

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA PROVENIENTE DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN *LITOPENAEUS VANNAMEI* CON UNA MEZCLA TERNARIA DE SOLVENTES UTILIZANDO DISEÑO SIMPLEX RETICULAR AUMENTADO

OPTIMIZATION OF ASTAXANTHIN EXTRACTION FROM *LITOPENAEUS VANNAMEI* SHRIMP EXOSKELETON USING A TERNARY SOLVENT MIXTURE WITH AUGMENTED SIMPLEX RETICULAR DESIGN

Carlos Brito D.¹, Martha Suárez H.^{1*}, Cristhopher Maila C.¹ & Alejandro Osorio Q.²

Recibido: 20 de enero 2024 / Aceptado: 29 de junio 2024
DOI: 10.26807/ia.v12i2.281

Palabras clave: astaxantina, mezcla ternaria de solventes, optimización de extracción, simplex reticular aumentado (SRA).

Keywords: Astaxanthin, Simplex Reticular Augmented (SRA), Optimization of extraction, ternary solvent mixture

¹Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Química, Quito – Ecuador (cabrito@uce.edu.ec; *correspondencia: masuarez@uce.edu.ec; cdmaila@uce.edu.ec).

²Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Bioquímica y Farmacia, Quito – Ecuador (maosorio@uce.edu.ec).

RESUMEN

En este estudio, se empleó el diseño experimental simplex reticular aumentado (SRA, por sus siglas en inglés) para ajustar la ecuación matemática que modela el rendimiento de la extracción de astaxantina a partir del exoesqueleto de *Litopenaeus vannamei* en función de las proporciones de diclorometano, acetona y n-hexano. Se muestra la validez de esta ecuación ajustada con coeficiente de correlación R^2 de 0,9802, como modelo para calcular el rendimiento de extracción. Con base en la ecuación ajustada, se definió una región de optimización con las seis mejores combinaciones de solventes; esta región se ubicó en la parte superior del simplex, donde la concentración de diclorometano es mayor y la polaridad de las mezclas oscila entre 1,5 y 4. Se determinó que la interacción entre diclorometano y n-hexano no es significativa. Para un mínimo de rendimiento de 14 $\mu\text{g/g}$, se identificó que la mezcla óptima para la extracción de astaxantina debe tener un 80 % de diclorometano y un 20 % de n-hexano, con una polaridad de 2,72. Esta combinación condujo a un rendimiento de 15,6 $\mu\text{g/g}$, superando el obtenido solo con diclorometano (14,7 $\mu\text{g/g}$). La eficacia de esta metodología radica en su capacidad para explorar de manera sistemática el espacio de diseño y brindar información detallada sobre las interacciones entre los solventes.

ABSTRACT

In this study, the Simplex Reticular Augmented (SRA) experimental design was used to fit the mathematical equation, that models the yield of astaxanthin extraction from the exoskeleton of *Litopenaeus vannamei* as a function of the proportions of dichloromethane, acetone, and n-hexane. The fitted equation, with a correlation coefficient R^2 of 0.9802, demonstrated its validity as a model for calculating extraction yield. Based on the fitted equation, an optimization region containing the six best solvent combinations was defined. This region was located at the top of the simplex, where the concentration of dichloromethane is higher and the polarity of the mixtures ranges between 1.5 and 4. It was determined that the interaction between dichloromethane and n-hexane was not significant at a significance level of 0.05. For a minimum yield of 14 $\mu\text{g/g}$, it was identified that the optimal mixture for the extraction of astaxanthin should contain 80% dichloromethane and 20% n-hexane, with a polarity of 2.72. This combination led to a yield of 15.6 $\mu\text{g/g}$, exceeding the yield obtained with dichloromethane alone (14.7 $\mu\text{g/g}$). The effectiveness of this methodology lies in its ability to systematically explore the design space and provide detailed information on the interactions between solvents.

