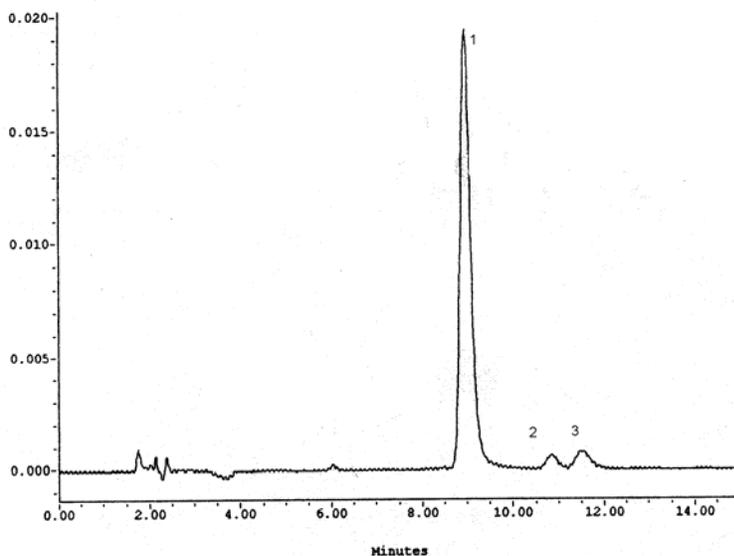


Figura 19. Cromatografía por HPLC del patrón de astaxantina sintética (Hoffman-Roche) con sus isómeros geométricos *trans/cis*. Astaxantina *trans* (1)($T_R=9$ min), astaxantina 9 *cis* (2)($T_R=10.8$ min) y astaxantina 13 *cis* (3)($T_R= 11.5$ min).

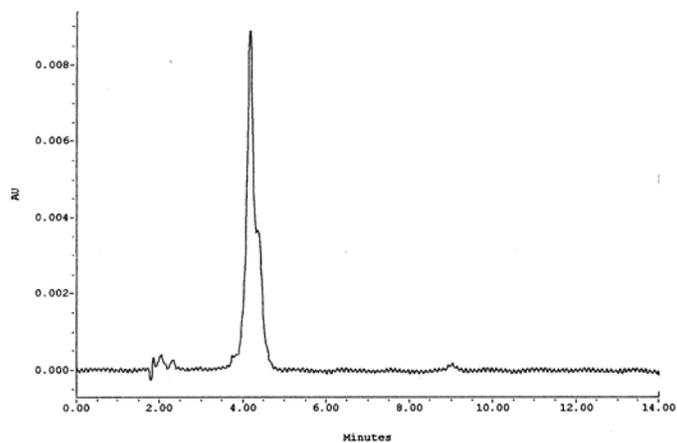


Figura 20. Cromatografía por HPLC de astaxantina monoesterificada ($T_R= 4.3$ min).

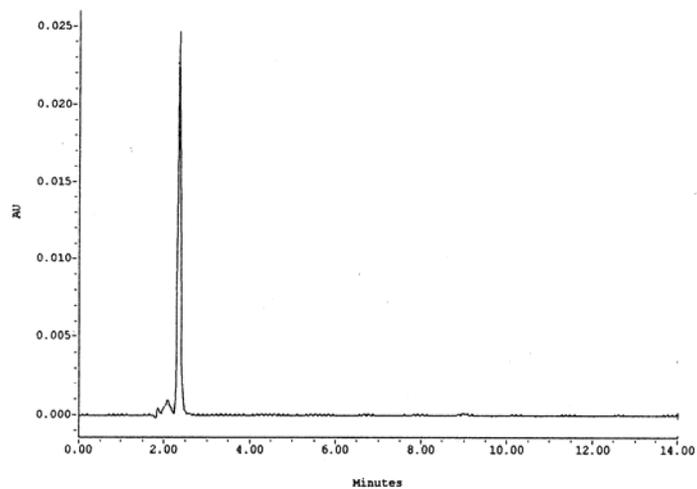


Figura 21. Cromatografía por HPLC de astaxantina diesterificada ($T_R= 2.5$ min).

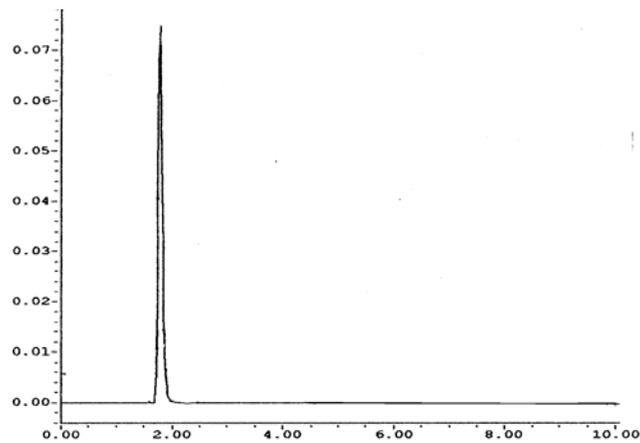


Figura 22. Cromatografía por HPLC del β -caroteno (Sigma) ($T_R= 1.8$ min).

5.1.3.2 Extracto crudo de la harina de acocil.

El estudio por HPLC del extracto se muestra en la figura 23. Concordante con los resultados de la prueba cromatográfica en capa fina (TLC), se observó que la astaxantina en el acocil se encuentra esterificada, 47% como monoésteres (AxM), 28% como diésteres (AxD) y 20% en forma libre (AxL). A su vez, la AxL una vez purificada mostró en el análisis por HPLC una composición isomérica formada en un 85% por el isómero geométrico *trans*, 3% como isómeros 9 *cis* y 12% como 13 *cis* (Figura 24).

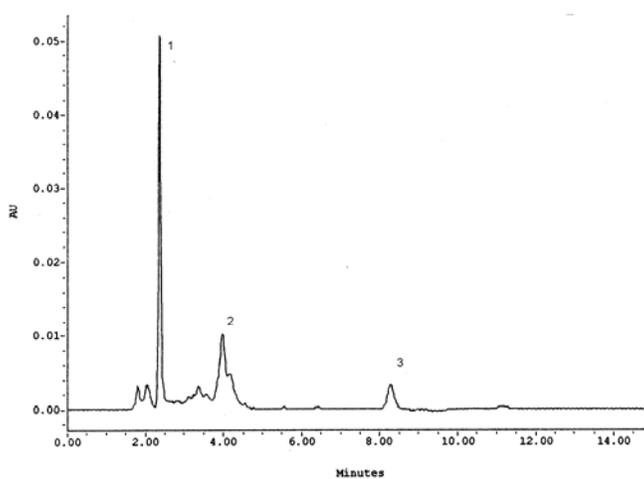


Figura 23. Cromatografía del extracto de acocil mostrando las tres formas de astaxantina: AxD (1)($T_R=2.3$ min), AxM (2)($T_R = 4.0$ min), AxL (3)($T_R = 8.3$ min).

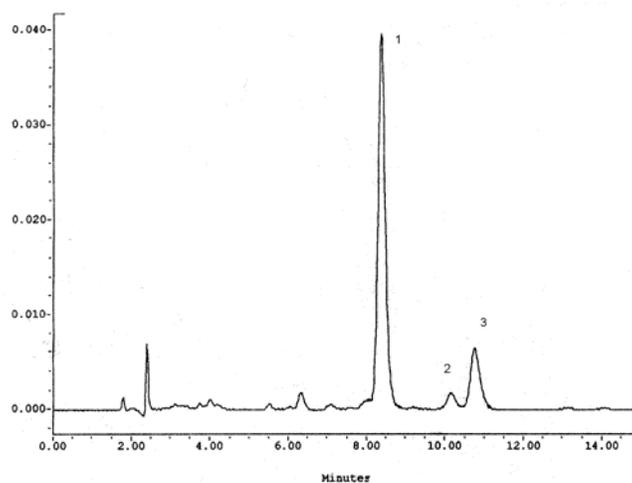


Figura 24. Cromatografía (HPLC) de la astaxantina libre aislada y purificada del extracto crudo de acocil mostrando su composición isomérica *trans/cis*. Isómero *trans* (1)($T_R = 8.5$ min), 9 *cis* (2)($T_R= 10.3$ min) y 13 *cis* (3)($T_R= 10.8$ min).

5. 2. RESULTADOS DE LA ETAPA I

5.2.1. Astaxantina en plasma

En plasma, la astaxantina fue detectada sólo en forma libre y en la forma isomérica *trans* (Figura 25). Es probable que debido a la baja concentración del carotenoide en dicho tejido no haya sido posible la detección de los isómeros geométricos *cis*. Como se muestra en la tabla 6, entre las 12 y 18 h se observó una cantidad significativamente superior ($P < 0.05$) de astaxantina en este tejido, con un máximo a las 12 h, decayendo gradualmente hasta las 96 h (Tabla 6).

