

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**Optimización y validación de un método  
para la determinación del perfil de carotenoides  
en frutas y vegetales por  
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**Edna Issela Ramos Barrios**

**Para optar al título de**

**Química**

**Guatemala, noviembre de 1999**

**JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

<b>DECANA</b>	<b>Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Lic. Oscar Federico Nave Herrera</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Lic. Rodrigo Herrera San José</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. David Estuardo Delgado Gonzalez</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. Estuardo Solórzano Lemus</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, por darme los conocimientos básicos para desarrollarme profesionalmente.

A los Laboratorios de Bioquímica Nutricional y al de Composición de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, por darme la oportunidad de realizar en esa institución mis prácticas profesionales y posteriormente mi tesis

Al Dr. Willy Schüep y al Ing. José Murúa de Hoffman-La Roche de Suiza y Guatemala respectivamente, por proporcionarme los estándares que utilicé para validar el método de análisis.

Al Dr. Alvaro Molina por proporcionarme bibliografía valiosísima en la elaboración del trabajo.

A la Unidad de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, por permitirme utilizar su equipo y sus instalaciones para concluir la investigación.

## **DEDICATORIA**

A DIOS, que ha iluminado mi vida dándole un nuevo sentido.

A MIS PADRES, que sus sacrificios y por su apoyo.

A MIS HERMANAS, que estuvieron conmigo cuando las necesité.

A MIS ABUELOS, por sus consejos.

A TODA MI FAMILIA, por su cariño y su apoyo.

A MIS ASESORES MONICA GUAMUCH Y OMAR DARY, por su orientación.

A TODOS MIS AMIGOS.

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>I. RESUMEN</b>	3
<b>II. INTRODUCCION</b>	4
<b>III. ANTECEDENTES</b>	
<b>A. ASPECTOS GENERALES DE LOS CAROTENOIDES</b>	
1. Estructura y propiedades	5
2. Valor biológico de los carotenoides	7
3. Distribución de los carotenoides en la naturaleza	10
<b>B. METODOS DE ANALISIS DE CAROTENOIDES</b>	
1. Muestreo	11
2. Precauciones en el manejo de la muestra	12
3. Extracción	13
4. Saponificación	14
5. Separación	15
6. Identificación	21
7. Cuantificación	27
<b>IV. JUSTIFICACION</b>	28
<b>V. OBJETIVOS</b>	
<b>A. GENERAL</b>	29
<b>B. ESPECIFICOS</b>	29
<b>VI. HIPOTESIS</b>	30
<b>VII. MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>A. UNIVERSO Y MUESTRA</b>	
1. Universo	31
2. Muestra	31
<b>B. MATERIALES</b>	
1. Reactivos	31
2. Cristalería	32
3. Equipo	33
<b>C. METODOS</b>	
1. Método para determinación de carotenoides por cromatografía en columna abierta	33
2. Método para determinación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución	35
3. Método para separación y purificación de carotenoides por cromatografía en capa fina	37

<b>D. PROCEDIMIENTO</b>	
1. Purificación de patrones	38
2. Determinación de las condiciones para la cromatografía	39
3. Optimización del método	39
<b>E. VALIDACION</b>	40
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
<b>A. PURIFICACION DE PATRONES</b>	
1. Orden de elución en la columna	43
2. Espectros de absorción	44
3. Pruebas espectrofotométricas	44
4. Cromatografía en capa fina	46
<b>B. FUENTES DE CAROTENOIDES</b>	47
<b>C. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES PARA LA CROMATOGRAFIA</b>	
1. Columna	47
2. Composición de la fase móvil	48
3. Longitud de onda	48
4. Velocidad de flujo	48
<b>D. OPTIMIZACION DEL METODO</b>	48
<b>E. METODO</b>	49
<b>F. VALIDACION DEL METODO</b>	
1. Exactitud	50
2. Precisión	51
3. Linealidad, límites de detección y cuantificación	52
<b>IX. DISCUSION</b>	56
<b>X. CONCLUSIONES</b>	58
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	59
<b>XII. REFERENCIAS</b>	60
<b>XIII. ANEXOS</b>	
A. ANEXO I	65
B. ANEXO II	77
C. ANEXO III	86
D. ANEXO IV	95

## I. RESUMEN

En el presente estudio se logró optimizar y validar un método para determinar el perfil de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. Los carotenoides que se incluyeron en el estudio son los que se encuentran en mayor cantidad en los alimentos y por lo tanto, los que tienen mayor importancia como provitamina A y como antioxidantes. Siendo estos luteína, zeaxantina, -criptoxantina, licopeno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos.