INTRODUCCIÓN

La astaxantina es un pigmento liposoluble de color rojo intenso, con propiedades antioxidantes. Su origen natural y su amplia gama de aplicaciones en la industria alimentaria, de la salud y la belleza hacen que sea un compuesto químico versátil y valioso (Espinosa-Álvarez, Jaime-Matus, & Cerezal-Mezquita, 2019).

Químicamente, la astaxantina es un carotenoide del tipo xantófila, cuya estructura se representa en la Figura 1.

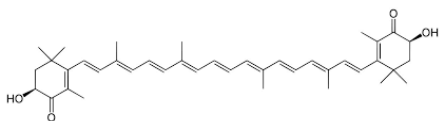


Figura 1. Estructura química de la astaxantina

La astaxantina, se produce de forma natural en una variedad de organismos marinos y de agua dulce, así como en algunas especies de hongos y bacterias. Se encuentra en mayor concentración en microorganismos como la microalga *Hematococcus pluvialis* (Aravena Contreras, 2011), que produce astaxantina

como defensa contra condiciones ambientales adversas, como la radiación ultravioleta o la falta de nutrientes. La astaxantina también se acumula en la cadena alimentaria cuando los consumidores se alimentan de organismos que la contienen, como en el caso del salmón o los flamencos que obtienen su color característico de esta sustancia (Beltrán Suito, 2021).

Además, la astaxantina se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos como camarones y cangrejos, unida específicamente a una proteína, con la que conforma la β -crustacianina (β -CR) como un complejo de 320 kDa, que contiene 16 moléculas de astaxantina con un desplazamiento batocrómico a 632 nm (Loch-Neckel, Schütz, Bianchini Derner y Lemos-Senna, 2018).

En Ecuador, la extracción de astaxantina a partir de exoesqueleto de camarón cobra importancia, ya que es

un producto de desecho que se encuentra entre el 40 % y 50 % del peso total del camarón, como cefalotórax y exoesqueleto (Herrera Andrade, Sánchez Machado, López Cervantes, Nuñez Gastelum, & Moreno Ramos, 2011). Siendo Ecuador el principal exportador a nivel mundial de camarón, la producción de astaxantina ofrece oportunidades para agregar valor a la industria camaronera. La obtención de astaxantina como un colorante funcional y subproducto de esta industria, no solo aprovecharía los recursos naturales, sino que también sería una contribución al crecimiento económico y diversificación de esta industria, con productos finales de alto valor agregado, que promuevan las prácticas sostenibles en la industria pesquera.

La extracción de colorantes naturales es un proceso crítico en la investigación química y bioquímica, donde la elección de solventes puede tener un impacto significativo en la eficiencia y la calidad de los

resultados. En este contexto, el uso del diseño experimental simplex reticular aumentado (SRA, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una herramienta valiosa para la definición de mezclas óptimas de solventes.

El diseño SRA consiste en un caso particular de los diseños experimentales de superficie de respuesta, aplicados para el estudio de mezclas. Estos diseños son útiles en los procesos de formulación de productos que están elaborados como una mezcla de dos o más componentes, donde algunas características del producto dependen de las proporciones de los componentes (Brito, 2022).

El SRA, como señalan Sánchez et al. (2021), permite explorar de manera eficiente un espacio multivariado de solventes y evaluar su impacto en la extracción de colorantes. La capacidad de analizar múltiples factores simultáneamente facilita la identificación de combinaciones de solventes que maximizan la eficiencia del proceso.

Además, el SRA proporciona información sobre posibles interacciones entre los solventes, como destacan García et al. (2019), en su estudio. Esta comprensión detallada de las relaciones entre componentes de la mezcla contribuye a la selección de combinaciones sinérgicas que mejoran la capacidad extractiva.

