



Universidad Nacional de la Patagonia

San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

**Licenciatura en Química**

*Trabajo Final*

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO  
DE LANGOSTINO ARGENTINO**

**Macias, Tatiana Elizabeth**

Directora de trabajo final: Cretton, Martina.

Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Año: 2023.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS .....                                      | 4  |
| RESUMEN .....  | 5  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                      | 6  |
| 1.1. Composición centesimal .....                          | 6  |
| 1.1.1. Cenizas .....                                       | 6  |
| 1.1.2. Lípidos .....                                       | 7  |
| 1.1.3. Proteínas y nitrógeno no proteico .....             | 8  |
| 1.1.4. Carbohidratos .....                                 | 9  |
| 1.2. Antioxidantes .....                                   | 10 |
| 1.2.1. Carotenoides .....                                  | 10 |
| 1.2.1.1. Astaxantina .....                                 | 11 |
| 1.2.1.2. $\beta$ -Caroteno .....                           | 11 |
| 1.2.2. Tocoferoles .....                                   | 12 |
| 1.2.2.1. $\alpha$ -tocoferol .....                         | 12 |
| 1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ..... | 13 |
| 1.3.1. La fase estacionaria .....                          | 14 |
| 1.3.2. La fase móvil: criterios de selección .....         | 15 |
| 1.3.3. Detectores espectrofotométricos .....               | 16 |
| 1.3.4. Cromatograma y parámetros cromatográficos .....     | 17 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 19 |
| 2.1. Objetivo General .....                                | 19 |
| 2.2. Objetivos Específicos .....                           | 19 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....                              | 20 |
| 3.1. Reactivos .....                                       | 20 |
| 3.2. Metodología .....                                     | 21 |
| 3.2.1. Composición centesimal .....                        | 21 |

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO DE LANGOSTINO ARGENTINO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.2.1.1. | Humedad.....   | 21 |
| 3.2.1.2. | Cenizas.....   | 21 |
| 3.2.1.3. | Lípidos.....   | 21 |
| 3.2.1.4. | Nitrógeno Total.....   | 22 |
| 3.2.1.5. | Nitrógeno Proteico y Proteínas.....  | 23 |
| 3.2.1.6. | Nitrógeno No Proteico.....   | 24 |
| 3.2.1.7. | Carbohidratos.....   | 24 |
| 3.2.2.   | Cromatografía líquida de alta resolución.....                                | 25 |
| 3.2.2.1. | Sistema cromatográfico para el análisis de astaxantina.....                  | 25 |
| 3.2.2.2. | Sistema cromatográfico para el análisis de $\beta$ -caroteno.....            | 25 |
| 3.2.2.3. | Construcción de la curva de calibración.....                                 | 25 |
| 3.2.2.4. | Análisis del Extracto.....   | 26 |
| 3.2.3.   | Estadística.....   | 26 |
| 4.       | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 27 |
| 4.1.     | Composición centesimal.....  | 27 |
| 4.2.     | Identificación de analitos por cromatografía líquida de alta resolución..... | 30 |
| 4.3.     | Curvas de calibración.....   | 32 |
| 4.4.     | Análisis del extracto: Identificación y Cuantificación de analitos.....      | 35 |
| 5.       | CONCLUSIÓN.....  | 38 |
| 6.       | BIBLIOGRAFÍA.....  | 39 |

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de trabajo final, la Dra. Martina Cretton, por la paciencia, enseñanza y confianza que tuvo siempre hacia mí, por tenerme en cuenta en cada opinión y por estar acompañándome en todo momento, los buenos y los malos.

A la Dra. Marcia Mazzuca y todo el equipo de investigación, que me trataron excelente desde el primer día, haciéndome sentir parte de todos/as ellos/as.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, por brindarme la posibilidad de seguir mis estudios de grado durante estos años, a la Dra. Ofelia Katusich por darme el espacio del laboratorio de química y hacer uso del espectrofotómetro UV-vis.

A mi familia, cable a tierra indispensable. Mención especial a mis padres por todo el esfuerzo que han tenido que hacer durante estos años para que pueda lograr el objetivo mayor, por cada abrazo, risa, aliento, cuando lo necesitaba. A mis hermanas y sobrinas/os, por la paciencia y entendimiento del motivo de mi ausencia, esperando que sea para ellos/as un ejemplo de que puedan seguir y conseguir el camino que quieran.

A mis amigas/os, que son mi familia, durante muchos años y me escucharon, en mis distintos tipos de ánimos.

A mis abuelas, Antonia, Coca y Ana quienes se fueron durante este transcurso, pero siempre están conmigo.

## RESUMEN

El langostino (*Pleoticus muelleri*) es una de las especies de pesca marina más capturadas en Argentina. Una parte de esa captura es procesada en industrias pesqueras, lo que produce grandes cantidades de descartes en cáscaras y cabezas de langostino. A partir de estos descartes es posible obtener un extracto lipídico rico en astaxantina, un pigmento carotenoides rojo con elevada capacidad antioxidante. El extracto fue utilizado como ingrediente de un alimento balanceado con resultados favorables en el crecimiento en peso y tamaño de róbalo cultivados en la provincia de Chubut (Cerdeira y col., 2020). En este trabajo se buscó determinar la riqueza en macronutrientes y antioxidantes liposolubles en el extracto del langostino *P. muelleri*.

Se llevaron a cabo análisis cuantitativos para determinar la composición centesimal y técnicas cromatográficas para identificar y cuantificar antioxidantes. En la composición centesimal, se utilizaron técnicas gravimétricas para determinar cenizas y lípidos, técnicas espectrofotométricas para la determinación de carbohidratos y el método Kjeldahl para determinar el nitrógeno orgánico en la muestra (proteico y no proteico). Para la identificación y cuantificación de los antioxidantes astaxantina y  $\beta$ -caroteno se trabajó con un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). Se pusieron a punto sistemas cromatográficos para esto se utilizaron patrones comerciales, se realizaron ajustes en las condiciones, teniendo en cuenta las características químicas de los carotenoides de interés. Luego se analizó el extracto lipídico de descartes de langostino.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que, principalmente, el extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino es rico en lípidos (aproximadamente 67,8 %), fracción en donde está presente la astaxantina como así también ácidos grasos. Además, aporta cantidades menores de otros macronutrientes, tales como proteínas y carbohidratos, como así también minerales. Fue posible identificar y cuantificar la presencia de astaxantina y ausencia de  $\beta$ -caroteno en este extracto, resultado que pudo ser comparado con los reportes existentes para otras especies de langostinos.

## 1. INTRODUCCIÓN

El langostino (*Pleoticus muelleri*) es una de las especies de pesca marina más capturadas en Argentina. En el año 2022, la captura total alcanzó las 208.458,1 toneladas, según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAG y P). Una parte de la captura es procesada en tierra, en empresas pesqueras. El procesamiento del langostino produce grandes volúmenes de descartes que consisten en cáscaras y cabezas. Se estima que en 2018 los mismos representaron cerca de 18000 toneladas. La caracterización de los descartes de langostino mostró que son ricos en quitina (9-19 %), proteínas (27-45 %), minerales (33-48 %) y lípidos (4-11%) (Cretton y col., 2021). A partir de los descartes es posible obtener un extracto lipídico de componentes de interés en acuicultura como el carotenoide astaxantina, un potente antioxidante y ácidos grasos de calidad nutricional (Cretton, 2019). Este extracto fue adicionado a alimentos balanceados comerciales que fueron utilizados para alimentar róbalo (*Eleginops maclovinus*) cultivados en la Provincia de Chubut (Cerdea y col., 2020), favoreciendo al crecimiento de peso y tamaño del animal.

Los ensayos analíticos previos permitieron conocer solo una fracción de este extracto. Por esta razón es necesario seguir indagando, darle una “identidad” al extracto de cáscaras y cabezas de langostino.

### 1.1. Composición centesimal

Una caracterización química consiste en efectuar un análisis cualitativo y cuantitativo de una muestra. Cuando esta caracterización se aplica a la industria alimenticia, conjuntamente con análisis microbiológico y propiedades físicas, por ejemplo, pueden garantizar la calidad y seguridad del suministro de alimentos (Nielsen, 2017).

La determinación de la composición centesimal consiste en análisis de cenizas y macronutrientes. Los macronutrientes son necesarios para el crecimiento, metabolismo y otras funciones. Las principales biomoléculas que forman parte de estos macronutrientes son los lípidos, proteínas y carbohidratos.

#### 1.1.1. Cenizas

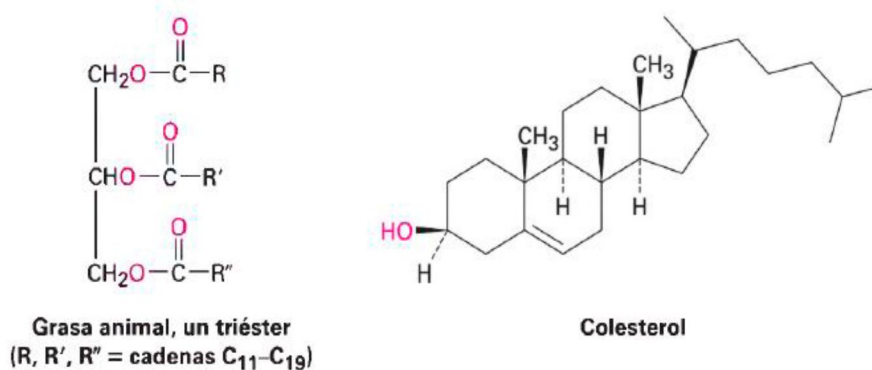
El contenido de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos. Es el residuo inorgánico que queda después de la combustión o la oxidación completa de la materia

orgánica en los alimentos. La determinación de ceniza puede llevarse a cabo por diferentes métodos, uno de ellos consiste en la incineración a 500 °C – 600 °C de la muestra donde el agua y los compuestos volátiles se vaporizan y las sustancias orgánicas se queman, quedando solamente las cenizas (Nielsen, 2017). Es importante desde el punto de vista nutricional, toxicológico y de calidad de los alimentos, determinar el contenido de cenizas (Harris y Marshall, 2017).

### 1.1.2. Lípidos

Entre las clases principales de biomoléculas que existen en la naturaleza, los lípidos se distinguen por estar definidos por una propiedad física: la solubilidad. Son sustancias que poseen una pronunciada hidrofobicidad (altamente solubles en solventes orgánicos) (Carey y Giuliano, 2014).

Los lípidos se clasifican según su estructura y se distinguen dos grandes clases (Figura 1): saponificables e insaponificables. Los lípidos saponificables son aquellos que, en presencia de bases fuertes, como hidróxido de sodio o potasio (NaOH o KOH), dan lugar a jabones. Este tipo de lípidos están formados por ésteres de ácidos grasos y son hidrolizables. Algunos ejemplos de ellos son acilglicéridos, ceras, fosfoglicéridos, esfingolípidos (constituyentes estructurales de las membranas biológicas), entre otros. Los lípidos insaponificables no contienen enlaces ésteres en su estructura, por lo que no son hidrolizables como por ejemplo terpenos (vitaminas, carotenoides), esteroides (colesterol), hormonas, entre otras (Feduchi y col., 2010).



**Figura 1. Estructuras químicas de lípidos.** *Izquierda: lípido saponificable; derecha: lípido insaponificable* (McMurry, 2012).