Para obtener los patrones utilizados en calibraciones y cuantificaciones, se recurrió tanto a patrones comerciales (algunos de ellos fueron proporcionados por Sigma Chemicals), como a patrones aislados en el laboratorio por cromatografía en columna abierta. Los alimentos que proporcionaron mayores cantidades de carotenoides para aislar patrones, fueron: espinaca, papaya y zanahoria.

Para realizar el análisis en HPLC, no fue posible lograr la separación entre luteína y zeaxantina; esto no se considera una desventaja del método, ya que estos carotenoides solo se encuentran juntos en maíz y durazno (Mangels *et al.*, 1993). Sin embargo, fue necesario rechazar la hipótesis planteada que mencionaba la separación y cuantificación de los seis carotenoides. Para reportar, se indica como luteína + zeaxantina, pero se cuantifica solamente como luteína.

Los porcentajes de recuperación oscilan entre 85 y 106% para vegetales y entre 71 y 87% para frutas. La reproducibilidad se verificó al obtener porcentajes de variación entre el 4 y el 20% para los carotenoides. La sensibilidad del método indica que los límites de detección van de 0.0018 a 0.0089 mg/100 g de alimento, y los límites de cuantificación están entre 0.019 y 0.12 mg/100 g de alimento.

## II. INTRODUCCION

Los carotenoides son compuestos liposolubles, altamente insaturados que se encuentran en vegetales amarillos y anaranjados, y en hojas verdes. Sus funciones más conocidas de importancia humana son la actividad como provitamina A de algunos de ellos, y sus propiedades antioxidantes.

Desde principios del siglo, se han estudiado métodos para la separación e identificación de carotenoides. Debido a las características especiales de estos, los métodos que se han planteado para su análisis son largos y costosos, además que, con frecuencia tienen errores que llevan a resultados falsos, tanto cuali- como cuantitativamente. Otro problema que se presenta al trabajar con carotenoides es el de los patrones, que comercialmente son poco accesibles, y después de preparados se degradan rápidamente.

En los últimos años, el estudio de los carotenoides ha cobrado importancia por las diferentes funciones que tienen en el organismo, y en algunos casos, por su aplicación industrial. Por ello se hace necesario el planteamiento de un método que pueda cuantificar los principales carotenoides encontrados en vegetales y frutas, de una forma rápida y a un costo relativamente bajo.

En éste trabajo se pretende aislar patrones de carotenoides y montar un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permita la cuantificación rápida de dichos compuestos. Dicho método se validará según los parámetros establecidos para el caso: porcentaje de recuperación, linealidad, límites de detección y cuantificación y reproducibilidad.

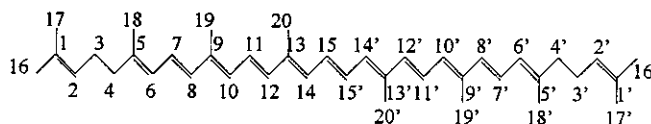


### III. ANTECEDENTES

#### A. ASPECTOS GENERALES DE LOS CAROTENOIDES

##### 1. Estructura y Propiedades

Los carotenoides son compuestos que consisten en ocho unidades isoprenoideas, arreglados de tal forma que las unidades isoprenoideas se unen cola con cola en el centro de la molécula (Clydesdale, 1976). La estructura básica de los carotenoides corresponde a la fórmula  $C_{40}H_{56}$ , que corresponde al polieno acíclico licopeno (Tee, 1992). La numeración de los carbonos se muestra en la **FIGURA I** y se basa en la simetría de la molécula, teniendo números duplicados y a los de la derecha se les agrega apóstrofe



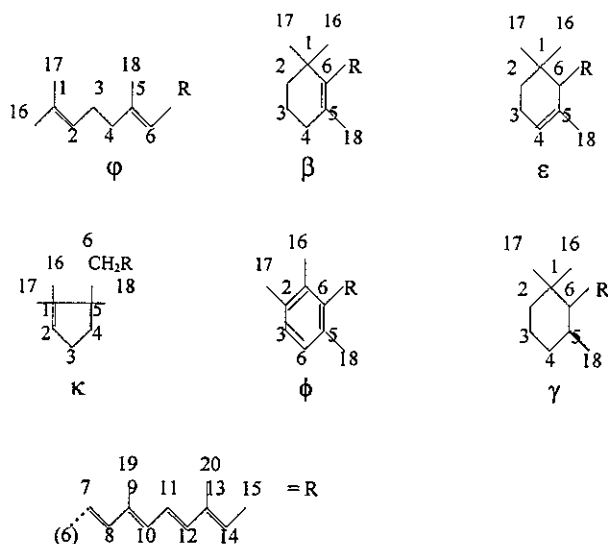
**FIGURA I:** Estructura del licopeno.