El aporte más significativo del SRA radica en la eficiencia en la recopilación de datos y la reducción de costos experimentales. Hernández et al. (2020) resaltan que “la minimización del número de experimentos necesarios para definir una mezcla óptima

ahorra recursos y tiempo de laboratorio, mejorando la economía experimental”. Considerando los resultados obtenidos por la investigación realizada por Sharayei, Azarpazhooh, Zomorodi, Einafshar y Ramaswamy (2021), en la que se determinó que los solventes con mayor polaridad son más adecuados para la extracción de astaxantina, así como también, el mayor tiempo de extracción, se estudió el rendimiento de la extracción de astaxantina a partir del exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus vannamei*), en función de la composición de la mezcla de solventes empleada.

MATERIALES Y MÉTODOS

La astaxantina fue extraída a partir de exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus vannamei*) previamente tratado mediante escaldado. Se extrajo cuantitativamente el pigmento mediante extracción continua en una cámara Söxleth, hasta reacción negativa de Carr-Price (Maila, 2023). Se utilizaron mezclas de solventes

seleccionados a partir de su índice de polaridad alto, medio y bajo (acetona:diclorometano:hexano), en todos los casos se consideró que los volúmenes utilizados son aditivos. La cuantificación de la astaxantina extraída se realizó mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) con las condiciones experimentales definidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales para el desarrollo cromatográfico por HPTLC

	Parámetros	Condiciones de desarrollo
Pre-secado	Tiempo	5 min
Inyección	Placa cromatográfica	Placa 0.2 mm silica gel 60 con indicador fluorescente HPTLC-Fertigplatten Nano-Adamant UV254
	Dimensión placa	10x10 cm
	Pulverización	Aire
	Volumen de jeringa	100 µL
	Volumen de inyección extracto	15 µL
	Volumen de inyección estándar	1.3, 1.7, 2.5, 3.3 y 5.0 µL
	Velocidad de inyección	150 nL/s
Control de humedad	Tiempo	10 min
	Solución	Cloruro de Magnesio (solución saturada)
	Volumen de llenado	800 mL
	Humedad relativa	33 %
Secado	Tiempo	5 min
Saturación	Almohadilla de saturación	No aplica
	Volumen fase móvil	25 mL
	Solvente	n-Hexano: Metanol: Acetona (3,2: 0,2; 0,6)
Desarrollo	Distancia de migración	70,0 mm
	Ancho de banda	6 mm
	Volumen fase móvil	10 mL
	Fase móvil	n-Hexano: Metanol: Acetona (3,2: 0,2; 0,6)
Foto-documentación	Longitud de onda	254 nm

Los resultados de la en la región experimental; que cuantificación se ajustaron corresponde a un simplex de mediante SRA a un modelo 3 dimensiones, representado matemático correspondiente como un triángulo equilátero, al rendimiento de extracción, donde los vértices corresponden

a los 3 componentes y la región interna corresponde a todas las combinaciones posibles de ellos, tal como se muestra en la Figura 2. La Figura 2, además, define 10 puntos experimentales para un SRA con y ; donde corresponde al número de componentes y al número de proporciones estudiadas. Nótese que las corridas experimentales corresponden al empleo de solventes puros y sus respectivas mezclas binarias, además de una, elaborada con los tres solventes en proporciones iguales.

Diseño simplex reticular aumentado

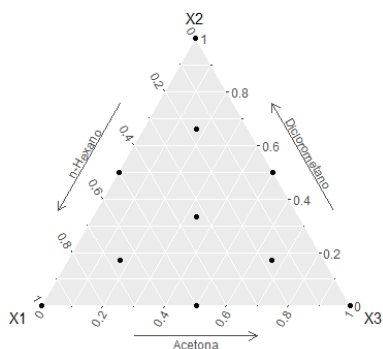


Figura 2. Región experimental para un diseño simplex reticular aumentado

Durante el proceso de extracción, se mantuvieron constantes la temperatura, tiempo, volumen de solventes de extracción, las condiciones cromatográficas de cuantificación y no se consideró la no aditividad de los volúmenes que pudiesen presentar las mezclas de diclorometano, acetona y n- hexano (Maila, 2023). Tomando en cuenta que el diseño aplicado tiene la característica de ser rotable, se realizó una única repetición en cada punto experimental, dando un total de 20 corridas experimentales. El análisis de los datos y el desarrollo del diseño se realizó en el lenguaje y entorno de computación R®Core Team (2023). El orden de las corridas experimentales fue aleatorizado con la finalidad de distribuir aleatoriamente el error experimental.