La insolubilidad en agua es la propiedad analítica utilizada como base para separar con facilidad estos compuestos de proteínas y carbohidratos (Nielsen, 2017), por lo que pueden aislarse de los organismos por extracción con disolventes orgánicos no polares (McMurry, 2012). Las técnicas propuestas por Folch (1957) o Bligh y Dyer (1959), se basan en determinaciones gravimétricas de los lípidos mediante la extracción con solventes orgánicos.

Las muestras de lípidos obtenidos de fuentes naturales, son mezclas complejas. Los procesos de identificación y cuantificación, de los distintos lípidos, involucran la utilización de técnicas de separación e identificación tales como la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Christie y Han, 2012).

Los aceites y grasas son ingredientes presentes en todos los alimentos. Las grasas contribuyen en gran medida a la palatabilidad, sabor y estructura de los alimentos, por lo que su producción es de gran importancia económica como productos agrícolas y poseen un gran valor industrial como precursores de materiales como jabones, detergentes y lubricantes (Christie y Han, 2012).

### **1.1.3. Proteínas y nitrógeno no proteico**

Las proteínas consisten en cadenas polipeptídicas muy largas, las cuales pueden poseer 100 o más aminoácidos en su estructura química (Blanco, 2006). Son un componente abundante en todas las células y casi todas, excepto las proteínas de almacenamiento, son importantes para las funciones biológicas y la estructura celular (Chang y Zhang, 2017).

Todas las proteínas contienen átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y casi todas poseen azufre. Si bien hay variaciones en diferentes proteínas, el contenido de nitrógeno representa un promedio de 16% de la masa total de la molécula, es decir que 6,25 g de proteínas contienen 1 g de nitrógeno. El factor 6,25 se utiliza para estimar la cantidad de proteína existente en una muestra a partir de la medición del nitrógeno de la misma (Blanco, 2006).

En los alimentos y en ingredientes alimenticios hay contenido de nitrógeno no proteico, el cual podría provenir de productos de hidrólisis de aminoácidos libres y/o péptidos pequeños. Compuestos de origen biológico tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos, aminoazúcares, y algunas vitaminas, alcaloides, ácido úrico, urea e iones amonio, también poseen nitrógeno no proteico en su estructura. Es por eso que en muchos casos se considera realizar un análisis de nitrógeno no proteico. Por lo tanto, el nitrógeno total en los alimentos, está compuesto por

nitrógeno principalmente de proteínas y en menor medida de todas las sustancias no proteicas que contienen nitrógeno orgánico (Blanco, 2006).

Uno de los métodos más comúnmente utilizado para las determinaciones de nitrógeno orgánico es el método Kjeldahl. Este método presenta una serie de pasos que incluyen una digestión, neutralización, destilación y titulación de la muestra (Chang y Zhang, 2017).

### 1.1.4. Carbohidratos

Los carbohidratos, también llamados hidratos de carbono o glúcidos, son importantes componentes de los seres vivos. Se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos animales y en complejas moléculas con diversas funciones (Blanco, 2006).

Químicamente se definen como polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, porque esta definición está más próxima a su realidad estructural, y sugiere más su reactividad química (Carey y Giuliano, 2014).

Existen tres clases principales de glúcidos, que se clasifican según su tamaño:

Monosacáridos o azúcares simples que consisten en una sola unidad de polihidroxialdehído o polihidroxicetona.

Oligosacáridos que consisten en cadenas cortas formadas por 2 a 20 unidades de monosacáridos, o residuos, unidos por enlaces glucosídicos.

Polisacáridos que son polímeros naturales (biopolímeros) de los carbohidratos se pueden hidrolizar obteniendo como resultado muchas unidades de monosacáridos. Contienen entre 30 a 60000 o más unidades de monosacáridos.

El análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos es importante y se utiliza para determinar las composiciones de los alimentos, bebidas y sus ingredientes. El método de Dubois (1956) es una de las técnicas cuantitativas más utilizadas para determinar azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados (BeMiller, 2017).

## 1.2. Antioxidantes

En los alimentos e ingredientes, además de encontrarse compuestos químicos que presentan función nutricional, como los que se ha detallado hasta ahora, también se encuentran otros sin función nutricional. Sin embargo, estos últimos son de gran importancia para productos alimenticios. Dentro de estos compuestos se encuentran los antioxidantes.

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de radicales libres (especie química que contiene un átomo con un electrón desapareado) u otras moléculas no radicales (especies reactivas del oxígeno, las cuales incluyen una serie de derivados de oxígeno molecular), liberando electrones al medio o ejerciendo algún mecanismo que retrasa o previene los procesos oxidativos que dañan las células. En grandes rasgos, estas especies de acción oxidante provocan daños a moléculas, lípidos y proteínas (membrana celular), ácidos nucleicos y tejidos (Vázquez-Ovando y col., 2022).

Generalmente los antioxidantes son moléculas que pueden ser de origen endógeno, donde la exposición a radicales libres se desarrolla dentro del organismo como sistema de defensa enzimático, o de origen exógeno, es decir que estas moléculas provienen de la ingesta de alimentos en una dieta (Vázquez-Ovando y col., 2022). Los antioxidantes de origen exógeno pueden clasificarse como hidrosolubles (como la vitamina C) o liposolubles, los cuales éstos últimos son aquellos que forman parte del objetivo de este trabajo final, por ejemplo, astaxantina,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol.

### 1.2.1. Carotenoides

Los carotenoides son hidrocarburos de polienos biosintetizados a partir de ocho unidades de isopreno, conocidos como tetraterpenos, los cuales contienen un esqueleto carbonado con 40 átomos de carbono. Aportan el intenso color amarillo, naranja o rojo de un gran número de alimentos de origen vegetal. El color de los carotenoides es el resultado de la presencia de un sistema de doble enlace conjugado en las moléculas (Carey y Giuliano, 2014; McMurry, 2012).

Estos carotenoides se dividen en dos clases principales: carotenos y xantofilas. A diferencia de los carotenos, que son hidrocarburos poliénicos puros, las xantofilas contienen oxígeno en forma de grupos hidroxilo, epoxi u oxo. Son sintetizados únicamente por las plantas, sin embargo, llegan a los tejidos animales a través de la alimentación y pueden modificarse y depositarse allí (Schieberle y col., 2008).

### 1.2.1.1. Astaxantina

La astaxantina (Figura 2), carotenoide perteneciente a las xantofilas, se encuentra comúnmente en los animales marinos y es responsable de la coloración rosada/roja de los crustáceos, mariscos y pescados como el salmón. Estos animales no pueden sintetizar carotenoides, pero pueden adquirirlos a partir de su dieta (Dewick, 2002).

Se produce mediante la modificación de los carotenoides de las plantas, por ejemplo.  $\beta$ -caroteno, obtenido en la dieta. Este carotenoide se encuentra presente en diferentes especies de langostinos tanto en su forma libre como así también esterificada con ácidos grasos (Gómez-Estaca y col., 2017; Sánchez-Camargo y col., 2011). Estructuralmente posee dos zonas, polar y no polar, y la interacción de ambas zonas con radicales y otros grupos oxidantes es lo que le otorga la gran capacidad antioxidante por la cual se caracteriza (Dewick, 2002) aproximadamente 500 veces superior, en comparación, por ejemplo, con el  $\alpha$ -tocoferol.

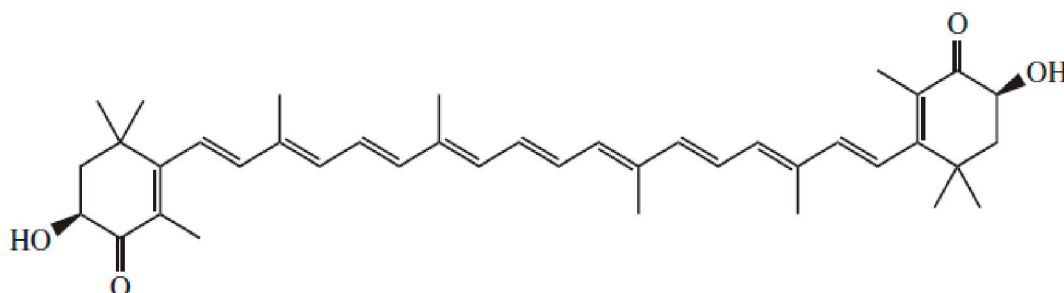


Figura 2. Estructura química de astaxantina libre. (Dewick, 2002)

### 1.2.1.2. $\beta$ -Caroteno

El  $\beta$ -caroteno (Figura 3) es un carotenoide que se encuentra mayoritariamente en las plantas y posee actividad de provitamina A, la cual tiene alta capacidad antioxidante que favorece la prevención del cáncer especialmente del pulmón, boca y estómago (Vázquez-Ovando y col., 2022).

Este pigmento natural sufre una ruptura oxidativa en el hígado, en su doble enlace carbono-carbono central, para formar retinol o vitamina A. Ésta última está presente en tejido de mamíferos y en aceites de pescado, y su importancia recae principalmente en la química de la visión (Carey y Giuliano, 2014).

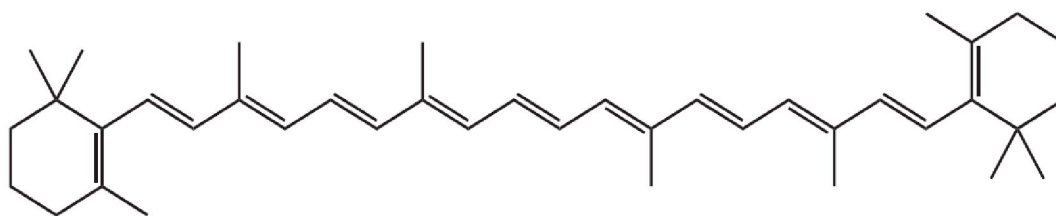


Figura 3. Estructura química de  $\beta$ -caroteno. (Dewick, 2002)

### 1.2.2. Tocoferoles

Los tocoferoles y tocotrienoles se conocen colectivamente con el nombre de Vitamina E. Son una serie de isómeros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -) con diversa capacidad antioxidante, los cuales difieren en el número y posición de los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) en la estructura del cromano (Maestro-Durán y Borja Padilla, 1993).

#### 1.2.2.1. $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol (Figura 4) tiene la actividad antioxidante más alta entre estos isómeros y se encuentra en cantidades apreciables en tejidos de origen animal. Es un antioxidante lipídico que puede captar el oxígeno y esta capacidad antioxidante se centra específicamente en la inhibición de la peroxidación lipídica causada por los radicales libres, que tiene lugar en fosfolípidos de la membrana celular, lipoproteínas, en todos los tejidos que tengan una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Vázquez-Ovando y col., 2022). Por lo tanto, no solo contribuye a la estabilización de las estructuras de la membrana, sino que también estabilizan otros agentes activos (por ejemplo., vitamina A, ubiquinona, hormonas y enzimas) contra la oxidación. (Schieberle y col., 2008). También es importante para las funciones musculares y reproductivas (López-Cervantes y col., 2006).