Basados en la estructura del licopeno, los diferentes carotenoides se forman por cambios en los extremos de su estructura, como hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, inserción de oxígeno en diferentes formas, migración del doble enlace, migración de grupos metilo, alargamiento o disminución de la cadena (Tee, 1992).

Químicamente, los carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos, y derivados oxigenados.

##### a. Carotenos:

Son cadenas hidrocarbonadas que se diferencian en su estructura final. Se nombran como *carotenos* y se les antepone una letra griega ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\kappa$ ,  $\psi$ ,  $\gamma$ , etc) según su estructura. En la **FIGURA II** se muestran los grupos finales que pueden contener los carotenos.



**FIGURA II:** Grupos finales presentes en los carotenoides.

b. Derivados oxigenados de los carotenos:

Se les conoce con el nombre de xantofilas, aunque algunos autores consideran a las xantofilas solamente como los hidroxiderivados (Rodríguez-Amaya, 1989). Las funciones oxigenadas pueden ser ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas, hidroxilos y epóxidos.

Según las modificaciones que sufra el esqueleto hidrocarbonado, pueden nombrarse como:

- *Retro*-carotenoides: Son carotenoides en los que todos los enlaces simples y dobles se mueven una posición (Tee, 1992).
- *Seco*-carotenoides: Se da por la fisión de un enlace entre dos átomos adyacentes (excepto 1 y 6) de un ciclo terminal, con adición de átomos de hidrógeno y sin pérdida de átomos de carbono (Tee, 1992).
- *Apo*-carotenoides: Se forman por la remoción de fragmentos del esqueleto carbonado en uno o ambos lados de la molécula, el prefijo *apo* se coloca antes del número del átomo de carbono a partir del cual todo el resto de la molécula ha sido removido (Tee, 1992).
- *Nor*-carotenoides: Se da por la remoción de átomos de carbono por un proceso que rompe un doble enlace (Tee, 1992).

En el **CUADRO I** del Anexo I, se encuentran las estructuras de los principales carotenoides encontrados en alimentos (Davies, 1976).

Debido al alto grado de insaturación, los carotenoides son inestables, especialmente a la luz, el calor, oxígeno, ácidos, y en algunos casos, a los álcalis (Davies, 1976).

En la naturaleza, los carotenoides se encuentran principalmente en su forma *todo-trans*. Sin embargo, la isomerización a forma *cis* se da fácilmente durante el procesamiento de los alimentos (Rodríguez-Amaya, 1989). El  $\gamma$ -caroteno, licopeno, neurosporeno y  $\zeta$ -caroteno, que tienen estructuras lineales, pueden encontrarse naturalmente como isómeros *poli-cis* (Davies, 1976).

La isomerización de *todo-trans* a *cis*, puede ser inducida por calentamiento, tratamiento con ácidos, y exposición a la luz, especialmente a luz solar o luz ultravioleta, y puede llegar hasta la degradación de los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1989).

Los carotenoides son liposolubles y contribuyen a la coloración de muchas plantas y algunos productos animales. Pueden encontrarse libres en los tejidos vegetales como cristales o sólidos amorfos, o en un medio graso. Pueden encontrarse también como ésteres o en combinación de azúcares y proteínas (Clydesdale, 1976).