RESULTADOS

Se cuantificó astaxantina extraída de exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus vannamei*) mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPTLC; obteniéndose rendimientos de entre 14,7 – 15,6 µg/g. Para un mínimo de rendimiento de 14 µg/g, se determinó que la mezcla óptima para la extracción del colorante debe tener un 80 % de diclorometano y un 20 % de n-hexano, con una polaridad de 2,72. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo matemático

cúbico (Ecuación 1), que define la cantidad de astaxantina extraída, para los tres solventes utilizados en la investigación: diclorometano, n-hexano y acetona. Los coeficientes de regresión estimados del modelo, se presentan en la Tabla 2.

$$y=\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_4X_1X_2+\beta_5X_1X_3+\beta_6X_2X_3+\beta_7X_1X_2X_3 \quad (1)$$

X_1, X_2 y X_3 corresponden a la fracción en volumen de n-hexano, diclorometano y acetona, respectivamente.

Tabla 2. Coeficientes de regresión

Coeficientes	Valor estimado	p(p- valor)
β_1	4.417	0.0005*
β_2	14.696	< 0.0001*
β_3	3.689	0.0019*
β_4	18.192	0.0022*
β_5	12.981	0.0179*
β_6	7.916	0.1224
β_7	-91.954	0.0118*
* Estadísticamente significativos a nivel de significancia (α) de 0,05 R^2 – ajustado = 0.9802 Valor p = 2.9×10^{-11}		

A partir del modelo ajustado se construyeron los gráficos de superficie de respuesta y de contornos, correspondientes al rendimiento de la extracción en la región experimental (Figuras 3a y 3b), los mismos que permiten definir la composición de las mezclas de extracción que maximizan el rendimiento de extracción de colorante; notándose que las mezclas con una composición más alta de diclorometano presentan rendimientos de extracción más elevados.

Considerando que la polaridad de los solventes es un criterio

que define el porcentaje de extracción se analizó este parámetro para las mezclas utilizadas, determinándose que el mayor rendimiento de extracción se da cuando este parámetro se encuentra entre 1,5 y 4.

El análisis de la Figura 3 permitió determinar seis combinaciones de solventes, de las cuales la mezcla que permite la maximización de la extracción de astaxantina, corresponde a una mezcla con una composición porcentual de (80:10:10) (diclorometano:acetona:n-hexano).

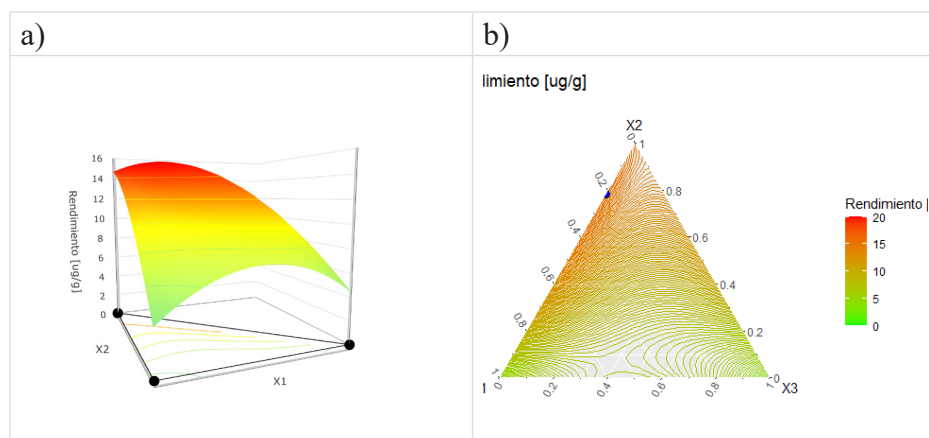


Figura 3. Superficie de respuesta y gráfica de contornos corresponden a la fracción en volumen de n-hexano, diclorometano y acetona, respectivamente