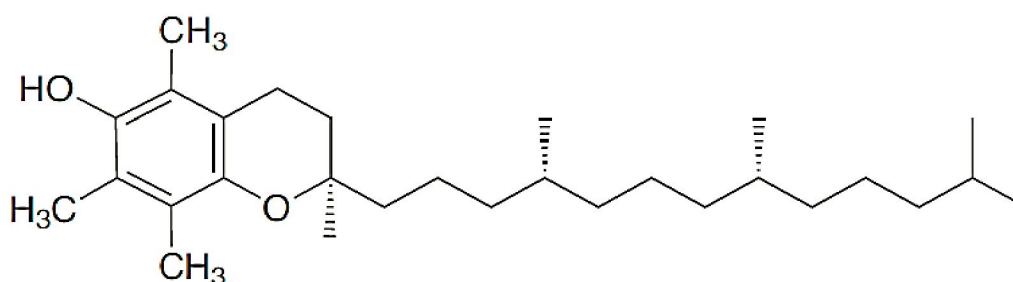


Figura 4. Estructura química de  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) (Carey & Giuliano, 2014).

Los antioxidantes liposolubles descritos con anterioridad, se determinan con metodologías que permitan identificarlos y cuantificarlos. Particularmente en este trabajo se utiliza HPLC UV-Vis para llevar a cabo este propósito.

### 1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía es una técnica que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Los diferentes métodos cromatográficos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria es aquella que está fija en su lugar, ya sea dentro de una columna o sobre una superficie plana, mientras que la fase móvil, es aquella que se mueve sobre la fase estacionaria o a través de ésta acarreado con ella la mezcla de analitos. Los componentes de una mezcla son llevados a través de la fase estacionaria por la fase móvil, y la separación es debida a las diferencias de las velocidades de migración entre los componentes de la fase móvil (Skoog y col., 2014). La cromatografía se puede dividir en varias categorías en función de los tipos de fases móviles y estacionarias y del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria (Harris, 2016; Skoog y col., 2009), las cuales se pueden observar en la Tabla 1.

**Tabla 1. Tipos de cromatografías en columna** (Skoog y col., 2014).

| Clasificación general  | Método específico              | Fase estacionaria   | Tipo de equilibrio químico                                       |
|--|--------------------------------|---|--|
| 1. Cromatografía de gases (CG)   | a. Gas-líquido (CGL)           | Líquido adsorbido o enlazado a una superficie sólida          | Partición entre un gas y un líquido                              |
| 2. Cromatografía líquida (CL)  | b. Gas-sólido                  | Sólido  | Adsorción  |
|  | a. Líquido-líquido o partición | Líquido adsorbido o enlazado a una superficie sólida          | Partición entre líquidos inmiscibles                             |
|  | b. Líquido-sólido o adsorción  | Sólido  | Adsorción  |
|  | c. Intercambio iónico          | Resina de intercambio iónico                                  | Intercambio iónico   |
|  | d. Exclusión molecular         | Líquido en los intersticios de un sólido polimérico           | Partición/tamizado   |
| 3. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico). | e. Afinidad                    | Líquido grupo específico enlazado a una superficie sólida     | Partición entre una superficie líquida y un líquido móvil        |
|  |                                | Especies químicas orgánicas enlazadas a una superficie sólida | Partición entre un fluido supercrítico y una superficie enlazada |

Es de interés en este trabajo final, la cromatografía líquida de alta resolución conocida también por sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Es un tipo de *cromatografía en columna*, es decir, donde un tubo estrecho contiene la fase estacionaria, con tamaños de partículas que oscilan entre 3  $\mu\text{m}$  – 5  $\mu\text{m}$ , a través de la cual la fase móvil se fuerza a pasar a alta presión, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, 2016; Skoog y col., 2014).

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, y esto se debe a tres parámetros fundamentales que lo caracterizan: resolución, reproducibilidad y rapidez. Otras características son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (Quattrocchi y col., 1992; Skoog y col., 2014).

### 1.3.1. La fase estacionaria

Se utilizan principalmente dos tipos de fases estacionarias (Figura 5) las cuales pueden clasificarse en fase normal (o NPLC, Normal Phase Liquid Chromatography) y fase reversa (o RPLC, Reversed Phase Liquid Chromatography) de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. La cromatografía en fase normal se caracteriza por utilizar una fase estacionaria polar (sólo sílica gel) donde el componente menos polar de la muestra eluye primero. Por lo tanto, al aumentar la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución, es decir el tiempo entre que el analito ingresa a la columna y el momento que eluye. La cromatografía en fase reversa se caracteriza por utilizar una fase estacionaria no polar (constituida por sílice ligada a *n*-alquilos con 4, 8, 18 o más átomos de carbono) donde el componente más polar de la muestra es el primero que eluye, y aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (Harris, 2016; Quattrocchi y col., 1992; D. Skoog y col., 2014).

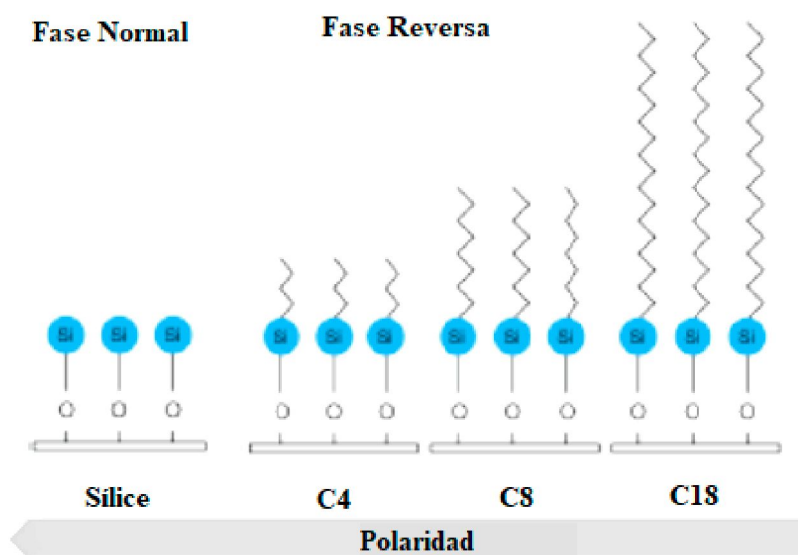


Figura 5. Tipos de fases estacionarias (BÜCHI Labortechnik, 2019).

La cromatografía de fase reversa es la primera opción para la mayoría de las muestras regulares. Es normalmente adecuada para separar mezclas de compuestos orgánicos neutros o cargados de baja masa molecular. Ese tipo de cromatografía suele ser más conveniente y resistente que otras formas de cromatografía líquida y es más probable que resulte en una separación final satisfactoria (Harris, 2016; Snyder y col., 2012).

### 1.3.2. La fase móvil: criterios de selección

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes de la fase móvil, la columna y la muestra, así como también de su afinidad mutua, del modo en que interactúan y de la temperatura. Cuando se desea mejorar la separación cromatográfica, un cambio en la composición de la fase móvil es generalmente lo más efectivo y conveniente. Es el primer paso para modificar la selectividad tanto para la fase normal como para la fase reversa.

Un solvente apropiado para este tipo de cromatografía, debe cumplir algunos requisitos como: alto poder solubilizante de las muestras, baja reactividad, compatibilidad con el detector utilizado, adecuado punto de ebullición, baja viscosidad, seguridad, alto grado de pureza (Quattrocchi y col., 1992; Snyder y col., 2012). Los solventes utilizados como fase móvil, fueron tabulados en lo que se denomina “triángulo de selectividad de solventes” (Figura 6) debido a la magnitud de sus interacciones y clasificados según su selectividad (Snyder, 1974; Snyder y col., 1997).

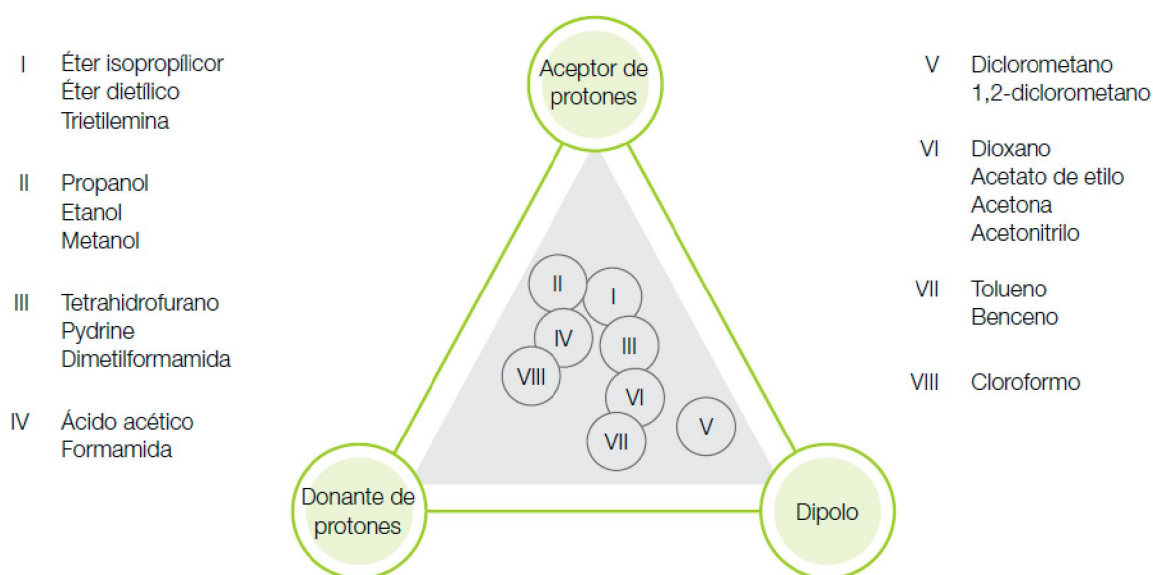


Figura 6. Triángulo de selectividad de solventes (BÜCHI Labortechnik, 2019).

Para poder garantizar una mayor selectividad o poder de separación, se recomienda seleccionar solventes de diferentes grupos que estén lo más alejados posibles guiándose de este triángulo de selectividad. De esta manera se puede ir modificando la fuerza eluyente de la fase móvil, dependiendo la muestra y analitos de interés.

La **fuerza eluyente o fuerza de solvente** es una medida de la energía de adsorción del disolvente. En fase normal, cuanto más polar es el disolvente, mayor es su fuerza eluyente respecto a la sílice. Cuanto mayor es la fuerza eluyente del disolvente, tanto más rápidamente se eluirán los solutos no polares de la columna. Sin embargo, cuando se trabaja con una fase reversa, es lo contrario. Cuanto menos polar sea el disolvente, mayor será su fuerza eluyente y por lo tanto se eluirán más rápidamente aquellos solutos polares (Harris, 2016).

### 1.3.3. Detectores espectrofotométricos

Cuando se ha realizado la separación cromatográfica es indispensable determinar el momento cuando se eluye el analito de la columna para lograr el fraccionamiento óptimo, y eso se logra con un detector e interfase que permite interpretar este resultado.

Un detector ideal, de cualquier tipo que sea, debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal y no ensanchar los picos del cromatograma. Además, no debe ser sensible a variaciones de temperatura y de la composición de disolvente, debe poseer una buena relación señal/ruido y no debe destruir la muestra (Harris, 2016; Quattrocchi y col., 1992). Pueden clasificarse en dos tipos de detectores: detectores generales, que miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura (ejemplo detector de índice de refracción); o en detectores selectivos, aquellos que son sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo, el detector UV que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada (Quattrocchi y col., 1992).