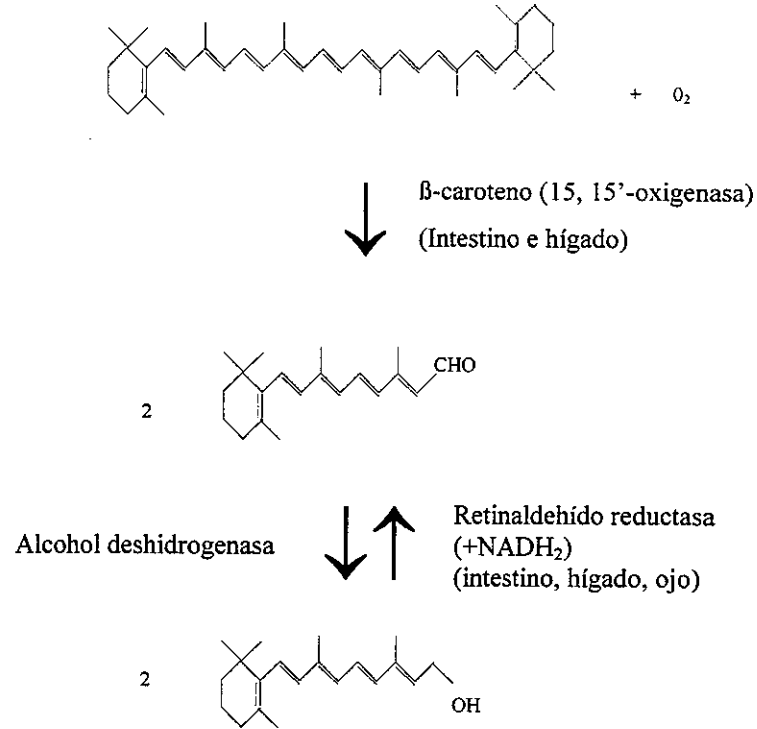
## 2. Valor biológico de los carotenoides

### a. Función provitamina A

El término vitamina A se ha utilizado para identificar al retinol (alcohol primario insaturado  $C_{20}H_{29}OH$ ), que como tal o en forma de aldehído (retinal) o de ácido (ácido retinoico) se encuentra involucrado en varios procesos fisiológicos, como por ejemplo la visión. Los ésteres de retinilo también se identifican como vitamina A, estos pueden ser consumidos como tales y se hidrolizan en el organismo por vías metabólicas (Rodríguez-Amaya, 1989).

Para que un carotenoide tenga actividad provitamina A, es necesario que tenga por lo menos la mitad de una molécula de  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno es capaz de producir dos moléculas de retinol, por medio de un rompimiento enzimático de su enlace central. Las reacciones involucradas se muestran en la **FIGURA III**.

Además del  $\beta$ -caroteno otros precursores de vitamina A, son:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno,  $\tau$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. Por esta característica, el estudio de los carotenos cobra importancia para ayudar a resolver el problema de deficiencia de vitamina A, principalmente en países en desarrollo (Rodríguez-Amaya, 1989).



**FIGURA III:** Mecanismo de conversión del  $\beta$ -caroteno en retinol.

En el **CUADRO II** del Anexo I, se muestra la actividad de vitamina A de algunos carotenoides comunes.

La unidad más utilizada actualmente para expresar la cantidad de vitamina A es el equivalente de retinol (ER), que corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de retinol, equivale también a 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno y a 12  $\mu\text{g}$  de otros carotenoides con actividad de provitamina A. Sin embargo, los últimos dos datos están en proceso de revisión.

La función de la vitamina A en el proceso de la visión es intervenir en la formación de los pigmentos que se encuentran en las células receptoras del ojo (Tee, 1992). Otra función de la vitamina A es en la diferenciación celular, este mecanismo no se conoce exactamente, pero se ha planteado una hipótesis, según la cual cada núcleo celular tiene por lo menos un receptor de ácido retinoico, que interactúa con la hormona responsable de la diferenciación genética (Olson, 1990).

Además, la vitamina A está relacionada con otros procesos fisiológicos, como el desarrollo fetal, la respuesta inmunológica, el apetito y el crecimiento. Estos procesos dependen directa o indirectamente de la diferenciación celular (Olson, 1990).

### b. Síntomas de deficiencia de vitamina A, y fuentes naturales

La deficiencia de vitamina A es uno de los mayores problemas de salud pública en países en desarrollo y se ha estimado que cada año, aproximadamente 500,000 niños pierden la vista por ésta causa. Los signos de deficiencia de vitamina A son ceguera nocturna (se manifiesta como dificultad para adaptar la visión a la oscuridad) y varios grados de xeroftalmía (se manifiesta por sequedad en el ojo, producida por la queratinización del tejido epitelial de la cornea). También puede darse una hiperqueratosis folicular. El indicador clínico más utilizado para determinar la deficiencia de vitamina A es la aparición de manchas de Bitot en la conjuntiva del ojo, que son células queratinizadas que han reemplazado las células normales del tejido epitelial (Olson, 1990).

La deficiencia de vitamina A es comúnmente asociada con baja ingesta de proteínas-calorías y grasa, mala absorción y enfermedades respiratorias.