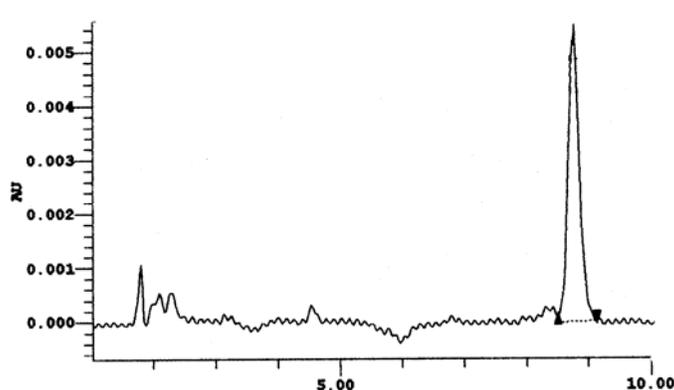


Figura 25. Cromatograma representativo del análisis por HPLC de astaxantina en plasma, 12 h después de la administración de la dosis oral de 1 mg/kg ($T_R = 8.8$ min).

Tabla 6. Astaxantina total en plasma de jerbo determinada por HPLC después de una dosis oral de 1 mg/kg.

Tiempo postprandial (h)	Ax Total ($\mu\text{g/mL}$)
0	0.000 ± 0.000^c
6	0.011 ± 0.009^{abc}
12	0.023 ± 0.014^a
18	0.021 ± 0.008^{ab}
24	0.019 ± 0.007^{ab}
48	0.012 ± 0.004^{abc}
96	0.006 ± 0.002^{bc}

Medias \pm DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos postprandiales.

5.2.2. Lipoproteínas del plasma

El fraccionamiento del plasma por el método de gradiente de densidad con Iodixanol (Optiprep), permitió la obtención de catorce fracciones por muestra. Los valores registrados para densidad, proteínas, colesterol y triglicéridos de las fracciones, se exponen en las gráficas representativas de las Figuras 26, 27, 28 y 29, respectivamente.

5.2.2.1. Determinación de densidad

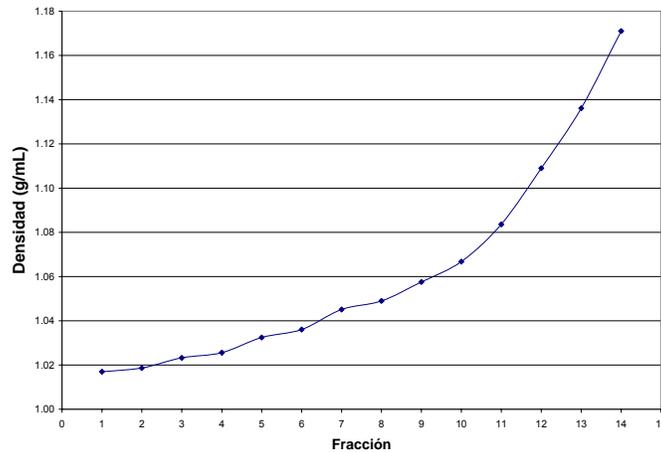


Figura 26 Determinación de la densidad en las fracciones de plasma de jerbo.

5.2.2.2. Determinación de proteínas

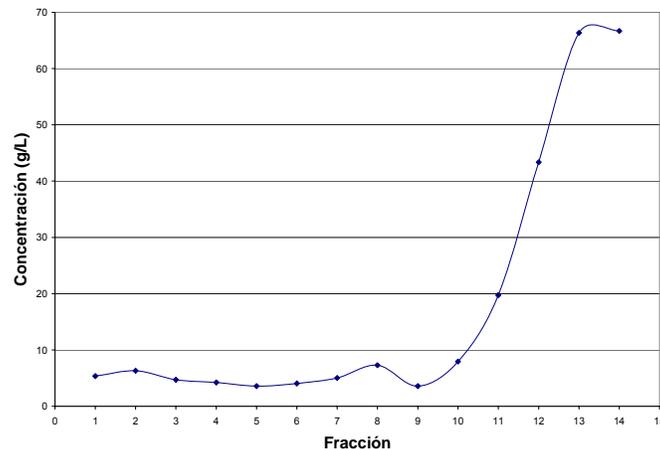


Figura 27. Determinación de proteínas en las fracciones de plasma de jerbo.

5.2.2.3. Determinación de colesterol

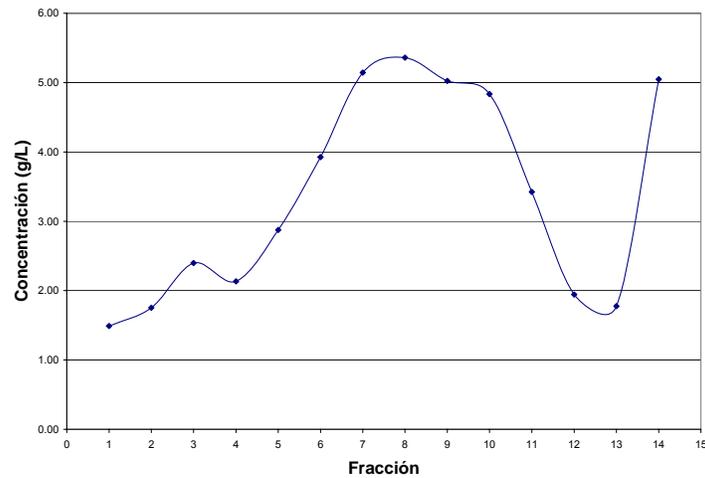


Figura 28. Determinación de colesterol en las fracciones de plasma de jerbo.

5.2.2.4. Determinación de triglicéridos

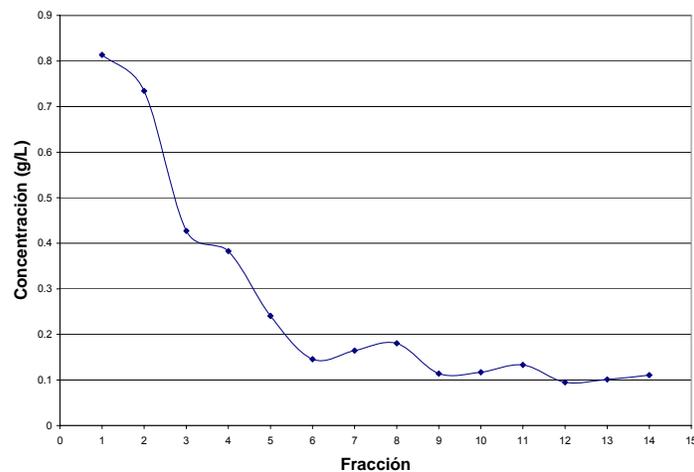


Figura 29. Determinación de triglicéridos en las fracciones de plasma de jerbo.

5.2.2.5. Clasificación de las lipoproteínas del plasma

Después de determinar los parámetros fisicoquímicos, las fracciones obtenidas fueron reunidas en tres clases de lipoproteínas: VLDL, LDL y HDL, atendiendo también a los valores de la literatura (Tabla 7). La porción de más alta densidad fue identificada como proteínas del plasma (Fracción 14).

Tabla 7. Clasificación de lipoproteínas en plasma de jерbo y parámetros fisicoquímicos considerados.

Tipo de lipoproteína	Número fracción	Densidad (g/mL)	Proteína (g/L)	Triglicéridos (g/L)	Colesterol (g/L)
VLDL	1 y 2	< 1.02	5.1-6.5	0.70-0.85	1.0-2.0
LDL	4-7	1.025-1.05	3.5-5	0.14-0.40	2.1-5.2
HDL	10-13	1.06-1.14	7.9-66.5	0.08-0.12	4.9-1.7

5.2.3. Astaxantina en lipoproteínas del plasma

Como el volumen de cada clase de lipoproteína procedente de un organismo no fue suficiente para la determinación de astaxantina total, éstas fueron reunidas en una muestra por tratamiento para su análisis por duplicado a las 6, 12 y 24 h postprandiales. Al igual que en el plasma, el análisis por HPLC mostró en lipoproteínas la presencia sólo de astaxantina libre en su forma isomérica *trans*. La mayor concentración de ésta fue observada en las lipoproteínas VLDL a las 6, 12 y 24 h, mientras que en LDL se pudo observar sólo durante las doce primeras horas y en HDL no se detectó (Figura 30).