El detector UV es el más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal (es decir que cumple la ley de Lambert-Beer) y permite detectar analitos del orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean translúcidos en la longitud de onda de trabajo. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y temperatura, opera en el rango de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender al rango visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de

detector UV/Visible. Los detectores espectrofotométricos son mucho más versátiles y los instrumentos más modernos utilizan detectores basados en arreglos de diodos que permiten medir no sólo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real (Quattrocchi y col., 1992; Skoog y col., 2014).

La fase estacionaria, la fase móvil y los parámetros instrumentales (flujo, temperatura, detector) es lo que constituye un sistema cromatográfico (Quattrocchi y col., 1992).

### 1.3.4. Cromatograma y parámetros cromatográficos

El detector está conectado a una computadora, y cuando finaliza la separación cromatográfica por HPLC registra la señal para generar un **cromatograma**, que es una gráfica de alguna función de la concentración del analito respecto al tiempo o volumen de elución (Skoog y col., 2014).

En el cromatograma se pueden identificar los siguientes parámetros cromatográficos: **tiempo muerto** (tiempo vacío),  $t_M$ , es el tiempo que le toma a una especie química no retenida atravesar una columna cromatográfica. Todos los compuestos pasan esta cantidad de tiempo en la fase móvil; **tiempo de retención**,  $t_R$ , de un componente es el tiempo que transcurre desde la inyección de una mezcla en la columna hasta que ese componente llega al detector, es utilizado para identificar los componentes de la muestra. Y el **ancho de banda o pico**,  $W$ , donde al pasar por la columna cromatográfica, los solutos tienden a difundirse según una gaussiana. Las áreas debajo de los picos, proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie química de la muestra (Harris, 2016; Skoog y col., 2014).

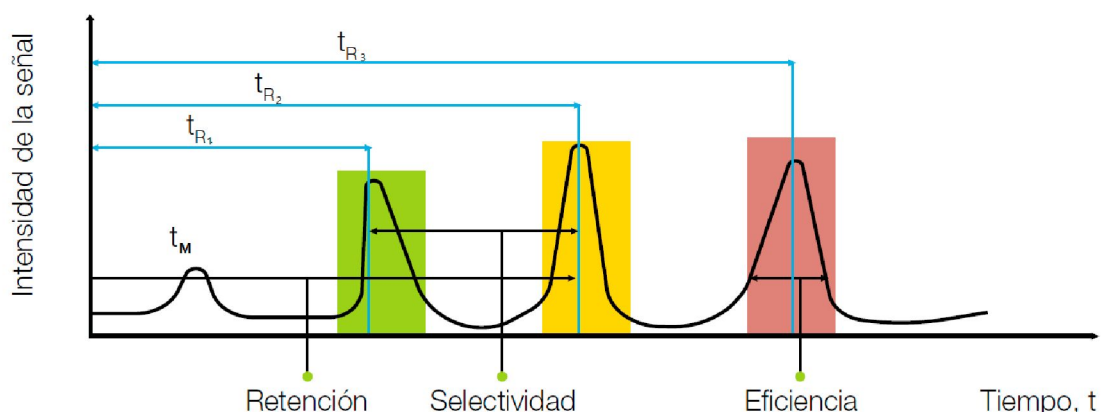
Para lograr una buena separación entre los componentes de una mezcla debe haber una óptima resolución de las señales o picos. La **resolución** de una columna,  $R_s$  indica cuán separadas están dos bandas en relación con su anchura. La resolución proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos (Skoog y col., 2014). Para que esto ocurra se controlan los siguientes parámetros:

- El **factor de retención**,  $k$ , que es la cantidad de tiempo que un soluto pasa en la fase estacionaria en relación con el tiempo que pasa en la fase móvil. Este valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil, por ejemplo, para fase reversa, este factor disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico y

aumenta al aumentar la proporción de agua (Quattrocchi y col., 1992; Skoog y col., 2014).

- La selectividad se puede medir por medio de un **factor de selectividad**,  $\alpha$ , el cual se define como la relación entre la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza. Por consiguiente, cuanto mayor es  $\alpha$ , mayor es la separación entre los dos componentes. Puede variar si se modifica algún componente de la fase móvil, el pH de la fase móvil o el cambio de la fase estacionaria (Harris, 2016; Quattrocchi y col., 1992; Skoog y col., 2014).
- La **eficiencia** se expresa por el número de platos teóricos,  $N$ , que indica el rendimiento de la columna. Un mayor número de  $N$  resultará una menor dispersión y picos más estrechos y eficientes (Harris, 2016).

La Figura 7 muestra los parámetros cromatográficos que se pueden identificar en un cromatograma.



**Figura 7. Retención, selectividad y eficiencia en un cromatograma (BÜCHI Labortechnik, 2019).**

En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización química de un extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino. La caracterización química que aquí se presenta, consiste en la determinación de macronutrientes de interés en la industria alimenticia y la determinación cromatográfica de antioxidantes naturales. Se utilizaron técnicas cuantitativas como gravimétricas, valoraciones/titulaciones, espectrofotométricas y cromatográficas (HPLC) que permitieron caracterizar al extracto etanólico.

## 2. OBJETIVOS

A continuación, se presentan los objetivos propuestos en la planificación de este trabajo final de licenciatura en química:

### 2.1. Objetivo General

Determinar la riqueza en macronutrientes y antioxidantes liposolubles de un extracto de langostino (*Pleoticus muelleri*).

### 2.2. Objetivos Específicos

- a. Determinar la composición centesimal de un extracto de langostino.
- b. Poner a punto un sistema cromatográfico para la identificación de astaxantina,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV-Vis).
- c. Identificar astaxantina,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol en un extracto etanólico de langostino por HPLC.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos

Se trabajó con un extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino *Pleoticus muelleri*, el cual se observa en la Figura 8. Esta muestra fue provista por el equipo de investigación, quienes indican que este extracto posee dos años de antigüedad.



**Figura 8. Extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino.**

Se utilizaron patrones comerciales de astaxantina (Sigma Aldrich, 92% pureza, Alemania) y  $\beta$ -caroteno (Sigma Aldrich, Tipo I, 95 % de pureza).

Los solventes y reactivos utilizados en la preparación de extracto y el análisis proximal fueron de calidad pro-análisis (A.C.S.) como acetona (Sintorgan) y ácido sulfúrico (Sintorgan).

Los solventes utilizados para las determinaciones cromatográficas como acetonitrilo (Sintorgan), metanol (Sintorgan) e isopropanol (Sintorgan) fueron de calidad HPLC.

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Composición centesimal

#### 3.2.1.1. Humedad

Se realizó la determinación de humedad de acuerdo a AOAC (1990) con ligeras modificaciones. Se pesó en un crisol de porcelana aproximadamente 2,500 g de muestra en una balanza analítica marca Radwag. A continuación, la muestra se llevó a estufa de secado y cultivo (FAC, Argentina), con una temperatura entre 100°C a 110°C hasta peso constante.

Para determinar el porcentaje de humedad se tuvo en cuenta el peso del crisol más la muestra húmeda ( $P_{CH}$ ), el peso del crisol más la muestra seca ( $P_{CS}$ ) y el peso del crisol vacío ( $P_{CV}$ ) y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_{CH} - P_{CS}}{P_{CH} - P_{CV}} \times 100$$

#### 3.2.1.2. Cenizas

Se realizó la determinación de cenizas de acuerdo a AOAC (1990) con ligeras modificaciones. Se pesó en una cápsula de porcelana aproximadamente 1,000 g de muestra en la balanza analítica marca Radwag. Se trabajó con una incineración seca de la muestra sometiendo a la misma primero a un secado con una temperatura entre 100 °C a 110 °C. Una vez seca la muestra se la coloca en un horno mufla (ORL, Argentina) a una temperatura de 550°C, hasta la obtención de cenizas a peso constante.

Para determinar el porcentaje de cenizas se tuvo en cuenta el peso de la muestra húmeda ( $P_H$ ), el peso de la cápsula más las cenizas ( $P_{CC}$ ) y el peso de la cápsula vacía ( $P_{CV}$ ). Luego se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_{CC} - P_{CV}}{P_H} \times 100$$

#### 3.2.1.3. Lípidos

Ésta técnica propuesta por Parrish (1999) se basa en una modificación a microescala de la técnica para determinar lípidos totales según Folch (1957). Para la determinación se utilizan

solventes no polares para aprovechar la solubilidad de los lípidos. Para ello se pesó entre 150 mg a 200 mg del extracto en un tubo de ensayo y luego se agregó una mezcla de solvente de cloruro de metileno – metanol (2:1). La relación solvente / biomasa fue 20/1. En total, se realizaron tres extracciones por muestra, colocando cada extracción en un balón, previamente tarado, y se evaporó el solvente orgánico en el evaporador rotatorio (Büchi) con bomba de vacío (Cole-Parmer, Corea). La fracción polar se conservó por separado.

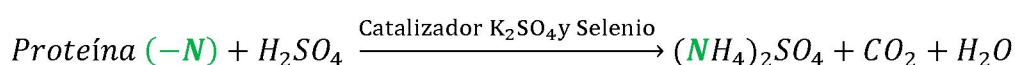
Esta técnica se basa en una determinación gravimétrica, en la cual se tuvo en cuenta el peso de la muestra húmeda ( $P_H$ ), el peso del matraz más la fracción lipídica de la muestra ( $P_{ML}$ ) y el peso del matraz vacío ( $P_M$ ) y se calculó de la siguiente manera:

$$\%Lípidos = \frac{P_{ML} - P_M}{P_H} \times 100$$

#### 3.2.1.4. Nitrógeno Total

Para la determinación de nitrógeno total se utilizó el método Kjeldahl (AOAC, 1990). A continuación, se describen los diferentes pasos en éste método:

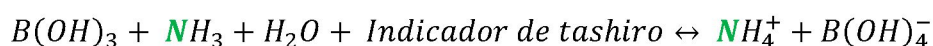
- I. Se realiza en primer término una digestión en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado caliente, el cual convierte los átomos de nitrógeno de la muestra en sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ ) liberando a su vez, dióxido de carbono ( $CO_2$ ).



- II. Después de enfriar, el ácido sulfúrico es neutralizado mediante la adición de un exceso de hidróxido de sodio ( $NaOH$ ) concentrado, liberando amoníaco ( $NH_3$ ) y como producto secundario la formación de sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ).



- III. El amoníaco ( $NH_3$ ) liberado mediante este tratamiento se destila entonces en un exceso medido de disolución estándar de ácido bórico ( $B(OH)_3$ ); el exceso se determina mediante una valoración con un ácido fuerte (Skoog y col., 2014).



## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO DE LANGOSTINO ARGENTINO

Para el análisis se pesó 1,000 g de muestra que se colocó en un balón Kjeldahl, al cual se le adicionó 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$  cc) y 1,00 g de catalizador de sulfato de potasio y selenio ( $K_2SO_4$  y Se) y luego se colocó el balón, en un equipo de digestión Tecnodalvo (Argentina) hasta que el contenido líquido del mismo estuvo transparente. A continuación, se le agregó 25,0 mL de agua destilada y 50,0 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 40 % p/v y se procedió al proceso de destilación en destilador UDK 129 Velp Scietifica, Italia. El destilado se recogió en un matraz Erlenmeyer que contenía 10,0 mL de ácido bórico ( $B(OH)_3$ ) al 4 % p/v y 6 gotas del indicador de Tashiro. Los iones amonio ( $NH_4^+$ ) son los que quedaron retenidos en el destilado y para determinar cuantitativamente su contenido, por último, se realizó una titulación de neutralización con ácido sulfúrico 0,1 N como solución titulante estándar.