Los requerimientos de vitamina A se definen por medio de varios conceptos (FAO/WHO, 1988):

- El *requerimiento basal* es la mínima cantidad necesaria diariamente para prevenir la aparición de síntomas clínicos de deficiencia (ceguera nocturna y lesiones en tejidos de la conjuntiva y córnea del ojo, y crecimiento normal).
- El *nivel seguro de ingesta* es el nivel apropiado de ingesta, tanto para mantener la salud como para mantener la reserva apropiada.

En el **CUADRO III** del Anexo I, se encuentran los requerimientos de vitamina A, por edades (FAO/WHO, 1988).

Las principales fuentes de vitamina A preformada son hígado, pescado, leche y sus derivados. De provitaminas A son las frutas, vegetales amarillos, anaranjados y las hojas verdes (FAO/WHO, 1988).

### c. Otras funciones de los carotenoides

Los carotenoides, además de actuar como precursores de vitamina A, funcionan como antioxidantes, debido a su larga cadena de insaturaciones. Esta característica ha incentivado la realización de estudios epidemiológicos, algunos de los cuales han mostrado una relación inversa entre el riesgo de cáncer y el consumo de alimentos que contienen carotenoides. Experimentos realizados muestran la inhibición de la células cancerígenas por tratamiento con  $\beta$ -caroteno (Bushway, 1985). Se reporta también que el licopeno tiene mayor eficiencia como antioxidante (Di Mascio, Murphy & Sies, 1992). Utilizando modelos animales se ha identificado que los carotenoides no previenen la formación de tumores inducidos, pero retardan su tiempo de aparición y crecimiento (Krinsky, 1989).

### 3. Distribución de los carotenoides en la naturaleza

En general, en las plantas superiores la mayoría de carotenoides se encuentran en la grana de los cloroplastos de los tejidos verdes, probablemente en forma de cromoproteínas. En las hojas verdes los carotenoides principales son la luteína y el  $\beta$ -caroteno. Algunos estudios que se han realizado muestran que las plantas sintetizan los carotenoides rápidamente durante su crecimiento; así, el máximo período de crecimiento corresponde a la máxima concentración de carotenoides (Goodwin, 1965).

Algunas flores contienen carotenoides, principalmente xantofilas, en los pétalos y los tejidos reproductivos (polen y anteras). La presencia de carotenoides en frutas puede darse en los cromoplastos, como es el caso de la manzana y la pera. Otras frutas, como el tomate, presentan precursores de carotenoides, como fitoeno, fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y neurosporeno, otros sintetizan caroteno y sus derivados, o carotenoides epóxidos. Las raíces que tienen mayor contenido de carotenoides son la zanahoria y el camote; en ambas, el carotenoide principal es el  $\beta$ -caroteno (Goodwin, 1965).

En las tablas de composición de alimentos realizadas en los años sesenta se listan los contenidos de carotenos, sin embargo, la mayoría de esta información fue obtenida con el método general de carotenoides totales de la Asociación de Químicos Analíticos (Association of Analytical Chemists, AOAC, 1984). Con el desarrollo de nuevas técnicas analíticas se han podido determinar con mayor exactitud los contenidos de varios carotenoides en vegetales y frutas. Un trabajo realizado por Mangels *et al.*, en 1993, reúne y evalúa los datos de 180 artículos publicados desde 1971 a 1991. La evaluación se llevó a cabo basándose en la metodología utilizada; el método y los parámetros utilizados para la validación del mismo; el número, recolección y homogeneización de las muestras. Los resultados dan un valor máximo y mínimo para el contenido de cinco carotenoides ( $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, luteína + zeaxantina, y licopeno) en vegetales y frutas (Mangels *et al.*, 1993).

En el artículo mencionado reportan el contenido combinado de luteína y zeaxantina, debido a que son difíciles de separar por HPLC, que es la técnica más utilizada actualmente. Además, la mayoría de los vegetales no contienen zeaxantina. Los duraznos y el maíz sí contienen ambos carotenoides en diferentes proporciones (Mangels *et al.*, 1993).

En el CUADRO IV del Anexo I, se listan algunos alimentos con sus contenidos de carotenoides.