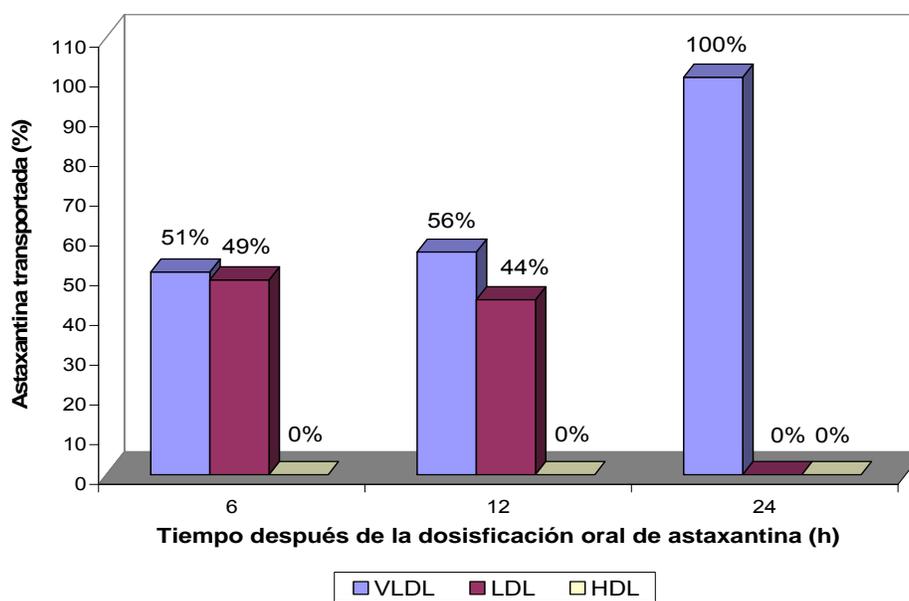


Figura 30. Distribución porcentual de la astaxantina con respecto al total en lipoproteínas después de la dosis única de 1 mg/kg.

5.2.4. Astaxantina en hígado

En este órgano no se detectó presencia clara de astaxantina. El hígado es un órgano que almacena preferentemente β -caroteno y otros carotenoides esterificados como la astaxantina diesterificada (Britton y col., 1998; Schiedt, 1990). Debido a la gran afinidad polar de estos dos carotenoides, el tiempo de retención de ambos en las condiciones del presente estudio fue bastante cercano y en ocasiones indiscriminable. Por lo consiguiente, el único pico detectado en hígado (Figura 31) se consideró como perteneciente a β -caroteno.

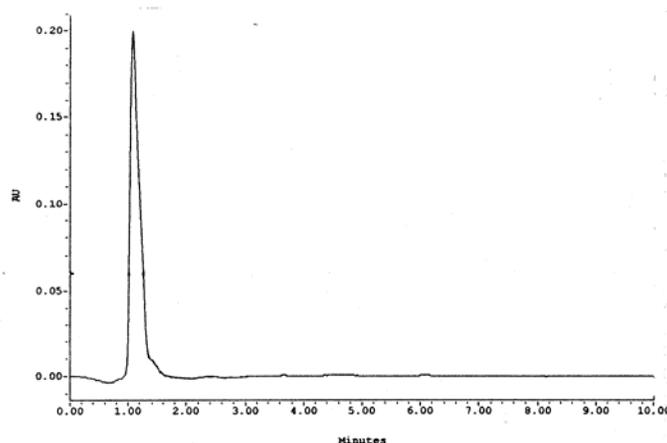


Figura 31. Cromatograma representativo del análisis por HPLC del extracto de hígado de jerbo después de la dosis oral de 1 mg/kg de peso vivo.

5.2.5. Astaxantina en intestino

En el intestino se identificó, además de astaxantina, β -caroteno (Figura 32). El contenido de astaxantinas AxL, AxM y AxD calculadas por HPLC fueron diferentes con respecto a las mismas en el extracto de acocil (Figura 33).

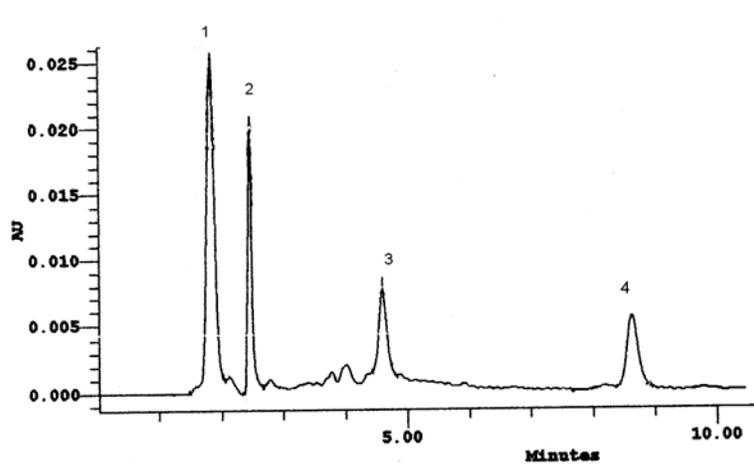


Figura 32. Cromatograma representativo del análisis por HPLC de astaxantina en intestino de jerbo después de una dosis oral de 1 mg/kg de peso vivo. β -caroteno (1)(T_R =1.8 min), AxD (2)(T_R = 2.5 min), AxM (3)(T_R = 4.5min), AxL *trans* (4)(T_R =8.5min).

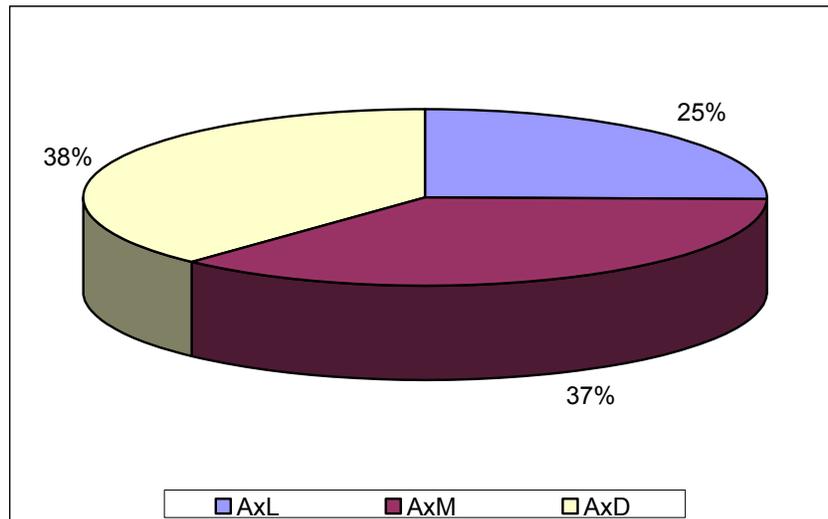


Figura 33. Distribución de formas de la astaxantina en intestino, entre las 12 y 18 h después de la administración de la dosis de 1mg/kg.

Es posible distinguir un claro incremento de AxL con respecto al del extracto de acocil administrado (Figura 18), lo cual sugiere una actividad hidrolítica previa a su absorción. Después de la administración de la dosis, las concentraciones de astaxantina en este tejido fueron significativamente más altas entre las 6 y 18 h, siendo mayor a las 12 h como se expone en la tabla 8.

Tabla 8. Astaxantina total en intestino de jerbo determinada por HPLC después de una dosis oral de 1 mg/kg.

Tiempo Postprandrial (h)	Ax Total (µg/g)
0	0.000 ± 0.000 ^c
6	0.117 ± 0.036 ^a
12	0.120 ± 0.022 ^a
18	0.109 ± 0.051 ^a
24	0.027 ± 0.025 ^{bc}
48	0.041 ± 0.017 ^b
96	0.000 ± 0.000 ^c

Medias ± DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa (P<0.05) entre los tiempos postprandriales.

La astaxantina libre detectada en intestino en esta etapa de estudio presentó la forma isomérica *trans* como único isómero (Figura 32).

5.2.6. Astaxantina en heces

Durante las primeras horas postpandriales se observó la mayor concentración de astaxantina en heces llegando a tener un pico de mayor nivel significativo a las 12 h ($P < 0.05$). Este comportamiento hace suponer una utilización metabólica y eliminación rápida del carotenoide en el jerbo *Meriones unguiculatus*. (Tabla 9). El contenido y distribución de astaxantina total en los diferentes tratamientos se presenta en la tabla 9.

El análisis por HPLC demostró que la astaxantina en dichas muestras se encuentra principalmente en forma libre y como monoésteres y diésteres (Figuras 34 y 35). La astaxantina libre a su vez estuvo constituida por los isómeros geométricos *trans* (84%), 9 *cis* (4.5%) y 13 *cis* (11.5%) (Figura 36), características isoméricas muy semejantes a aquellas observadas en la astaxantina del extracto utilizada en la dosis (Figura 24).

Tabla 9. Astaxantina total en heces de jerbo determinada por HPLC después de una dosis oral de 1 mg/kg.

Tiempo Postpandrial (h)	Ax Total ($\mu\text{g/g}$)
0	0.000 \pm 0.000 ^c
6	12.02 \pm 6.97 ^b
12	27.18 \pm 12.04 ^a
18	6.94 \pm 12.72 ^{bc}
24	6.65 \pm 3.13 ^{bc}
48	1.79 \pm 0.84 ^c
96	1.70 \pm 0.55 ^c

Medias \pm DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos postpandriales.