El contenido de nitrógeno total se calculó teniendo en cuenta el volumen ( $V_{H_2SO_4}$ ) y concentración normal del ácido sulfúrico [ $C_{H_2SO_4}(N)$ ], los miliequivalentes (0,014) y el peso de la muestra húmeda en gramos ( $P_H$ ), mediante la siguiente expresión:

$$\%Nitrógeno\ total = \frac{V_{H_2SO_4} \times C_{H_2SO_4}(N) \times 0,014}{(P_H)}$$

### 3.2.1.5. Nitrógeno Proteico y Proteínas

Lo primordial en esta determinación es que se precipite previamente las proteínas contenidas en la muestra. Para ello, en un matraz Erlenmeyer se pesó aproximadamente 1,000 g de muestra y se le agregó 50,0 mL de agua destilada dejándolo reposar por unos 30 minutos. Luego se le añadió 10,0 mL de ácido tricloroacético ( $CCl_3COOH$ ) al 10 % p/v y se lo volvió a dejar en reposo por otros 30 minutos. A continuación, se filtró la solución obtenida, y se realizaron 2 lavados con ácido tricloroacético ( $CCl_3COOH$ ) al 90% p/v. Este producto obtenido, es decir lo que quedó retenido en el papel de filtro, fue lo que se utilizó para la determinación del contenido de nitrógeno proteico (Sinaga y col., 2016) sometiendo a este producto al método Kjeldahl para determinación de nitrógeno total explicado con anterioridad.

Una vez que se obtuvo finalmente datos respecto al contenido de nitrógeno proteico, se utilizan estos valores para realizar un cálculo multiplicando a cada uno por un factor de conversión a proteínas (Sinaga y col., 2016):

$$Proteínas = \%Nitrógeno\ proteico \times 6,25$$

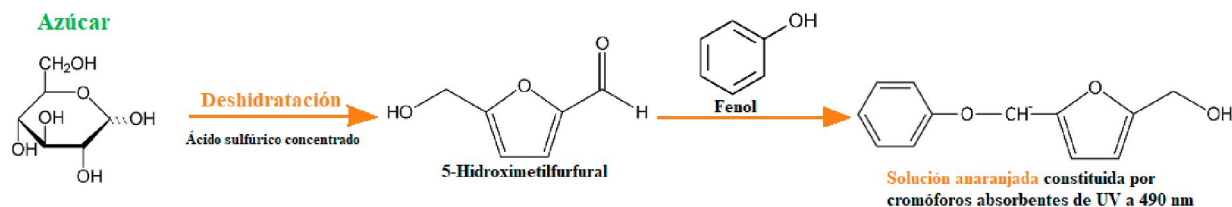
### 3.2.1.6. Nitrógeno No Proteico

El contenido de nitrógeno no proteico (NNP) en la muestra se calculó restando el contenido obtenido de nitrógeno proteico (NP) del contenido del nitrógeno total (NT), utilizando la siguiente expresión:

$$\%NNP = \%NT - \%NP$$

### 3.2.1.7. Carbohidratos

La determinación de azúcares totales se llevó a cabo mediante el método fenol-sulfúrico propuesto por Dubois y col. (1956). El método de Dubois es un método simple, rápido, sensible y se obtienen resultados reproducibles. Consiste en una reacción colorimétrica estable, producto de una serie de reacciones complejas de deshidratación catalizadas por un ácido fuerte y la adición de fenol. Esto permite la formación de compuestos derivados del furano como consecuencia de la condensación de compuestos fenólicos y heterocíclicos (Dubois y col., 1956), como se puede observar en la siguiente serie de reacciones (Figura 9).



**Figura 9. Reacción de identificación de carbohidratos.** Formación de complejo coloreado.

Se realizó trabajando con la muestra y con una curva de calibrado de glucosa de 8 puntos en la curva, cuyas concentraciones variaron entre 10 µg/mL a 80 µg/mL. La muestra fue una dilución 1/20 de la fracción polar que se obtuvo en la determinación de lípidos. El procedimiento consistió en colocar en un tubo de ensayo 2,0 mL de la solución de glucosa a la cual se le agregó 1,0 mL de fenol al 5 % p/v y con cuidado se añadió 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Luego se procedió a medir su absorbancia.

En la determinación espectrofotométrica se utilizó un espectrofotómetro (UV-1800 240V Shimadzu corporation, Japón, software UV-probe versión 2.43) y se trabajó a una longitud de onda de máxima absorción de 489 nm.

### **3.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución**

La determinación cuantitativa se llevó a cabo con un cromatógrafo líquido de alta resolución, con detector UV-Visible (Smartline 2500, D-14163, Knauer, Alemania), bomba binaria (Smartline 1000, D-14163, Knauer, Alemania). Se utilizó una columna RP-18 (LiChroCART® 125-4). Tanto los patrones de astaxantina y  $\beta$ -caroteno, así como también el extracto previo a la inyección, fueron filtrado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (MILLEX-GV, Millipore, Francia), y luego fue inyectado en un *loop* de 20  $\mu\text{L}$ . Se utilizó un flujo de 1 mL/min y temperatura ambiente en todas las determinaciones. Los cromatogramas de cada experiencia fueron obtenidos a través del software Clarity Chrom 2.6.5.517.

#### **3.2.2.1. Sistema cromatográfico para el análisis de astaxantina**

Se partió con una fase móvil 100% acetonitrilo calidad HPLC, realizándose incrementos sucesivos de 5% de metanol como segundo componente de la fase móvil de acuerdo con Snyder y col (1997). Los incrementos se realizaron hasta lograr la mejor definición y resolución de la señal.

#### **3.2.2.2. Sistema cromatográfico para el análisis de $\beta$ -caroteno**

Se partió con una fase móvil 100% acetonitrilo calidad HPLC, realizándose incrementos sucesivos de 5% de isopropanol como segundo componente de la fase móvil de acuerdo con Snyder y col. (1997). Los incrementos se realizaron hasta lograr la mejor definición y resolución de la señal.

#### **3.2.2.3. Construcción de la curva de calibración**

Una vez que se estableció el sistema cromatográfico para cada carotenoide, se procedió a construir curvas de calibración para cada uno de ellos de manera tal de poder cuantificar estos componentes en la muestra. En la determinación cuantitativa de los analitos de interés se trabajó con patrones comerciales de astaxantina y  $\beta$ -caroteno. Se preparó una curva de calibración con cada patrón, en ambos casos utilizando acetona (Sintorgan) como disolvente.

Las concentraciones de las diluciones para astaxantina y  $\beta$ -caroteno fueron de 0,33  $\mu\text{g/mL}$  – 3,97  $\mu\text{g/mL}$  y de 0,18  $\mu\text{g/mL}$  – 3,50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### **3.2.2.4. Análisis del Extracto**

Se preparó una dilución del extracto etanólico de langostino. Se disolvió 150 mg en 4 mL de acetona. Previo a la inyección de la muestra en el HPLC se filtró la solución. Las determinaciones de los analitos de interés astaxantina y  $\beta$ -caroteno en el extracto, se realizaron acorde a los sistemas establecidos para cada patrón comercial.

#### **3.2.3. Estadística**

Todas las metodologías aplicadas en este trabajo final, se realizaron teniendo en cuenta parámetros estadísticos de precisión, por lo que cada técnica se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar. Se utilizaron herramientas informáticas como hojas de cálculo Excel de Microsoft Office 2016 y software Clarity Chrom 2.6.5.517.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Composición centesimal

Los resultados obtenidos brindan información de la composición centesimal de interés nutricional, de un ingrediente que será adicionado a un alimento balanceado. Los resultados se expresan como porcentaje, g/100 g de extracto, en base seca.

**Cenizas:** La Figura 10 presenta el resultado de la determinación de cenizas. Se obtuvo un polvo blanquecino/grisáceo producto de la incineración de la muestra cuyo porcentaje fue  $13,86 \pm 0,04 \%$ .



Figura 10. Cenizas del extracto etanólico de langostino.

El extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino es rico en minerales, aunque es menor a la que se determinó en cáscaras de langostino (Cretton, 2019). Es importante recordar que este extracto actúa como un ingrediente de un alimento balanceado, aportando principalmente carotenoides, por lo que no afecta significativamente al aporte de cenizas totales del alimento.

**Lípidos:** Se observa en los matraces de la Figura 11 el resultado de la determinación de lípidos totales del extracto etanólico. Se obtuvo un aceite de coloración rojiza debido a la presencia de carotenos naturales. El porcentaje obtenido fue  $67,78 \pm 0,71 \%$ .



Figura 11. Lípidos del extracto etanólico de langostino.

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO DE LANGOSTINO ARGENTINO

Fue importante determinar el contenido de lípidos, debido a que, en los peces, al igual que en otros organismos, desempeñan diversas funciones vitales. Estos lípidos cumplen funciones de reserva y fuente de energía, constituyen la membrana biológica, son fuente de ácidos grasos esenciales, transportadores de nutrientes (lipoproteínas) y precursores de hormonas esteroideas. Hasta el momento se sabe que el extracto etanólico presenta como componentes astaxantina y otros compuestos como ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y colesterol (Cretton, 2019), pero no se contaba con el dato de contenido de lípidos totales. Los resultados muestran que el extracto analizado contribuye con el aporte de lípidos al alimento balanceado.

**Nitrógeno proteico y proteínas:** Se observa en la Figura 12 los diversos pasos a los que se sometió el extracto para determinar nitrógeno proteico. En la figura 12.C, se observa la reducción de masa del precipitado en el segundo paso de precipitación de proteínas por acidificación. El porcentaje de proteínas obtenido fue  $2,86 \pm 0,32$  %.

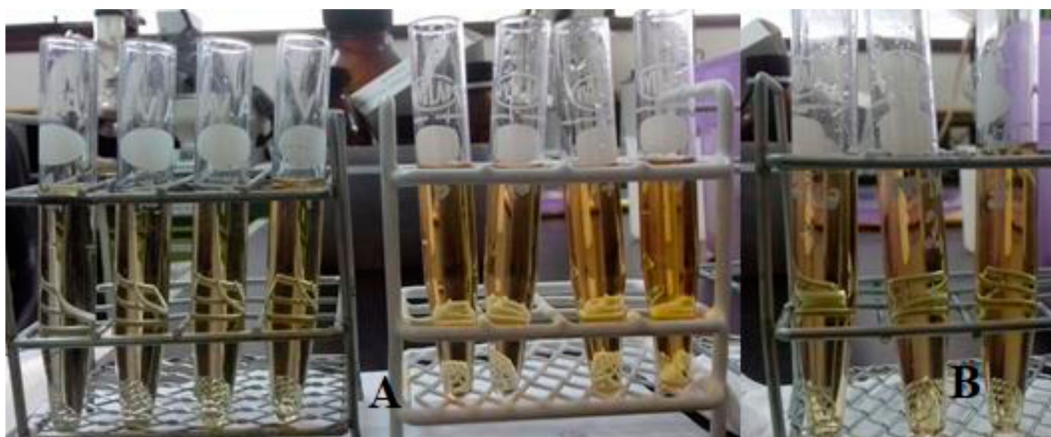


**Figura 12. Determinación de nitrógeno proteico.** A: Precipitación de proteínas; B y C: Filtración de proteínas precipitadas.