DISCUSIÓN

El modelo ajustado a partir de los datos experimentales (Ecuación 1) corresponde a un polinomio cúbico especial de Scheffé. Su forma general para una mezcla de tres componentes se muestra en la ecuación 1, donde “y” representa la cantidad en miligramos de astaxantina extraída por cada gramo de exoesqueleto de camarón; “ X_1 ”, “ X_2 ” y “ X_3 ” corresponden a la fracción en volumen de n-hexano, diclorometano y acetona, respectivamente.

Los supuestos del modelo de regresión fueron validados utilizando el test de Shapiro-Wilk ($p = 0.927$) para verificar la normalidad de los errores y el test de Breusch-Pagan ($p = 0.2$) para evaluar la presencia de heterocedasticidad en los residuos del modelo. Estos resultados indican que el modelo satisface los supuestos de regresión.

En el resumen de los coeficientes estimados que se muestra en la Tabla 2, se puede apreciar que únicamente el coeficiente que

corresponde a la interacción entre los solventes diclorometano y acetona, no fue estadísticamente significativo para un nivel de significancia de 0.05, por lo que este término se excluyó del modelo ajustado.

Los coeficientes de las otras dos interacciones binarias muestran valores positivos, lo que sugiere la existencia de un comportamiento sinérgico de los solventes en la extracción de la astaxantina (Scheffe, 1963).

A partir del modelo se construyó el gráfico de superficie de respuesta correspondiente al rendimiento de la extracción en la región experimental, tal como se muestra en la Figura 3a y su respectiva gráfica de contornos en la Figura 3b. En ambas, la sección de color rojo representa las combinaciones de los solventes que permiten un mayor rendimiento. Esta región se ubica en la parte superior de la gráfica donde la mezcla tiene una proporción mayoritaria de diclorometano.

Este comportamiento también se observa en la gráfica de efectos de los componentes de la mezcla de la Figura 4, que define que el rendimiento aumenta según aumenta la concentración de

diclorometano, mostrando que es el componente más influyente, mientras que para los otros dos componentes es preferible una concentración menor.

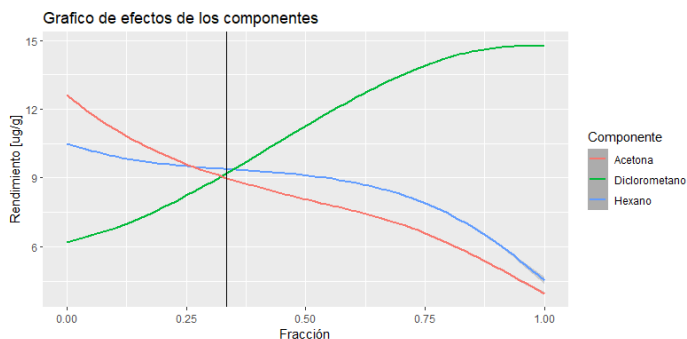


Figura 4. Región experimental para un diseño simplex reticular aumentado

Considerando que la polaridad es un parámetro importante en los procesos de extracción, se estimó la polaridad de las mezclas en la región experimental como una transformación lineal de la polaridad de los solventes

individuales y de su composición, de acuerdo con el criterio de Snyder (1974). Se graficó el rendimiento de extracción en función de la polaridad de la mezcla, obteniéndose la gráfica que se muestra en la Figura 5.