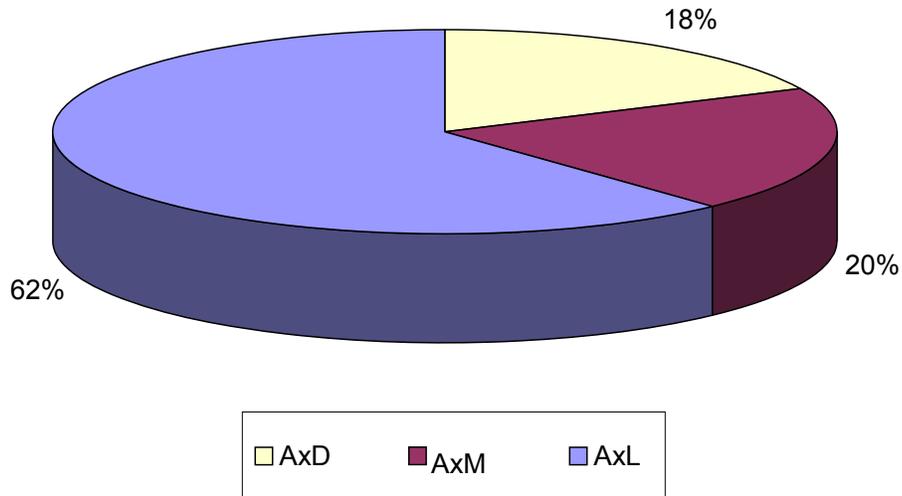


Figura 34. Distribución de formas de la astaxantina en heces de jerbo después de la administración de la dosis de 1 mg/kg.

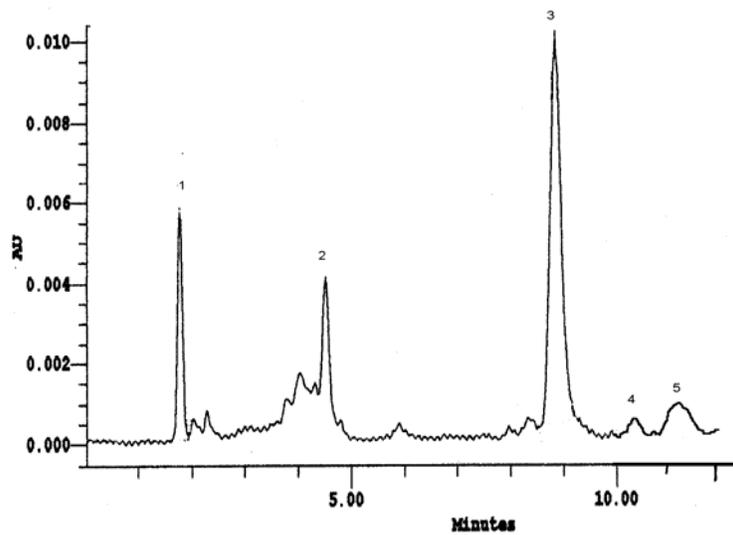


Figura 35. Cromatograma representativo del análisis por HPLC de la astaxantina en heces de jerbo después de una dosis oral de 1 mg/kg. Diéster de astaxantina (1) ($T_R=1.8$ min), monoéster de astaxantina (2) ($T_R = 4.6$ min), astaxantina *trans* (3) ($T_R=8.8$), astaxantina 9 *cis* (4) ($T_R = 10.5$ min) y astaxantina 13 *cis* (5) ($T_R = 11.3$ min).

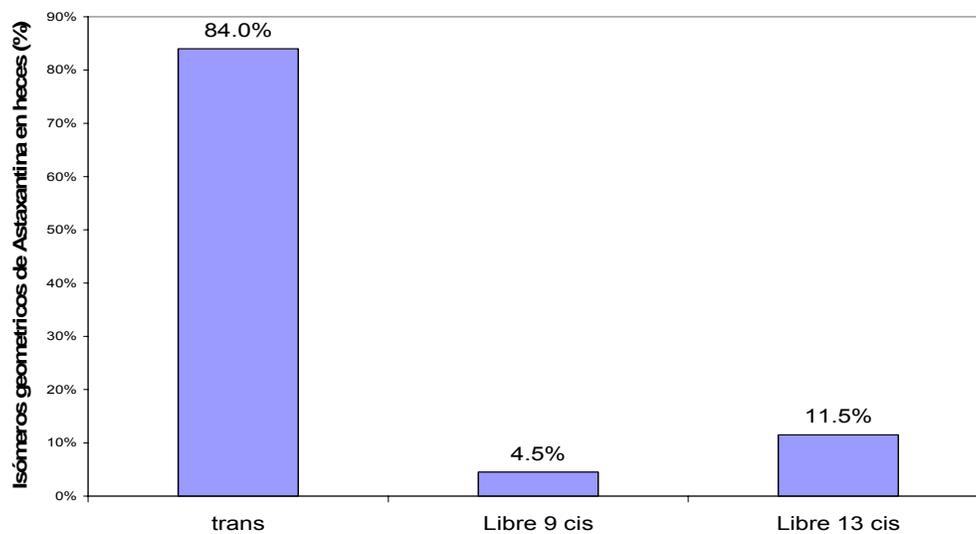


Figura 36. Isómeros geométricos de la astaxantina en heces en el período de mayor excreción (6-12 h) observada con la dosis de 1 mg/kg.

5.3 RESULTADOS DE LA ETAPA II

5.3.1 Astaxantina en plasma

Como en la etapa precedente, la astaxantina en plasma se observó sólo en forma libre y el isómero *trans* con características cromatográficas como las mostradas en la figura 25 (Astaxantina en plasma de la Etapa I). Como era de esperarse, las concentraciones del carotenoide en este tejido durante las primeras horas (Tabla 10) fueron aproximadamente 5 veces mayor que aquellas de la etapa anterior, lo cual mantiene correspondencia con la concentración de astaxantina utilizada en esta parte del estudio (5 mg/kg). El pico de mayor concentración de astaxantina ($P < 0.05$) en plasma fue como en el caso anterior, a las 12 h, seguido de una disminución de 10 veces a las 48h.

Tabla 10. Astaxantina total en plasma de jerbo determinada por HPLC después de una dosis oral de 5 mg/kg.

Tiempo Postprandial (h)	Ax Total ($\mu\text{g/mL}$)
0	$0.000 \pm 0.000^{\text{d}}$
3	$0.040 \pm 0.004^{\text{b}}$
6	$0.063 \pm 0.260^{\text{b}}$
12	$0.111 \pm 0.014^{\text{a}}$
24	$0.025 \pm 0.006^{\text{c}}$
48	$0.013 \pm 0.004^{\text{cd}}$

Medias \pm DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos postprandiales.

5.3.2 Astaxantina en lipoproteínas

En la presente etapa de la investigación no se determinó astaxantina en estas partículas debido a la escasa cantidad de plasma para la obtención lipoproteínas.

5.3.3 Astaxantina en hígado

Al igual que en el estudio anterior (I), el análisis cromatográfico por HPLC no mostró la presencia de astaxantina.

5.3.4 Astaxantina en intestino

En el intestino se encontraron las tres formas de astaxantina (libre, monoesterificada y diesterificada), además de β -caroteno. El contenido de astaxantina en este órgano fue mayor entre las 6 y las 24 h postprandiales, siendo significativamente más notable ($P < 0.05$) a las 6 h (Tabla 11).

Tabla 11. Astaxantina total en intestino de jerbo determinada por HPLC después de una dosis oral de 5 mg/kg.

Tiempo Postprandial (h)	Ax Total ($\mu\text{g/g}$)
0	0.000 ± 0.000^d
3	0.124 ± 0.125^{cd}
6	0.383 ± 0.162^a
12	0.140 ± 0.068^{bc}
24	0.258 ± 0.097^{ab}
48	0.046 ± 0.009^{cd}

Medias \pm DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos postprandiales.

Las proporciones de las diferentes formas de astaxantina en los períodos de mayor absorción del carotenoide en el tejido (6 a 12 h) se muestran en la figura 37.

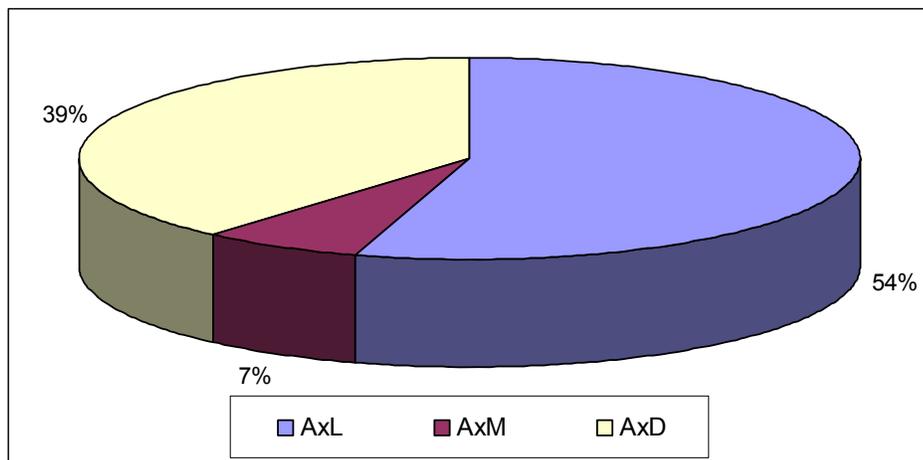


Figura 37. Distribución de las formas de astaxantina en intestino de jerbo después de la administración de la dosis de 5 mg/kg.