**Nitrógeno no proteico:** se obtuvo un porcentaje de  $7,58 \pm 0,25$  %. Este representa aproximadamente el 94% del nitrógeno total.

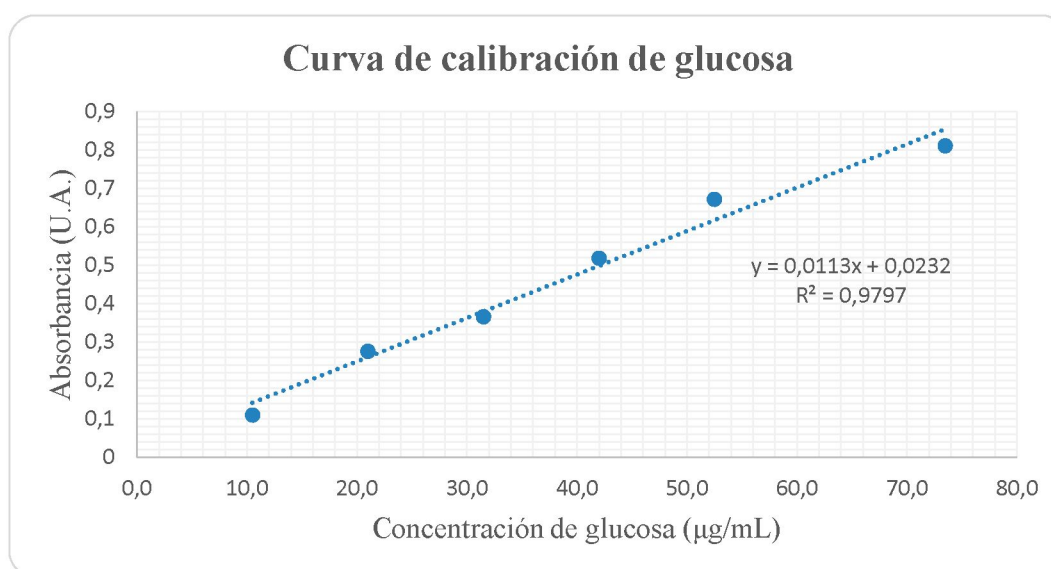
El contenido de nitrógeno en este extracto etanólico es debido principalmente a la presencia de nitrógeno no proteico. Se sabe que en alimentos frescos de origen marino este porcentaje ronda entre el 10-40 % (Ariño y col., 2013). El contenido de nitrógeno no proteico aumenta conforme se deteriora la muestra. Por lo que dada la antigüedad del extracto utilizado se esperaba un valor elevado. Como se mencionó anteriormente, el nitrógeno no proteico proviene de por ejemplo aminoácidos libres, péptidos pequeños, trimetilamina, entre otros, que son solubles en agua, de bajo peso molecular y que contienen nitrógeno (Blanco, 2006). También se sabe que en diferentes especies de peces estos compuestos actúan como atrectores estimulando la necesidad de comer (Kaur y col., 2022), por lo que la riqueza de este extracto con estos componentes, podría favorecer su uso.

**Carbohidratos:** las soluciones de glucosa que se utilizaron para armar la curva de calibrado son de color amarillo translúcida y se pueden observar en la Figura 13.



**Figura 13. Determinación de carbohidratos.** Interpretación: A: curva de calibración de glucosa; B: triplicado de la muestra aplicadas a la técnica de Dubois.

Las concentraciones de las diluciones cumplieron con la Ley de Lambert-Beer (Figura 14).



**Figura 14. Determinación de carbohidratos.** Curva de calibración de las disoluciones de glucosa ajustadas a la mejor regresión.

El porcentaje promedio de carbohidratos fue  $4,03 \pm 1,26 \%$ .

Los resultados obtenidos muestran un pequeño aporte de esta biomolécula, que contribuirá como fuente energética junto con los carbohidratos de origen vegetal que forman parte del alimento balanceado.

Los resultados, en base seca, obtenidos para la determinación de la composición centesimal del extracto etanólico de cabezas y cáscaras de langostino, se reúnen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Composición centesimal de extracto de cabezas y cáscaras de langostino *P. muelleri* en base seca.**

| Composición Química en base seca |                                    |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Componente                       | Concentración (g / 100 g extracto) |
| Cenizas                          | 13,86 ± 0,04                       |
| Lípidos                          | 67,78 ± 0,71                       |
| Proteínas                        | 2,86 ± 0,32                        |
| Nitrógeno No Proteico            | 7,58 ± 0,25                        |
| Carbohidratos                    | 4,03 ± 1,26                        |

De acuerdo a los resultados obtenidos de la composición química, se puede observar que el extracto está mayoritariamente constituido por lípidos y en segundo lugar por minerales. Resulta difícil comparar con extractos de otras especies de langostino, debido a que no se han encontrado reportes de la caracterización química de un extracto, solo se identifican diferentes componentes lipídicos (Gómez-Estaca, 2017). Sin embargo, se puede comparar respecto al material de partida que le dio origen que, como se mencionó al inicio de este trabajo, era rico principalmente en cenizas y proteínas (Cretton y col., 2021). Por lo tanto, la extracción produce una disminución en el aporte de cenizas y proteínas, pero aumenta considerablemente el aporte de lípidos donde se encuentran, además de los ácidos grasos poliinsaturados, los antioxidantes de interés en este trabajo final. Esto era lo esperado debido a que se utilizó etanol como solvente de extracción y éstos compuestos son solubles en el mismo.

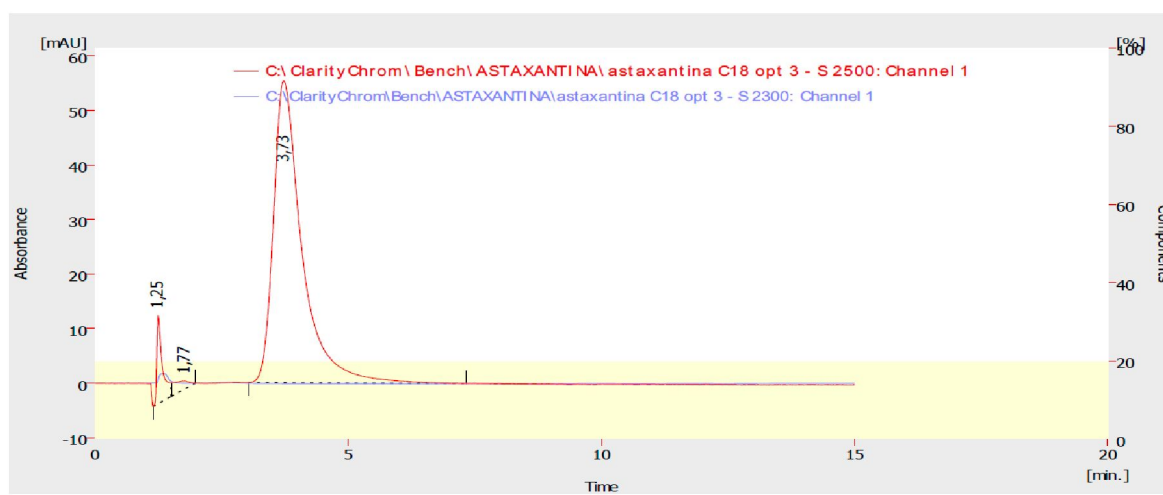
#### **4.2. Identificación de analitos por cromatografía líquida de alta resolución**

La lectura de material bibliográfico (libros teóricos y artículos de investigación) permitió obtener la información suficiente para poder establecer un sistema cromatográfico adecuado. Se ajustó las fases móviles en las distintas determinaciones de manera que mejoren la resolución, selectividad y eficiencia de la señal de los analitos de interés.

Para identificar los patrones comerciales de astaxantina y  $\beta$ -caroteno, se trabajó con el triángulo de solventes propuesto por Snyder (1974) y esto fue primordial. Se eligieron solventes de diferentes grupos y se buscó mejorar la fuerza de solvente para poder identificar estos analitos

en tiempos de retención que sean convenientes. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para identificación de los patrones comerciales y la identificación de los analitos en el extracto etanólico.

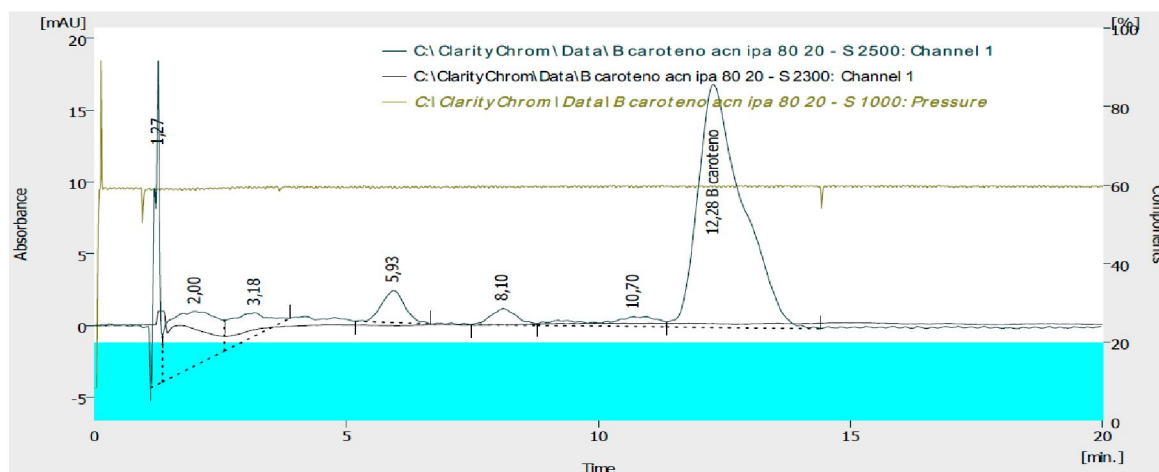
**Sistema cromatográfico de astaxantina:** la identificación de este analito se realizó a una longitud de onda de máxima absorción de 477 nm. La proporción de la fase móvil que favoreció a la mejor resolución de la señal fue a 80:20 Acetonitrilo: Metanol. El tiempo de retención fue de  $3,73 \pm 0,60$  minutos como se puede observar en la Figura 15.



**Figura 15. Cromatograma del patrón comercial de astaxantina.** Longitud de onda de máxima absorción de 477 nm, en una fase móvil 80:20 Acetonitrilo:Metanol.

Se buscó mejorar la fuerza de solvente para que principalmente la astaxantina sea detectada en un tiempo de retención menor a 5 minutos, pero que no se encuentre dentro del rango de tiempo muerto,  $t_M$ , (1,25 min).