## B. METODOS DE ANALISIS DE CAROTENOIDES

El método de la AOAC para determinar el contenido de provitamina A, introducido en 1955, comprende la extracción de los carotenoides con una mezcla de acetona/hexano. El extracto se lava con agua para eliminar acetona y luego se pasa por una columna de MgO:Hyflosuper cel (1:1). Los carotenoides se eluyen con una mezcla acetona/hexano y se mide su absorbancia a 436 nm, expresando el resultado como  $\beta$ -caroteno (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

A pesar de que el método es bastante sencillo, no es apropiado para la determinación de carotenoides en alimentos, ya que se asume que la fracción obtenida en la columna es  $\beta$ -caroteno, y en realidad puede contener carotenoides menos activos como  $\alpha$ - y  $\gamma$ - caroteno,  $\alpha$  y  $\beta$ -criptoxantina; así mismo puede contener carotenoides inactivos, como  $\zeta$ - y  $\delta$ -carotenos,  $\alpha$ -zeacaroteno o zeinoxantina; lo que hace que el valor de  $\beta$ -caroteno sea sobrestimado. Otras fuentes de error son: que el método indica una cantidad fija de solvente para la extracción, lo cual no es correcto pues se debe utilizar solvente hasta que el extracto sea incoloro. Además, la absorbancia se lee a 436 nm, que no es el máximo de absorción del  $\beta$ -caroteno (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

Debido a estas consideraciones, se han planteado varios métodos para la determinación de carotenoides en alimentos que buscan mejorar las deficiencias del método oficial.

A continuación se detallan los pasos a seguir para el análisis de carotenoides en alimentos:

### 1. Muestreo

Para realizar un muestreo en alimentos, para cualquier tipo de análisis y especialmente el de carotenoides, es necesario tomar en consideración varios factores que hacen variar la composición del alimento, como son el tipo de cultivo, el estado de maduración, la composición del suelo, el clima, la parte de la planta utilizada, la duración de la post-cosecha, las condiciones de almacenamiento, y otros. En ello reside la importancia de un muestreo estadísticamente diseñado para que los datos sean confiables (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

En las plantas se ha encontrado variabilidad en una misma especie, por lo que se recomienda obtener cinco muestras separadas de cada planta, cada una de una fuente distinta para alcanzar un valor representativo (Latinfoods, 1986).

Las muestras colectadas se deben pesar tal y como se colectan, luego se selecciona la parte comestible, se lava, y se pesa nuevamente, de ésta forma se calcula el porcentaje de desecho. La muestra debe identificarse con los

datos siguientes: lugar y fecha de la recolección de la muestra, nombre común, clasificación taxonómica, parte de la planta colectada, peso de la muestra y peso de la parte comestible.

## 2. Precauciones en el manejo de la muestra

Una vez colectada la muestra, hay que mantener ciertas precauciones en su manejo para evitar degradaciones e isomerizaciones.

a. Es recomendable que el laboratorio se encuentre equipado con lámparas de luz amarilla, o filtros de luz difusa que bajen la intensidad de la luz natural (Davies, 1976).

b. Los carotenoides sufren degradación por el calor, por lo cual, hay que evitar exposiciones prolongadas al mismo. Durante las extracciones y separaciones por cromatografía, se utilizan solventes que luego es necesario eliminar; por ello se recomienda el uso de solventes de bajo punto de ebullición, y evaporar a presión reducida. Aún así, no es recomendable llegar a temperaturas mayores de 40°C (Davies, 1976).

c. Debido a la susceptibilidad de los carotenoides a ser oxidados, se recomienda trabajar en atmósferas inertes (nitrógeno); sin embargo, por a la dificultad que esto presenta, se ha optado por el uso de antioxidantes (Davies, 1976). Entre los antioxidantes más utilizados en el análisis de carotenoides, están etoxiquina, pirogalol, ácido ascórbico, ascorbato de sodio e hidroquinonas (como el TBHQ y BHT), que se adicionan en diferentes pasos del análisis a los solventes, a los patrones, durante la saponificación, etc (Tee & Lim, 1991).

Un ejemplo de la alteración de la estructura por causa del oxígeno, con la luz como catalizador es el llamado ciclo de la violaxantina (Goodwin, 1965):



d. Se deben utilizar solventes cuya calidad indique que no contienen ácidos, y adsorbentes tratados para eliminar ácidos (Davies, 1976).



e. Es importante que los solventes a utilizar sean destilados, secados con sodio o con aleación sodio-plomo y luego redestilados para asegurarse que no contienen impurezas que puedan interferir en el análisis (Davies, 1976).

f. Idealmente, los carotenoides se deben guardar en forma cristalina, o, de ser necesario, disueltos en un solvente apropiado (como éter de petróleo redestilado). Ambas formas de almacenamiento, deben hacerse en la obscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno y a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Davies, 1976).