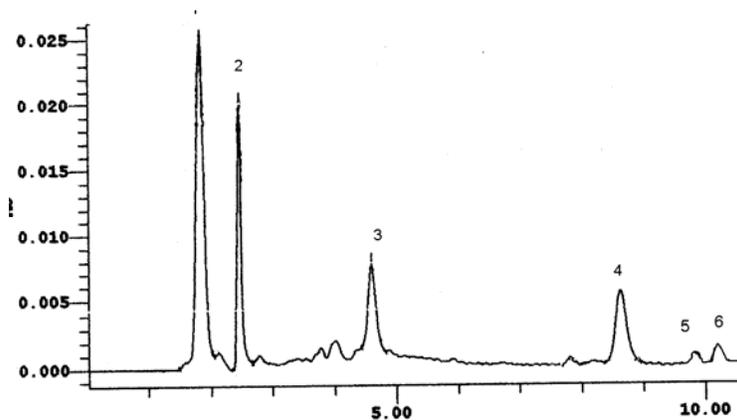


Figura 38. Cromatograma representativo del análisis por HPLC de astaxantina en intestino de jerbo después de una dosis oral de 1 mg/kg de peso vivo. β -caroteno (1)(T_R =1.8 min), AxD (2)(T_R = 2.5 min), AxM (3)(T_R = 4.5min), AxL *trans* (4)(T_R =8.5min), AxL *9cis* (5)(T_R =9.8 min), AxL *13cis* (6)(T_R =10.2min).

En este mismo período de mayor absorción, se observó que la astaxantina libre presente en intestino tuvo una composición isomérica como se muestra en las figuras 38 y 39.

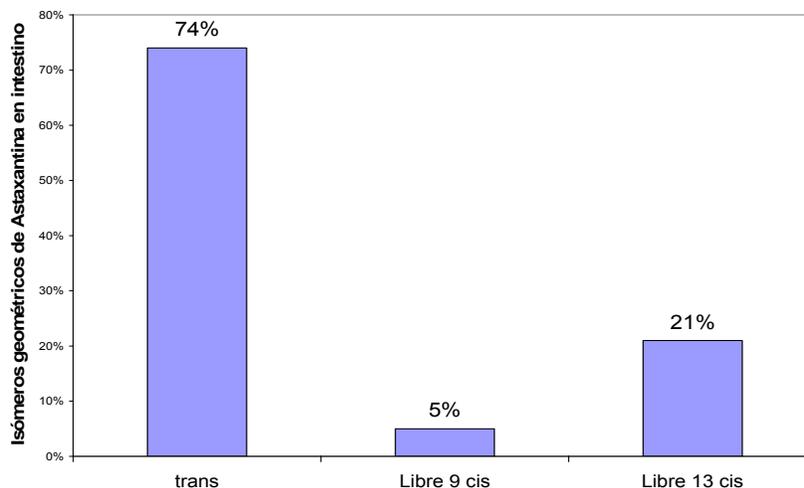


Figura 39. Isómeros geométricos de la astaxantina en intestino en el período de mayor absorción (6 a 24 h) observada en los jerbos después de la dosis de 5 mg/kg.

5.3.5 Astaxantina en heces

En heces fueron encontradas las tres formas conocidas de astaxantina; astaxantina diesterificada, astaxantina monoesterificada y astaxantina libre. Esta última con sus formas isoméricas *trans* (66%), *9 cis* (10%) y *13 cis* (24%) como se muestra en las figuras 40 y 41.

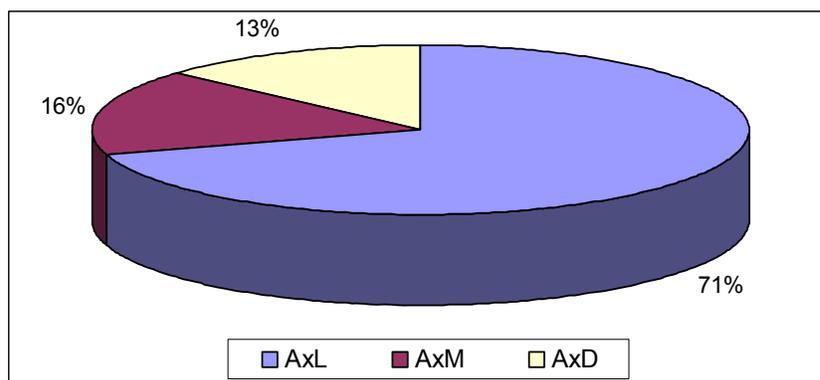


Figura 40. Distribución de formas de astaxantina en heces de jervo en el periodo de mayor excreción (6 a 12 h) después de la dosis de 5 mg/kg.

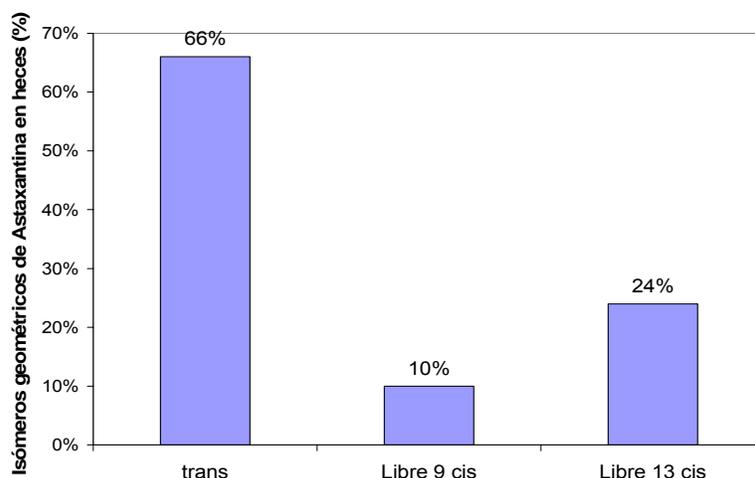


Figura 41. Isómeros de astaxantina en heces de jerbos en el periodo de mayor excreción (6 a 12 h) después de la dosis de 5 mg/kg.

En la tabla 12 se muestra la cantidad de astaxantina en heces de jerbos después de recibir la dosis de 5 mg/kg. Es notable que la mayor cantidad de pigmento es eliminada vía heces de las 6 a las 12 h, seguida de una disminución gradual hasta las 48 h.

Igualmente notable es la alta variación de este parámetro entre los organismos del mismo tratamiento. Variaciones intraespecíficas en el contenido de carotenoides son atribuidas a diversos factores entre los que se pueden sospechar las facilidades metabólicas inherentes a cada organismo (Britton y col., 1998).

Tabla 12. Astaxantina total en heces de jervo determinada por HPLC después de una dosis oral de 5 mg/kg.

Tiempo Postprandial (h)	Ax Total (µg/g)
0	0.000 ±0.000 ^d
3	46.768 ±23.743 ^{bc}
6	80.407 ±34.752 ^a
12	49.205 ±27.869 ^b
24	21.221 ±12.527 ^{cd}
48	18.203 ±9.070 ^d

Medias ± DE (n=6). Literales distintas denotan diferencia significativa (P<0.05) entre los tiempos postprandiales.

5.4 FARMACOCINÉTICA DE LA ASTAXANTINA EN PLASMA

Con el método de determinación farmacocinética empleado en el presente estudio, el tiempo de máxima absorción (t_{max}) de la astaxantina fue de 12 h (Figura 42).

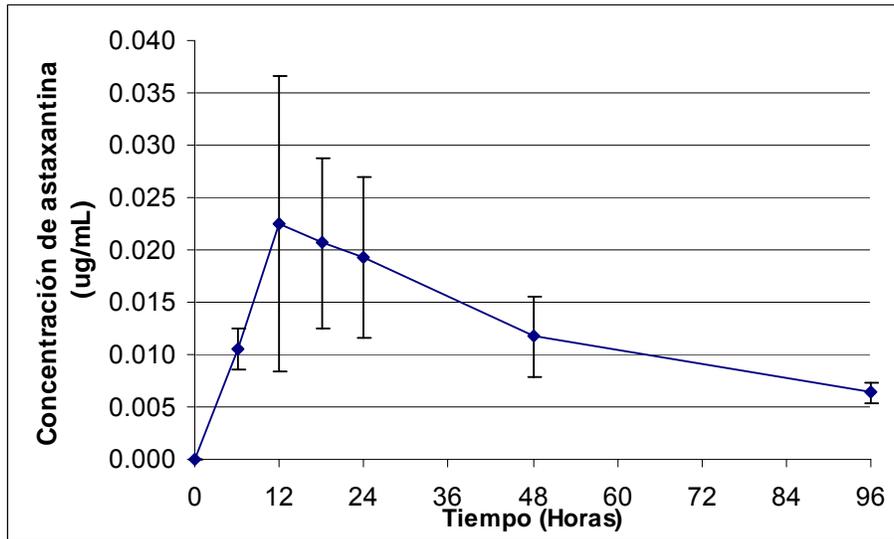


Figura 42. Cinética de la astaxantina en plasma de jervo después de una dosis oral de 1 mg/kg de astaxantina de acocil.