**Sistema cromatográfico de  $\beta$ -caroteno:** la identificación de este analito se realizó a una longitud de onda de máxima absorción de 452 nm. Se obtuvo una mejor resolución de la señal con una fase móvil 80:20 Acetonitrilo:Isopropanol. El tiempo de retención del  $\beta$ -caroteno fue de  $12,28 \pm 0,60$  minutos, como se puede observar en la Figura 16.



**Figura 16. Cromatograma del patrón comercial de  $\beta$ -caroteno.** Longitud de onda de máxima absorción de 452 nm, en una fase móvil 80:20 Acetonitrilo:Isopropanol.

Se buscó mejorar la fuerza de solvente para que el  $\beta$ -caroteno pudiera ser detectado a un tiempo de retención menor al reportado en bibliografía (Honda y col., 2018), que fue aproximadamente cerca de 30 minutos. Es decir, se logró mejorar la selectividad y la fuerza del solvente y, por lo tanto, la resolución de las señales y los tiempos de retención de estos analitos de interés.

Al tener el  $\beta$ -caroteno (Figura 3) una estructura sin grupos polares, la fuerza de solventes tenía que ser un poco mayor que la del sistema cromatográfico para astaxantina, es por eso que se optó por la utilización de isopropanol en vez de metanol. Esta fase móvil permitió identificar el  $\beta$ -caroteno en un tiempo de retención esperado. En la bibliografía revisada, se observó que el tiempo de retención de este analito se encuentra entre los 25 – 30 minutos (Honda y col., 2018; Szyplka y col., 2005), es por esta razón que se resalta la importancia de haber reducido el tiempo de retención.

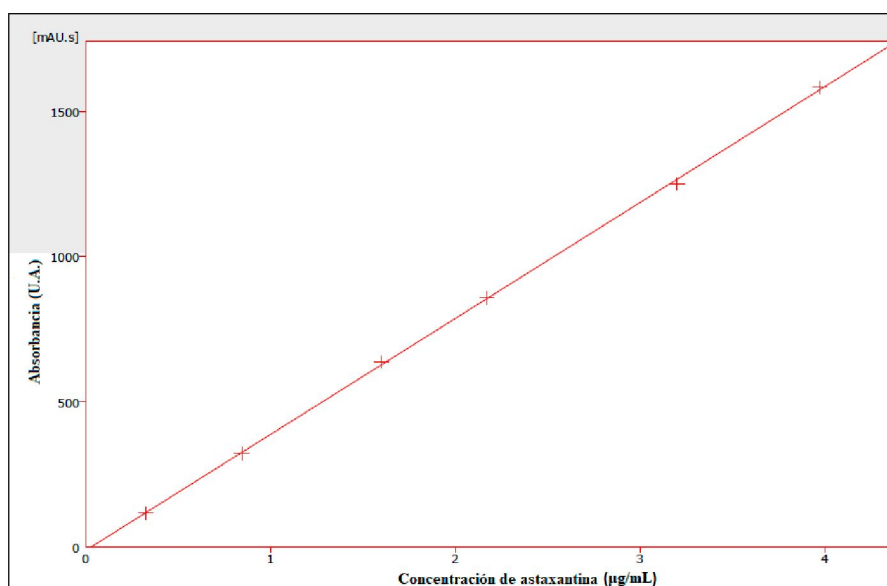
En este trabajo se logró definir un sistema cromatográfico para obtener un tiempo de retención mucho menor de astaxantina y  $\beta$ -caroteno respecto a las bibliografías consultadas, manteniendo una buena resolución de los picos.

### 4.3. Curvas de calibración

Para poder cuantificar estos analitos en diferentes muestras, se construyeron curvas de calibración de astaxantina (Figura 17) y  $\beta$ -caroteno (Figura 18), medidas en sus respectivas longitudes de onda de máxima absorción. Estas sirven para validar un método, es decir que se debe confirmar y documentar que los resultados obtenidos por el método analítico son confiables y precisos.

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO DE LANGOSTINO ARGENTINO

La recta obtenida en la curva de calibración de astaxantina fue:  $y = 399,227x - 12,908$  y cuyo coeficiente de regresión lineal fue 0,999.



**Figura 17. Curva de calibración de astaxantina.**

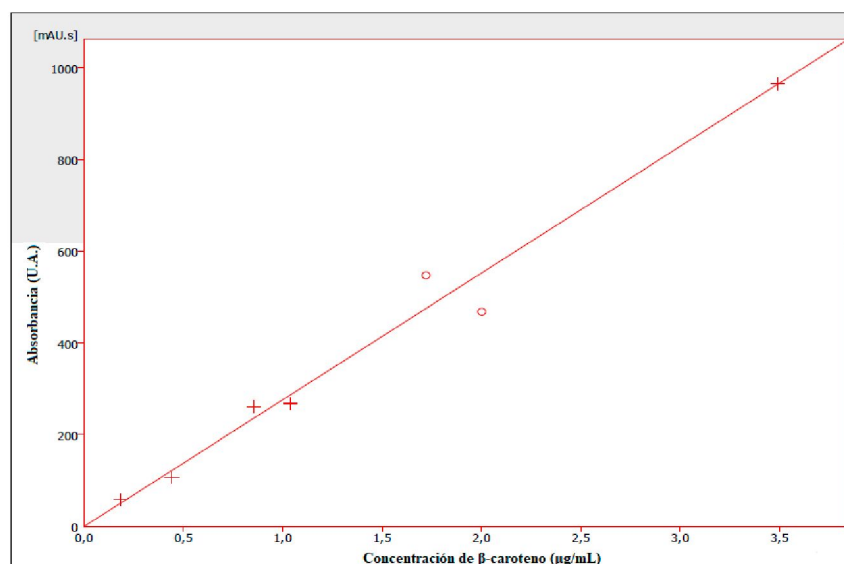
En la Tabla 3, se muestran los valores de concentración de las diluciones de astaxantina ( $C_{tit}$ ) con sus respectivas respuestas (Área) a la longitud de onda de máxima absorción (477 nm), obtenidos en las corridas cromatográficas.

**Tabla 3. Datos experimentales correspondientes a dilución de astaxantina.**

| $C_{tit}$ astaxantina (µg/mL) | Área (mUA.s) |
|-------------------------------|--------------|
| 0,326                         | 114,920      |
| 0,845                         | 321,425      |
| 1,600                         | 635,748      |
| 2,172                         | 857,357      |
| 3,201                         | 1248,711     |
| 3,973                         | 1581,146     |

La recta obtenida en la curva de calibración de  $\beta$ -caroteno fue:  $y = 276,432x - 0,686$  ajustada a una regresión más favorable con un coeficiente de regresión lineal de 0,9988.

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN EXTRACTO DE LANGOSTINO ARGENTINO



**Figura 18. Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno.**

En la Tabla 4, se muestran los valores de concentración de las diluciones de  $\beta$ -caroteno ( $C_{tit}$ ) con sus respectivas respuestas (Área) a la longitud de onda de máxima absorción (452 nm). El ajuste a la mejor regresión en la curva se realizó eliminando los puntos de concentración 1,723 y 2,005  $\mu\text{g/mL}$ . Fue necesario eliminar estos puntos debido a que posiblemente hubo un error en la dilución de estas soluciones, hecho que se puede evidenciar al analizar las áreas obtenidas, donde la solución más concentrada presenta un área menor.

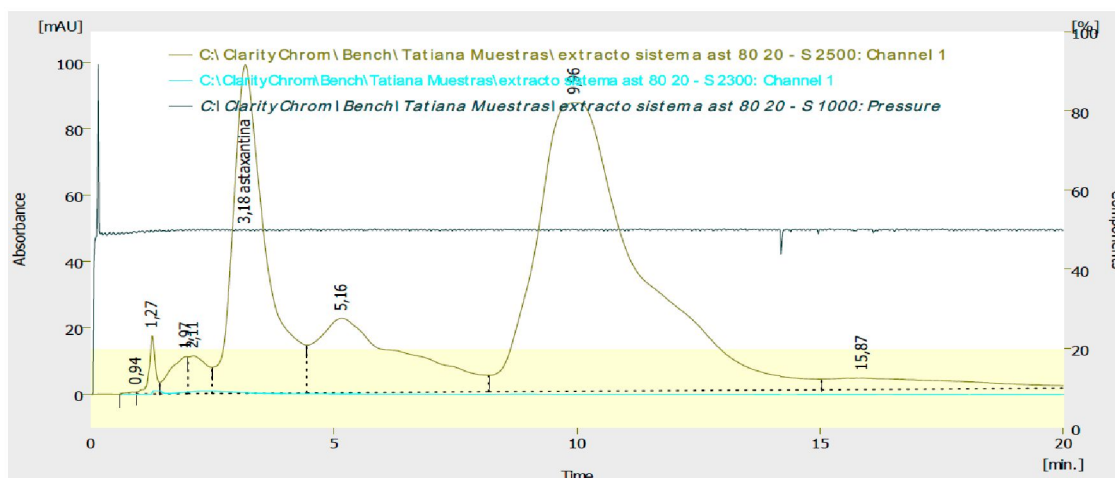
**Tabla 4. Datos experimentales correspondientes a dilución de  $\beta$ -caroteno.**

| $C_{tit}$ $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Área (mUA.s) |
|--|--------------|
| 0,184  | 58,460       |
| 0,442  | 106,238      |
| 0,856  | 260,917      |
| 1,039  | 267,378      |
| 1,723  | 546,421      |
| 2,005  | 466,850      |
| 3,500  | 965,020      |

#### 4.4. Análisis del extracto: Identificación y Cuantificación de analitos

Se trabajó con el sistema cromatográfico establecido para astaxantina y  $\beta$ -caroteno, para poder identificar y cuantificar los analitos en el extracto etanólico de langostino. Debido a que el patrón comercial de  $\alpha$ -tocoferol adquirido por el grupo era importado y no llegó a tiempo, se trabajó solamente con los patrones disponibles de astaxantina y  $\beta$ -caroteno.

La Figura 19, muestra el cromatograma que se obtuvo de la separación cromatográfica del extracto, en el sistema definido para la identificación de astaxantina. En este cromatograma se observan diferentes señales y aquella señal correspondiente al tiempo 3,18 minutos fue identificada como astaxantina libre. Con respecto a las señales que aparecen a tiempos de retención superiores podrían corresponder a astaxantina esterificada. Actualmente en el laboratorio se continúan realizando experimentos para poder identificar estas señales.



**Figura 19. Cromatograma del extracto en condiciones de astaxantina.** *Corrida cromatográfica del extracto de cabezas y cáscaras de langostino en un sistema con fase móvil 80:20 Acetonitrilo:Metanol.*

La Tabla 5 muestra el resultado de la cuantificación de astaxantina en el extracto y la respuesta de las señales no identificadas. Como resultado de las separaciones cromatográficas se puede observar la presencia de astaxantina en el extracto (Figura 19). La concentración de la misma fue 11,7  $\mu\text{g/mL}$  en la dilución, lo que corresponde a 302,5  $\mu\text{g/g}$  de extracto.