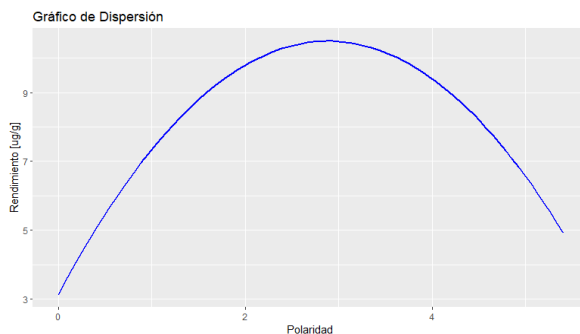


Figura 5. Polaridad de las mezclas de solventes en la región experimental

Se puede observar que la recuperación se maximiza cuando la mezcla tiene una polaridad entre 1,5 y 4, y disminuye para valores superiores. Bajo este criterio se estableció que la zona de optimización debería contemplar a aquellas mezclas que permitan por lo menos alcanzar un rendimiento de 14 $\mu\text{g/g}$. La zona de optimización en la región experimental se muestra en la Figura 6, donde se representa con un punto azul a la composición óptima del solvente que permite la máxima extracción de astaxantina, como se puede observar en el vértice correspondiente a la mezcla binaria de acetona y diclorometano.

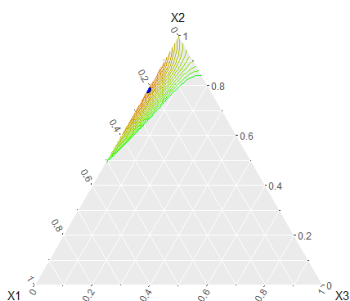


Figura 6. Gráfica de rendimiento vs polaridad. corresponden a la fracción en volumen de n-hexano, diclorometano y acetona, respectivamente

A partir de la región de optimización, se determinó la composición de las seis mejores combinaciones de los solventes, estas se muestran en la Figura 7. Donde se puede apreciar que la única combinación de los tres solventes presente en estas seis combinaciones, corresponde a una mezcla con una composición porcentual de: (80:10:10) (diclorometano:acetona:n-hexano). Todas las demás son mezclas binarias en donde la mejor combinación corresponde a una mezcla de diclorometano al 80 % y n-hexano al 20 %, siendo esta combinación inclusive mejor que el diclorometano puro. Nótese que de acuerdo con este resultado la polaridad es importante, pero no es el único factor que determina la eficiencia de una extracción.

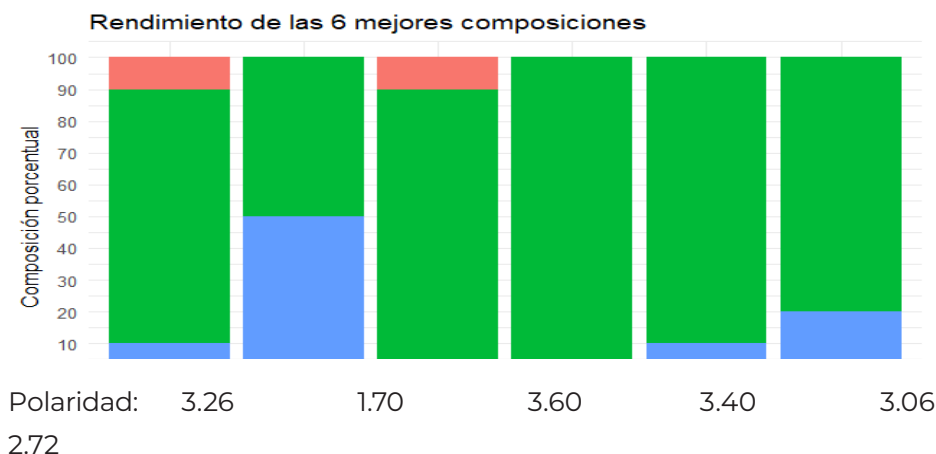


Figura 7. Zona de optimización en la región experimental

CONCLUSIÓN

La aplicación del SRA permitió ajustar la Ecuación 1 como un modelo matemático válido para calcular el rendimiento de extracción de astaxantina. La alta correlación representada por el coeficiente R^2 de 0,9802 respalda la idoneidad de este modelo para predecir el rendimiento en función de las proporciones de diclorometano, acetona y n-hexano. A través del análisis a un nivel de significancia del 0.05, se determinó que la interacción entre los solventes diclorometano y n-hexano no fue significativa. Este hallazgo