Un índice de la descomposición de carotenoides es la aparición de isómeros *cis* y derivados epoxi de los carotenoides presentes en la muestra (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

### 3. Extracción

Debido a que los carotenoides se encuentran distribuidos en diferentes tipos de tejidos, es difícil encontrar un método de extracción común. Las muestras deben ser analizadas frescas y si no es posible, se pueden guardar a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Las muestras también se pueden liofilizar, aunque este procedimiento no es recomendado, pues da lugar a pérdidas de carotenoides (Davies, 1976).

Los tejidos frescos contienen un alto porcentaje de agua, por eso el solvente orgánico utilizado para la extracción debe ser miscible con agua (acetona, etanol, metanol, por ejemplo). En muestras que han sido liofilizadas se pueden utilizar solventes no miscibles con agua, como éter dietílico. Cuando se extrae con acetona, es importante eliminarla antes de la saponificación, pues la presencia de acetona y carotenales en medio alcalino, dan lugar a condensaciones aldólicas (Davies, 1976).

La cantidad de muestra a utilizar varía dependiendo del contenido de carotenoides. Para vegetales de hojas verdes se utiliza de 2 a 5 g y para raíces y frutas de 10 a 40 g. Cuando se trabaja para aislar patrones por el método de cromatografía en columna abierta, se reporta el uso de hasta 80 g de muestra (Adewusi & Bradbury, 1993).

Para la extracción, el material se corta en trozos pequeños y se homogeneiza con acetona fría por uno o dos minutos, con una batidora eléctrica. Se adiciona celite como ayuda filtrante. Para aumentar la extracción se puede colocar la muestra picada en acetona fría por veinte minutos antes de llevarla a la batidora eléctrica. Algunos tejidos como calabaza y maíz pueden ser homogeneizados con pequeñas cantidades de agua previo a la extracción (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). El extracto se pasa por un filtro de vidrio de porosidad 3 (poro entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ ) a presión reducida, y el residuo es extraído nuevamente, hasta que el filtrado sea incoloro. El volumen

de extracción puede reducirse haciendo una extracción final con éter de petróleo en los extractos en acetona, que ya han eliminado el agua de la muestra (Davies, 1976). Se han realizado estudios agregando antioxidantes y neutralizantes para realizar la extracción, pero las diferencias en el contenido de carotenoides no son significativas (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988).

El extracto se transfiere por fracciones a una ampolla de separación que contenga éter de petróleo. Se agrega agua o solución diluida de cloruro de sodio hasta separar la fase acuosa y la orgánica; en ésta última se encontrarán los carotenoides. Si en la extracción se usó éter y acetona, no es necesario agregar más éter (Davies, 1976). Es importante agregar el extracto por pequeñas fracciones y adicionar suficiente agua, para evitar la formación de emulsiones que llevan a la pérdida de carotenoides en la fase acuosa (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Si el extracto se adiciona en una sola fracción, es necesario reextraer la fase acuosa con éter de petróleo y combinar los extractos (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988). Se usa cloruro de sodio para evitar la formación de emulsiones; si éstas se formaran también pueden deshacerse adicionando etanol. Luego de transferir el extracto al éter, se lava cuatro o cinco veces con agua, para remover la acetona. El extracto se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra para la saponificación (Davies, 1976).

Para facilitar el procesamiento de la muestra, se ha planteado el uso de tetrahidrofurano estabilizado con BHT, como solvente de extracción. El tetrahidrofurano solubiliza los carotenoides y xantofilas, y desnaturaliza los complejos que forman con las proteínas, previniendo la formación de emulsiones. El uso del tetrahidrofurano se debe combinar con un solvente que extraiga la humedad de la muestra, para lo cual el metanol ha probado ser muy eficaz. Se recomienda entonces utilizar metanol seguido de tetrahidrofurano, o una combinación de ambos (Scott, 1992).

#### **4. Saponificación**

La saponificación es necesaria para eliminar material graso que pueda interferir en la cromatografía de adsorción e hidrolizar los ésteres de carotenoides, que disminuirían el resultado final de la cuantificación de carotenoides libres (Davies, 1976).

Para saponificar el extracto se disuelve en alcohol (metanol o etanol) y luego se agrega KOH. Cuando el extracto no se solubiliza en alcohol, se puede utilizar benceno o éter de petróleo y luego se agrega la solución alcohólica de KOH. El extracto puede dejarse en reposo en la obscuridad o calentarse para acelerar la reacción. Para eliminar el álcali, toda la mezcla de saponificación se transfiere por fracciones, a una ampolla de separación

conteniendo éter de petróleo, y se lava con agua destilada hasta que los lavados sean neutros. Si se forma emulsión, se puede romper con unos mililitros de etanol o de solución diluida de cloruro de sodio (Davies, 1976).