**Tabla 5. Identificación y cuantificación de astaxantina en el extracto etanólico.**

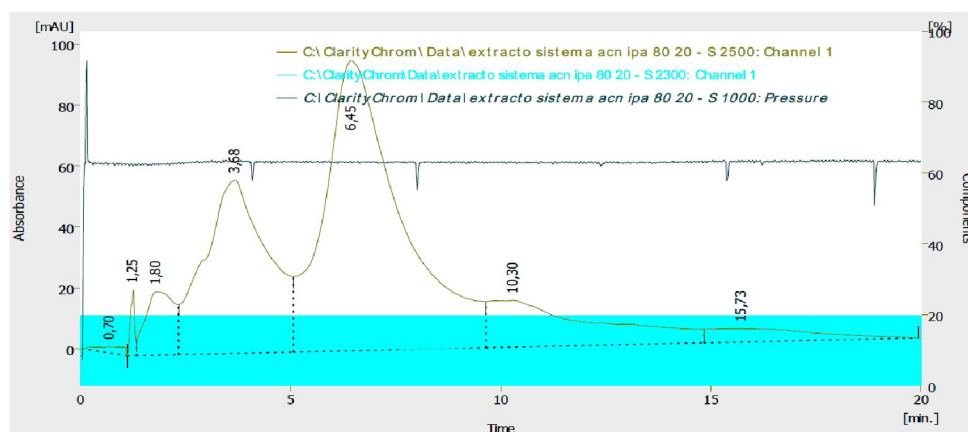
Result Table (ESTD - C:\ClarityChrom\Bench\Tatiana Muestras\extracto sistema ast 80 20 - S 2500: Channel 1)

|   | Reten. Time [min] | Response  | Amount [ug/mL] | Amount [%] | Peak Type | Compound Name | Reten. Index [-] |
|---|-------------------|-----------|----------------|------------|-----------|---------------|------------------|
| 1 | 0,937             | 8,777     | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 2 | 1,267             | 159,169   | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 3 | 1,970             | 277,442   | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 4 | 2,113             | 294,084   | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 5 | 3,180             | 4666,341  | 11,721         | 100,0      | Ordnr     | astaxantina   | 0,000            |
| 6 | 5,163             | 2872,065  | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 7 | 9,957             | 12733,278 | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
| 8 | 15,870            | 716,026   | 0,000          | 0,0        |           |               | 0,000            |
|   | Total             |           | 11,721         | 100,0      |           |               |                  |

Reten. Time = Tiempo de retención (min); Response = Respuesta (Absorbancia); Amount = Concentración en  $\mu\text{g/mL}$  y en porcentaje (%) en relación a todos los compuestos de la muestra, Peak Type = tipo de pico; Compound Name = nombre del analito de interés.

Este resultado (0,3 mg/g extracto, en unidades de comparación) es menor al reportado por Gómez Estaca y col. (2017), que fue de 7 mg/g de extracto para langostino cuya especie era *L. vannamei*. Este autor calculó el porcentaje de astaxantina libre teniendo en cuenta el área del pico y el total del área bajo la curva del cromatograma. Asimismo, consideró que el resto de las señales corresponden a astaxantina esterificada. El porcentaje determinado fue de aproximadamente 16 %. Teniendo en cuenta la misma consideración que tuvo el autor (Gómez-Estaca y col., 2017), en nuestro caso, se obtuvo un 21% de astaxantina libre respecto al total, un valor ligeramente superior.

La Figura 20 muestra el cromatograma obtenido de la separación cromatográfica del extracto, en el sistema definido para la identificación de  $\beta$ -caroteno. En este cromatograma se observan diferentes señales, pero ninguna de ellas correspondientes al tiempo de retención del  $\beta$ -caroteno.



**Figura 20. Cromatograma del extracto en condiciones de  $\beta$ -caroteno.** Corrida cromatográfica del extracto de cabezas y cáscaras de langostino en un sistema con fase móvil 80:20 Acetonitrilo:Isopropanol.

El grupo de antioxidantes lipídicos que se indagaron en este trabajo están presentes en otras especies de langostino (Amaya y Nickell, 2015). De acuerdo a la disponibilidad de patrones, se indagó la presencia de astaxantina libre y  $\beta$ -caroteno, pudiéndose identificar y cuantificar a la astaxantina. No se evidenció presencia de  $\beta$ -caroteno en el extracto etanólico de cáscaras y cabezas de langostino. Se esperaba la presencia de éste último, dado que existen reportes de la presencia de  $\beta$ -caroteno en otras especies de camarones y langostinos (*Exopalaemon carinicauda*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* y *Trachysalambria curvirostris*) (Su y col., 2018; Su y Liu, 2019). En estas investigaciones citadas previamente, el carotenoide que se identifica en mayor proporción es astaxantina y el  $\beta$ -caroteno corresponde aproximadamente al 10% de esas muestras.

## 5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se obtuvieron datos relevantes sobre la composición centesimal y el contenido de carotenoides de un extracto etanólico de cabezas y cáscaras de langostino. Los extractos de este material están siendo utilizados por el grupo de investigación, para experimentos de suplementación dietaria en acuicultura. El extracto de cabezas y cáscaras de langostino (*Pleoticus muelleri*), es principalmente rico en lípidos en donde se encuentra el carotenoide astaxantina, además, aporta cantidades menores de otros macronutrientes, tales como proteínas y carbohidratos, como así también minerales.

Además, trabajando con patrones comerciales de calidad cromatográfica, se pudieron ajustar los parámetros necesarios para realizar el análisis de identificación de  $\beta$ -caroteno y astaxantina. Esta puesta a punto de técnicas, permite sumar dos nuevos protocolos de análisis a los de rutina del laboratorio. Por último, se pudo analizar el extracto utilizando las técnicas puestas a punto y se confirmó la presencia de astaxantina en el extracto y la ausencia de  $\beta$ -caroteno.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (1990). *Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis* (15th, Vol. 1, Issue Volume 1).

Amaya, E., & Nickell, D. (2015). Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, 269–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00011-8>

Ariño, A., Beltrán, J. A., Herrera, A., & Roncalés, P. (2013). Fish and seafood: Nutritional Value. En *Encyclopedia of Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00110-0>

BeMiller, J. N. (2017). Carbohydrate Analysis. En *Food Analysis* (5 ed, pp. 334;340-341).

Blanco, A. (2006). *Química Biológica* (8 ed). El Ateneo.

Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8).

BÜCHI Labortechnik. (2019). *Chromapedia: la guía completa*. <https://www.buchi.com/es/conocimiento/aplicaciones/chromapedia-la-guia-completa>

Carey, F., & Giuliano, R. (2014). *Química Orgánica* (9 ed). Mc Graw Hill Education.

Cerda, R. C., Mazzuca, M., Vanella, F. A., Prince, P. D., Barrera, R., Bengoechea, J., & Malanga, G. F. (2020). Efecto del agregado de extractos ricos en astaxantina natural en alimento balanceado para el cultivo del róbalo (*Eleginops maclovinus*, Valenciennes, 1830). *XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos y XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimento*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/189332>

Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. En *Food Analysis* (5 ed, pp. 317–321).

Christie, W. W., & Han, X. (2012). Lipids: their structures and occurrence. En *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis* (4a ed., pp. 3–19). Oily Press. <https://doi.org/10.1533/9780857097866.3>

Cretton, M., Malanga, G., Mazzuca Sobczuk, T., & Mazzuca, M. (2021). Lipid Fraction from Industrial Crustacean Waste and Its Potential as a Supplement for the Feed Industry: A Case Study in Argentine Patagonia. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2311–2319. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01162-7>

Cretton, Martina. (2019). *Mejoramiento de la calidad nutricional de alimento balanceado para acuicultura*. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Departamento de Química, U.N.P.S.J.B.

Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. En *Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Feduchi, E., Blasto, I., Romero, C., & Yáñez, E. (2010). *Bioquímica: Conceptos esenciales* (1 ed). Medica Panamericana.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. M. (1957). A simple technique to rule out occlusion of right coronary artery after aortic valve surgery. *Journal of Biological Chemistry*, 92(6), 2281–2282. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.06.016>

Gómez-Estaca, J., Calvo, M. M., Álvarez-Acero, I., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2017). Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and  $\alpha$ -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chemistry*, 216, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.016>

Harris, D. C. (2016). *Análisis químico cuantitativo* (3 ed). Reverté.

Harris, G., & Marshall, M. (2017). Ash Analysis. En *Food Analysis* (5 ed, pp. 287–290). Springer.

Honda, M., Kodama, T., Kageyama, H., Hibino, T., Wahyudiono, Kanda, H., & Goto, M. (2018). Enhanced Solubility and Reduced Crystallinity of Carotenoids,  $\beta$ -Carotene and Astaxanthin, by Z-Isomerization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), 9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800191>

Kaur, K., Kortner, T. M., Benitez-santana, T., & Burri, L. (2022). Effects of Antarctic Krill Products on Feed Intake, Growth Performance, Fillet Quality, and Health in Salmonids. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/3170854>

López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., & Ríos-Vázquez, N. J. (2006). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A*, 1105, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.010>

Maestro-Durán, R., & Borja Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites*, 44(2), 107–111. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i2.1106>

McMurry, J. (2012). *Química Orgánica* (8 ed). CENGAGE Learning.

Nielsen, S. S. (2017). *Food Analysis* (5 ed, p. 647). Springer.

Parrish, C.C. (1999). Determination of Total Lipid, Lipid ClsSES, and Fatty Acids in Aquatic Samples. *Lipids in Freshwater Ecosystems*, 4-20. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0_2)

Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. I., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. En *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica*.

Sánchez-Camargo, A. P., Almeida Meireles, M. Â., Lopes, B. L. F., & Cabral, F. A. (2011). Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Food Engineering*, 102(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.008>

Schieberle, P., Belitz, H.-D., & Grosch, W. (2008). *Food Chemistry* (4 ed). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_22)

Sinaga, S. M., Lubis, I. Y., & Silalahi, J. (2016). Analysis of total protein and non-protein nitrogen in Pakkat as a traditional food of Mandailing Natal by using Kjeldahl Method. *International Journal of Pharmtech Research*, 9(12), 54.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2009). *Principios de Análisis Instrumental* (6 ed). CENGAGE Learning.

Skoog, D., West, D., Holler, F. J., & Crouch, S. (2014). *Fundamentos de Química Analítica* (9 ed). CENGAGE Learning.

Snyder, L. R. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, 92(2), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85732-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-5)

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). Basics of Separation. En *Practical HPLC Method Development* (pp. 21–58). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118592014.ch2>

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). Non-Ionic Samples: Reversed- and Normal-Phase HPLC. En *Practical HPLC Method Development* (pp. 233–291). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118592014.ch6>

Su, F., Huang, B., & Liu, J. (2018). The carotenoids of shrimps (Decapoda: Caridea and Dendrobranchiata) cultured in China. *Journal of Crustacean Biology*, 38(5), 523–530. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruy049>

Su, F., & Liu, J. (2019). The carotenoid characteristics of the important wild shrimp *Trachysalambria curvirostris* (Stimpson, 1860) in China. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37(2), 706–712. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-8018-z>

Szpylka, J., DeVries, J. W., Bhandari, S., Bui, M. H., Ji, D., Konings, E., Lewis, R., Maas, P., Parish, H., Post, B., Schierle, J., Sullivan, D., Taylor, A., Wang, J., Ware, G., Woollard, D., & Wu, T. (2005). Determination of  $\beta$ -carotene in supplements and raw materials by reversed-phase high pressure liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1279–1291. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1279>

Vázquez-Ovando, A., Mejía-Reyes, J. D., García-Cabrera, K. E., & Velázquez-Ovalle, G. (2022). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9–33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>