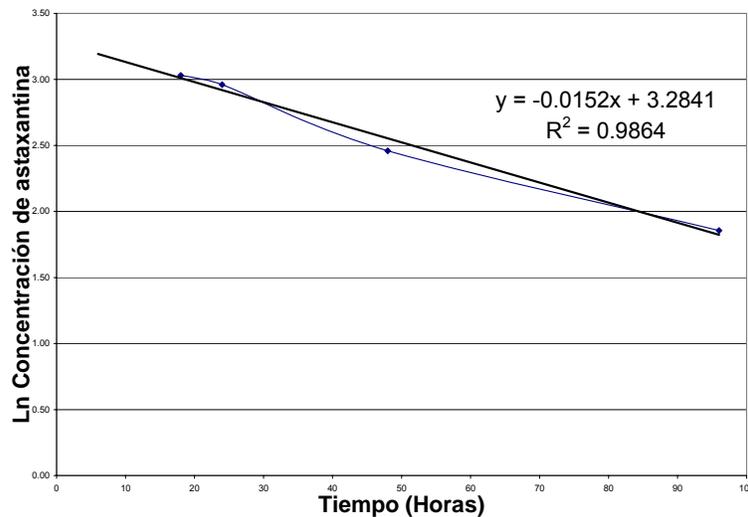


Figura 43. Determinación de la constante de eliminación (K_e) mediante la correlación entre el Ln de la concentración de astaxantina en plasma (sólo puntos correspondientes a la eliminación) y el tiempo transcurrido después de la dosis oral de 1 mg/kg de astaxantina de acocil.

La constante de eliminación (K_e) de la astaxantina en plasma fue de 0.0152 h^{-1} (Figura 43) mientras que el tiempo de vida media ($t_{1/2} = 45.6 \text{ h}$).

5.4.2 Tiempo de máxima eliminación por heces

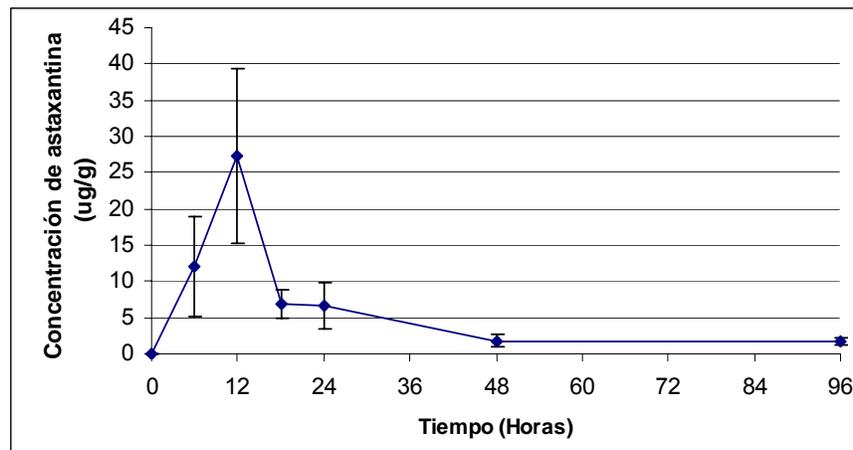


Figura 44. Concentración de la astaxantina en heces de jerbo después de una dosis oral de 1 mg/kg de astaxantina de acocil.

El tiempo de máxima eliminación de astaxantina vía heces fue de 12 h (Figura 44).

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El presente estudio está enfocado a la transformación metabólica del carotenoide astaxantina, proveniente de una fuente natural comestible como es el acocil *Procambarus bouvieri*. Este hecho es de significativa importancia debido a que la mayor parte del conocimiento recopilado hasta el presente proviene de investigaciones en las que se ha utilizado principalmente al carotenoide sintético, y por lo tanto, únicamente en forma libre.

La biodisponibilidad de los carotenoides es afectada por diferentes factores, entre ellos, la cantidad ingerida de los mismos, la composición química de los compuestos, competencia con otros carotenoides, los componentes de la dieta, estado nutricional del receptor y otros factores endógenos (Olson, 1999).

El tratamiento físico aplicado a los cefalotórax aislados de los acociles en el presente estudio, como el secado y molido, tuvo el propósito de facilitar el proceso de recuperación de la astaxantina y su digestibilidad en el jerbo. La cantidad obtenida de astaxantina (342 mg/kg) con el método aquí empleado fue superior al contenido de astaxantina en la harina del acocil *Procambarus clarkii*, también extraída con disolventes orgánicos (Meyers y Bligh, 1981). La mayor recuperación de pigmento en el presente caso probablemente fue favorecida por la selección previa del material utilizado el cual estuvo compuesto puramente por los caparzones sin los órganos internos que normalmente poseen otros carotenoides provenientes de la dieta. En consecuencia, la composición de carotenoides en el extracto oleoso utilizado, en las dosis fue predominantemente astaxantina en sus formas libre y esterificada.

En la opinión de algunos investigadores como Torrissen y col. (1989), Borel y col. (1996), la astaxantina esterificada puede ser hidrolizada previamente a su absorción, proceso que es favorecido por los ácidos grasos acompañantes del compuesto los cuales estimulan la actividad enzimática. Breithaupt y col. (2002), demostraron que la enzima colesterol esterasa es la responsable de la hidrólisis de los carotenoides esterificados, contrariamente al conocimiento generalizado que se tenía sobre el papel de las lipasas pancreáticas para tal efecto. En el presente estudio, la astaxantina del acocil fue absorbida en intestino presentando modificación cualitativa y cuantitativa de su composición con respecto al pigmento de las dosis. La hidrólisis previa a su absorción fue posiblemente la causa de una mayor proporción de astaxantina libre sobre todo cuando la dosis fue mayor (5 mg/kg). Dicho resultado sugiere que cuando la concentración del carotenoide en la dosis fue mayor, se presentó mayor actividad enzimática, y por lo tanto, una acción hidrolítica más acentuada sobre los ésteres, principalmente monoésteres, los cuales tuvieron una reducción de 10 veces con respecto a los monoésteres de la astaxantina ingerida. Esta hipótesis es reforzada si se toma en consideración que el tiempo para alcanzar la máxima absorción en esta etapa (II) fue de 6h mientras que en la etapa I (1 mg/kg) fue de 12 h. En consecuencia, la cantidad de astaxantina libre en intestino disponible para otros usos posibles, metabólicos y/o fisiológicos, fue mayor con la dosis de mayor concentración. Desde el punto de vista del papel funcional de la astaxantina este resultado puede ser muy importante ya que la composición en forma libre de las xantofilas se encuentra asociada con mayor eficiencia antioxidante (Pérez-Gálvez y col., 2005).

La astaxantina en intestino fue absorbida preferentemente en su forma isomérica *trans* especialmente con la dosis de 1 mg/kg. Con la dosis de 5 mg/kg fue evidente una absorción moderada de los isómeros *cis*, sin dejar de ser predominante la de los isómeros *trans*. Dicha diferencia puede tener su origen en la activación de isomerasas específicas cuando la concentración del carotenoide en la dosis es mayor. Otra posibilidad pudo haber sido que la baja dosis administrada no permitió la detección en el tejido de los isómeros *cis* con los métodos utilizados, de tal modo que éstos representaron sólo el 15% del total de isómeros de la astaxantina.

En plasma y en las lipoproteínas (Tablas 6 y 10) (Fig. 25) la astaxantina fue observada únicamente en forma libre y en su forma isomérica *trans*, lo cual conduce a pensar que hubo una captación selectiva de la astaxantina no esterificada. Un resultado semejante fue obtenido por Coral y col. (2004) en humanos después de la administración oral de astaxantina sintética esterificada, aunque discrepa en lo concerniente a los isómeros geométricos detectados, ya que en dicho estudio se observó una acumulación selectiva considerable de isómeros 9 y 13 *cis*, tanto en plasma como en lipoproteínas. Los autores atribuyeron dicho resultado a una posible isomerización durante los procesos digestivos. En general los isómeros *trans* o formas geométricas extendidas de los carotenoides son considerados de más fácil absorción con respecto a las formas isoméricas *cis* (Olson, 1999). La isomerización *trans/cis* de los carotenoides conlleva considerables arreglos espaciales de la molécula, los cuales influyen en la tasa de absorción, tasa de difusión, solubilidad, etc., de cada uno de los isómeros (Osterlie y col., 1999). Por esta razón es importante subrayar que en estudios referentes a la utilidad metabólica de los carotenoides se debe evitar posible isomerización *in vitro* durante el procesamiento de las muestras.