destaca la robustez del diseño experimental, proporcionando información crucial sobre la importancia relativa de cada componente en la mezcla y sus interacciones. La delimitación de la región de optimización, donde se encuentran las seis mejores combinaciones de solventes, es un hito relevante. La fijación de un mínimo de 14 $\mu\text{g/g}$ para el rendimiento facilitó la identificación de condiciones ideales. La concentración predominante de diclorometano en la parte superior del simplex y la polaridad entre 1,5 y 4 definen

claramente las condiciones óptimas. El modelo ajustado reveló que la mezcla óptima para la extracción de astaxantina debe tener una concentración del 80 % de diclorometano y un 20 % de n-hexano. Esta combinación específica, con una polaridad de 2,72, demostró ofrecer un rendimiento significativamente superior (15,6 µg/g) en comparación con el uso exclusivo de diclorometano (14,7 µg/g). La conclusión general

destaca la eficacia del diseño experimental SRA como una estrategia válida para la definición de mezclas óptimas de solventes para la extracción de colorantes. Su capacidad para explorar sistemáticamente el espacio de diseño, identificar interacciones y proporcionar información detallada resalta su utilidad en la investigación química aplicada, contribuyendo a avances significativos en la optimización de procesos.

LISTA DE REFERENCIAS

- Aravena Contreras, R. I. (2011). *Extraccion de astaxantina de Haematococcus pluvialis usando CO2 supercrítico*. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Brito, C. (2022). *Optimización multiobjetivo de una mezcla de fructosa, glucosa y sacarosa mediante un diseño de centroide simplex*. Universidad Central del Ecuador.
- Espinosa-Álvarez, C., Jaime-Matus, C., & Cerezal-Mezquita, P. (2019). Some physical characteristics of the O/W macroemulsion of oleoresin of astaxanthin obtained from biomass of *Haematococcus pluvialis*. DYNA, 136 - 142.
- García, R., et al. (2019). "Synergistic Solvent Combinations for Improved Colorant Extraction: Insights from Simplex Reticular Augmented Design." *Chemical Engineering Journal*, 42(1), 89-104.
- Hernández, M., et al. (2020). "Economic Benefits of Augmented Simplex

Lattice Experimental Design in Solvent Optimization for Dye Extraction." *Applied Chemistry*, 15(2), 201-215.

Herrera Andrade, M., Sánchez Machado, D., López Cervantes, J., Nuñez Gastelum, J., & Moreno Ramos, O. (2011). Extracción de astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 7(1), 21 - 27.

Loch-Neckel, G., Schütz, F. E., Bianchini Derner, R., & Lemos-Senna, E. (2018). Obtaining dried extracts from the biomass of the microalga *Haematococcus pluvialis* by spray drying. *Materia*, 4(23).

Maila, C. (2023). Desarrollo de un método eficiente de extracción de astaxantina procedente de exoesqueleto de camarón (*Litopenaeus vannamei*). Quito: Tesis Licenciatura.

Mongomery, D. C. (2017). Montgomery: Design and Analysis of Experiments. In John Willy & Sons.

Sánchez, A., et al. (2021). "Optimizing Dye Extraction through Augmented Simplex Lattice Experimental Design." *Journal of Chemical Engineering*, 28(3), 567-580.

Scheffe, H. (1963). The simplex-centroid design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 235 - 251.

Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S., & Ramaswamy, H. S. (2021). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*.

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-](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-)