La máxima concentración de astaxantina en plasma fue observada a las 12 h y en niveles proporcionales al tamaño de la dosis en ambas etapas de estudio. Lo anterior pone de manifiesto que existe una relación directa entre la concentración de astaxantina en la dosis y el nivel de absorción como se señaló anteriormente. En la opinión de Doering y col. (2002), la absorción de los carotenoides por las células intestinales es de tendencia curvilínea, saturable, y dependiente del tiempo y de la concentración en la dosis. Por otro lado Olson (1999), afirma que la eficiencia de absorción de carotenos y xantofilas declina rápidamente después de alcanzar un valor máximo de concentración. En un estudio orientado a determinar la mejor dosis de astaxantina en la pigmentación de la trucha arcoiris, Storebakken (1991) demostró que a menor concentración del compuesto en la dieta y mayor tiempo de administración existe mejor absorción y por lo tanto mejor pigmentación del músculo. Tomando en cuenta estos conceptos es evidente que las concentraciones de astaxantina en las dosis empleadas en este estudio se mantuvieron por debajo del nivel de saturación.

La cantidad de astaxantina determinada en las lipoproteínas del jerbo permitió observar que este carotenoide es transportado en el jerbo principalmente por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), seguidas por las de baja densidad (LDL). Este resultado es concordante con el encontrado en humanos (Osterlie y col., 2000 y Coral y col., 2004) y en peces salmónidos en donde las lipoproteínas VLDL y quilomicrones son las partículas que movilizan la astaxantina. El transporte de estos compuestos varía entre especies y entre tipos de carotenoides. Por ejemplo, en aves la astaxantina es transportada por las lipoproteínas HDL (Schiedt, 1990), en humanos el β -caroteno y licopeno se distribuyen principalmente por las LDL, mientras que la luteína y zeaxantina, son transportadas preferentemente por las HDL (Parker, 1996).

El hígado es un órgano considerado con alto contenido de carotenoides. La presencia notable de lipoproteínas acarreadoras de compuestos liposolubles y receptores de lipoproteínas, condicionan su particular contenido elevado de estos compuestos, en especial aquellos en forma esterificada. No obstante, en el presente estudio no fue detectada la astaxantina en ninguna de sus formas. El único carotenoide visible con el método de análisis empleado fue el β -caroteno, carotenoide que estuvo presente en la dieta estándar de los animales. La ausencia de astaxantina podría ser explicada de dos formas: 1) por una transformación metabólica del compuesto en otros metabolitos, por ejemplo el 3-hidroxi-4-oxo- β -ionona o el 3-hidroxi-4-oxo-7,8-dihidro- β -ionona, como fue observada en hepatocitos humanos en condiciones *in vitro* (Klister y col., 2001); y 2) por eliminación mediante la bilis.

En el presente estudio, el contenido de astaxantina en heces fue alrededor de 98% con respecto al total encontrado en las muestras estudiadas. Es evidente que la mayor cantidad de astaxantina en la dosis fue eliminada por esta vía en forma más intensa a las 6 y 12 h en la etapa II y etapa I, respectivamente. Dicho proceso fue favorecido con la concentración de 5 mg/kg con la cual la astaxantina excretada por esta vía se caracterizó por presentar mayor proporción de forma libre (3.5 veces) con respecto a la de la dosis y dos veces mayor en el contenido de isómeros *cis*, por lo tanto es indudable que a mayor dosis el compuesto fue más desaprovechado. En la opinión de Olson (2006), un alto porcentaje de carotenoides por razones multifactoriales no son absorbidos en el tracto intestinal y consecuentemente son excretados por las heces Dicho evento es común en los carotenoides como parte de su procesamiento metabólico (Liaaen-Jensen y col., 2000).

Posiblemente una absorción menos eficiente de los isómeros *cis* con respecto al isómero *trans* fue reflejada en el incremento de los primeros en las heces.

Los parámetros farmacocinéticos calculados en la etapa I aportaron una constante de eliminación (K_e) y tiempo de vida media con valores de 0.0152 h^{-1} y 45.6 h, respectivamente, así como los tiempos de máxima absorción y eliminación que fueron a las 12 h en ambos casos, lo que sugiere que el proceso de absorción va ocurriendo en el tiempo casi paralelamente con la eliminación de astaxantina.

El estudio farmacocinético de la astaxantina fue abordado previamente en dos trabajos. El primero de Østerlie y col. (2000) quienes al estudiar la cinética de astaxantina en plasma humano determinaron una K_e de 0.033 h^{-1} , un tiempo de vida media de 21 h y un tiempo de máxima absorción de 6.7 h.

Coral y col. (2004), realizaron otro estudio farmacocinético de astaxantina en plasma humano, en el cual se utilizó astaxantina sintética diesterificada. En dicho trabajo los investigadores calcularon una K_e de 0.032 h^{-1} , un tiempo de vida media de 21.2 h y tiempo de máxima absorción a las 11.5 h.

Los resultados del presente estudio son semejantes a los reportados por Coral y col. (2004), en cuanto al tiempo de máxima absorción, pero diferente al encontrado por Østerlie y col. (2000). Dicha variación puede ser atribuida a que la fuente de astaxantina en los dos primeros estudios fue esterificada, mientras que en el trabajo de Østerlie y col. (2000), la astaxantina fue en forma libre, observación que guarda relación con la necesidad de un proceso hidrolítico de las xantofilas esterificadas previo a su absorción (Pérez-Gálvez, 2005).

Los parámetros farmacocinéticos de los carotenoides son muy variados, pues dependen de la naturaleza del compuesto y del organismo del que se trate. Para algunos carotenoides en plasma humano se han reportado tiempos de máxima absorción muy distintos; por ejemplo para el 5,6-epoxi- β,β -caroteno (Barua, 1999) y la β -criptoxantina (Wingerat y col.,1998) 6 h; para cantaxantina de 7 h (White y col., 1994) hasta 12 h (Paetau y col.,1997), para luteína valores desde 9 h (Gärther y col.,1996) hasta 16 h (Kostic y col., 1995) y para capsantina (Oschima y col.,1997) de 8 h. Dicha variabilidad probablemente es debida a factores como condiciones de dosificación, tamaño de muestra y tipo de carotenoide.

VII. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se obtienen las siguientes conclusiones:

1.- La astaxantina del acocil *Procambarus bouvieri* es absorbida en intestino del jerbo modificando sus características cualitativas y cuantitativas de las tres formas de astaxantina (AxM, AxD y Ax libre), principalmente cuando la dosis fue mayor (5 mg/kg), lo que hace suponer que la mayor concentración en la dosis induce una actividad hidrolítica mayor previamente a la absorción.

2.- En plasma y lipoproteínas existe captación selectiva de astaxantina libre en forma geométrica *trans*, presentando la mayor concentración a las 12 h después de la administración oral indistinta a la concentración de la astaxantina.

3.- Las lipoproteínas responsables del transporte de astaxantina en el jerbo son principalmente las lipoproteínas VLDL seguidas por las LDL como ocurre en humanos.

4.- La astaxantina no es depositada en hígado o si fuera el caso, es transformada rápidamente o eliminada por la vía biliar antes de ser detectada por el método de la presente investigación.

5.- La excreción de astaxantina en heces predominantemente en forma libre e isómeros *cis* sugiere una fuerte actividad hidrolítica pre-absorción y una utilización preferencial del isómero *trans*.

6.- La astaxantina es rápidamente absorbida en el jerbo con un tiempo de máxima absorción a las 12 h, tiempo después del cual es eliminada con una $K_e=0.0152 \text{ h}^{-1}$ hasta las 96 h.

7.- Aunque las concentraciones de astaxantina observadas en plasma e intestino fueron muy pequeñas, los resultados aquí observados permiten concluir que la astaxantina en un extracto oleoso proveniente del desecho de crustáceos comestibles como el acocil puede ser utilizada, a pesar de su composición altamente esterificada, como micronutriente debido sus propiedades benéficas para la salud.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Barua A. 1999. Intestinal absorption of epoxy- β -carotenes by humans. *Biochemical Journal*. 339:359-362.
- Borel P, Grolier P, Armand M, Partier A, Lafont H, Lairon D, Azais-Braesco V. 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surfaces-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research*. 37:250-261.
- Breithaupt DE, Bamedi A, Wirt U. 2002. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes?. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B132:721-728.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. 1998. Carotenoids. Birkhäuser Verlag. Basilea Suiza, Vol. 3. Cap. 6.
- Cañipa AJ. 1994. Estudio químico sobre aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Tesis de Maestría. UNAM Facultad de Química. México D.F.
- Carrillo S. 1993. Aprovechamiento de la langostilla *Pleuroncodes planipes* como fuente de proteína y pigmento en pollos de engorda y gallinas en producción. Tesis de Maestría. UNAM. México D.F.
- Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS. 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary β -carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Research*. 19:1849-1854.
- Coral G, Bjerkeng B. 2002. Astaxanthin from the red crab langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B133:437-444.

- Coral G, Ytrestøyl T, Ruyter B, Bjerkeng B. 2004. Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3' R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comparative Biochemistry and Physiology*. C139:99-110.
- Deming DM, Erdman JW. 1999. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*. 71:(12)2213-2223.
- Doering WE, Sotiriou-Leventis C, Roth WR. 1995. Thermal interconversions among 15-*cis* 13*cis* and *all-trans*- β -carotene: Kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry and potential relevance to anticarcinogenicity of *all-trans*- β -carotene. *Journal of American Chemistry Society*. 117:2747-2757.
- Elmadfa I, Majchrzak D. 1999. Absorption und transport von astaxanthin und canthaxanthin beim menschen nach einer Lachsmahl-zeit. *Ernähr.-Umsch*. 46:173-177.
- Fang T, Cheng YS. 1993. Improvent of astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75(6):466-469.
- Fox D. 1973. Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B44: 953-962.
- Gärther C, Stahl W, Sies H. 1996. Preferential increase in chylomicron levels of xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to β -carotene in the human. *International Journal of Nutrition Research*. 66:119-125.
- Goodwin TW. 1986. Metabolism, nutrition and function of carotenoids. *Annual Review Nutrition*. 6:273-297.

- Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxydative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1512:251-258.
- Graham JM, Higgins JA, Gillott T, Taylor T, Wilkinson J, Ford T, Billington D. 1996. A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis*. 124:125-135.
- Guerin M, Huntley M, Olaizola M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21(5):210-216.
- Guillou A, Khalil M, Adambounou L. 1995. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*. 130:351-360.
- House W, Apgar J, Smith C. 1997. The gerbil: a model for studying the metabolism of beta-carotene and minerals. *Nutrition Research*. 17:1293-1302.
- Hu Z, Zheng Y, Wang Z, Shen Y. 2005. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophylomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology* Elsevier Inc. 2005.
- Hussein G, Nakamura M, Zhao Q, Iguchi T, Goto H, Sankawa U, Watanabe H. 2005. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28(1):47-52.
- Jia-Ping L, Yue J, Xi-Wen H, Jun-Chao H, Feng C. 2004. Separation and determination of astaxanthin from microalgal and yeast samples by molecularly imprinted microspheres. *Journal of Chromatography B*. Elsevier Inc. 2004.

- Johnson EA, Gil-Hwan A. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11:297-326.
- Jyonouchi H, Sun S, Lijima K, Gross MD. 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*. 36(1):59-65.
- Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross MD. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *Journal of Nutrition*. 125:2483-2492.
- Kamata T, Kenneth L. 1987. Study of astaxanthin diester extracted from *Adonis aestivalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B86(3):587-591.
- Karrer P, Jucker E, Braude E. 1950 *Carotenoids* Elsevier Publish Company INC, New York Cap 7.
- Kistler A, Liechti H, Pichard L, Wolz E, Oesterhelt G, Hayes A, Maurel E, 2002. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Archives of Toxicology*. 75:665-675.
- Kostic D, White W, Olson J. 1995. Intestinal absorption, serum clearance and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separated or combined oral doses. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62:604-610.
- Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological, Chemistry, Physics and Medical NMR*. 22:27-38.
- Kurihara H, Koda H, Asami S, Kiso Y, Tanaka T. 2002. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sciences*. 70:1-12.

- Latscha T. 1990. Carotenoids in animal nutrition. Publications F Hoffmann-La Roche Ltd Basel, Switerland Document 2175.
- Lee C, Boileau A, Boileau T, Williams A, Swanson K, Heintz K, Erdman J. 1999. Review of animal models in carotenoid research. American Society for Nutritional Sciences. 129:2271-2277.
- Lehninger A. Bioquímica. 1991. Segunda edición. Ed. Omega Barcelona. Cap. 11
- Liaaen-Jesen S. 1990. Marine carotenoids (Selected topics). New Journal of Chemistry. 14:747-759.
- Liaaen-Jesen S, Bjerkeng B, Østerlie M. 2000. *Cis-trans* isomerism of carotenoids in relation to nutrition and heath. OFIC2000 Conference 4th September. Kuala L.
- Maher T. 2000. Astaxanthin Continuing Education Module. Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences.
- Matsushita Y, Susuki R, Nara E, Yokohama A. 2000. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- β -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. Fisheries Science. 66:980-985.
- Meyes S, Bligh D. 1981. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 29:505-508.
- Miki W. 1990. Biological functions and activites of animal carotenoids. Pure and Applied Chemistry. 63:141-146.
- Negro JJ, Garrido-Fernandez J. 2000 Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). Comparative Biochemistry and Physiology. B126:347-352.

- Olaizola M, Huntley ME. 2003. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. In Biomaterials and Bioprocessing (Fingerman M and Nagabhusha R eds) Science Publishers.
- Oshima S, Sakamoto H, Ishiguro Y, Terao J. 1997. Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. *Journal of Nutrition*. 127:1475-1479.
- Oslo JA, 1999. Carotenoids: In modern nutrition in health and disease. Williams and Wilkins, Baltimore. 525-541.
- Oslo JA. 2006. Bioavailability of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 49(1-S)(21-S 25-S).
- Østewrlie M, Bjerkeng B, Liaaen-Jessen S. 2000. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin *Journal Nutrition and Biochemistry*. 11:482-490.
- Paetau I, Chen H, Goh N, White W. 1997. Interactions in the postprandial appearance of β -carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol rich lipoproteins in humans *American Journal of Clinical Nutrition*. 66:1133-1143.
- Page GI, Davies SJ. 2005. Tissue astaxanthin and canthaxanthin distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*.
- Palozza P, Krinsky NI. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants against lipoprotein membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297:291-295.

- Parker R. 1996. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. Serial Reviews. FASEB Journal. 10:542-551.
- Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI. 2005. Esterification of xanthophylls and its effect on chemical and behavior and bioavailability of carotenoids in the human. Nutrition Research. 25:631-640.
- Renstrøm B, Borch G, Skuberg O, Liaaen-Jesen S. 1981. Optical purity of (3S,3'S)-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Helv Chim Acta 63 Part 3:2561-2564.
- Renstrøm B, Liaaen-Jesen S. 1981. Fatty acid composition of some esterified carotenoids. Comparative Biochemistry and Physiology. B69:625-627.
- Romanchik J, Morel D, Harrison H. 1995. Distributions of carotenoids and α -tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. Journal of Nutrition. 125:2610-2617.
- Schiedt K. 1990. New aspects of carotenoid metabolism in animals. Carotenoids:Chemistry and Biology. Ed by Krinsky *et al.* New York.
- Schmitz HH., Poor CL., Wellman RB, Erdman JW. 1990. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. Journal of Nutrition. 121:1613-1621.
- Schmitz HH, Poor CL, Gugger ET, Erdman JW. 1993. Analysis of carotenoids in human and animal tissues. Methods in Enzymology. 24:102-116.
- Stradi R, Pini E, Deletano G. 2001. Carotenoids in bird plumage: the complement of red pigments in the plumage of wild and captive bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). Comparative Biochemistry and Physiology. B 128:529-535.

- Storebakken T, No HK. 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. 100:209-229.
- Susuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. 2005. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Experimental Eye Research*.
- Yamaguchi K, Miki W, Toriu N, Kondo Y, Murakami M, Konosu S. 1983. The composition of carotenoids in the Antarctic krill *Euphasia superba*. *Japanese Society Science of Fish*. 49:1411-1415.
- Yokoyama A, Izumida H, Miki W. 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosciences in Biotechnology and Biochemistry*. 58:1842-1844.
- Yokoyama A, Shizuri Y, Miki W. 1996. Abstr. 11th International Symposium of Carotenoids, Leiden, 113.
- Takaichi S, Matsui K, Nakamura M, Muramatsu M, Hanada S. 2003. Fatty acids of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B136:317-322.
- Torrissen OJ, Hardy RW, Shearer KD. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *CRC Critical Review Aquatics Sciences*. 1:209-225.
- Vecchi M, Glinz E, Meduna V, Schiedt K. 1987. HPLC separation and determination of astacene, semiastacene, astaxanthin and other keto-carotenoids. *Journal of High Resolution Chromatography*. 10:348-351.
- Voet D, Voet J. 1995. *Biochemistry*. Ed. John Wiley & Sons. USA. Cap. 11.

- Wang X, Willen R, Wadstrom T. 2000. Axthaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:2452-2457.
- White W, Stacewicz M, Erdman J, Bowen P. 1994. Pharmacokinetics of β -carotene and cantaxanthin after ingestion of individual and combined doses by human subjects. *Journal American College of Nutrition*. 13:665-671.
- Wingerat T, Stahl W, Sies H. 1998. β -cryptoxanthin selectively increases in human chylomirons upon ingestion of tangerine concentrate rich in β -cryptoxanthin esters. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 324:385-390.