En un estudio realizado por Rodríguez-Amaya y colaboradores, donde se comparan 3 métodos de saponificación: [1] KOH en metanol al 10%, [2] KOH en etanol al 60%, y [3] el método propuesto por la AOAC (1984): extraer con una mezcla hexano:acetona:etanol:tolueno 10:7:6:7 y adicionar KOH al 40% en metanol; todos los métodos se probaron a temperatura ambiente y calentando la mezcla en baño de agua. Según los resultados obtenidos, hay una pérdida de 0 a 3% al saponificar con KOH en metanol al 10% a temperatura ambiente, sin embargo se observa menos pérdida de carotenoides en comparación con el método de KOH en etanol al 60%. Es importante notar que con el método AOAC hay pérdidas hasta del 100% debido a que la presencia de acetona promueve condensaciones aldólicas e isomerizaciones. En conclusión, el aumento de la temperatura y/o de la concentración de KOH aumentan la descomposición de carotenoides, así como la presencia de acetona (Kimura, Rodríguez-Amaya & Godoy, 1990).

Según otros estudios, no hay diferencia significativa entre muestras saponificadas y no saponificadas de vegetales. En el caso de las frutas, la saponificación es absolutamente necesaria, puesto que las xantofilas frecuentemente se encuentran esterificadas (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988).

## 5. Separación

La cromatografía preparativa de adsorción es la técnica más importante en el aislamiento de los carotenoides, que puede referirse a cromatografía en columna, en capa fina, en papel o líquida de alta resolución (HPLC) (Davies, 1976).

### a. Cromatografía en columna

Es el método clásico para determinación de carotenoides en alimentos. El material adsorbente más utilizado es MgO:Hyflosuper cel activado en varias proporciones, la más utilizada es 1:1. La sílica gel no es recomendada por su acidez inherente, que puede causar degradación o isomerización en los carotenoides (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Debido a que, por el tamaño de partícula, las bandas se deforman y dificultan la separación, casi no se utiliza alúmina como fase estacionaria (Davies, 1976).

Para el empaque de la columna se coloca un tapón de lana de vidrio en el fondo de la columna y después se llena con el adsorbente hasta una altura de 15 cm. Se aplica vacío a la salida de la columna a la vez que se presiona

en la parte de arriba con un instrumento plano hasta disminuir la altura a 10 cm. Luego se adiciona aproximadamente 1 cm de sulfato de sodio anhidro (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

La mezcla de carotenoides se coloca en la parte de arriba de una columna, previamente acondicionada con éter de petróleo y se desarrolla con mezclas de solventes de polaridad creciente (1%, 3%, 5%, 10%, y mayores de éter dietílico o acetona en éter de petróleo). Cada fracción recolectada es evaporada, redisuelta en un pequeño volumen de solvente e identificada por cromatografía en capa fina, espectrofotometría y técnicas similares (Davies, 1976).

La separación de los carotenoides puede observarse por la separación de bandas coloreadas. Los adsorbentes encontrados comercialmente suelen variar su capacidad de adsorción y la más pequeña cantidad de impurezas puede alterar el poder de elución del solvente; por ello, se deben ensayar diferentes proporciones de solventes cada vez que se utilice un lote nuevo de adsorbente o que se tenga un analito diferente (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

Respecto a la mezcla de MgO:Hyflosuper cel, se puede aumentar su capacidad de adsorción activándola a 110°C durante 4 h, o se puede disminuir, elevando la proporción de Hyflosuper cel. Para aumentar la separación entre bandas, se aumenta el volumen de los solventes iniciales (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Con estas condiciones, el coeficiente de variación en el método es alrededor de 10% entre muestras, y el porcentaje de recuperación es mayor del 97% (Rodríguez-Amaya, 1989).

Para purificar las fracciones obtenidas, se utiliza la recromatografía (repetir la cromatografía en columna), que se puede llevar a cabo con columnas de hidróxido de calcio o alúmina en diferentes grados de activación. Un ejemplo de una elución con una columna de alúmina (grado III, 6% de agua) (Davies, 1976):

100% de éter de petróleo (P)	Hidrocarburos y carotenos
1% de éter dietílico (E) /P	Carotenos más polares
5% E/P	Epóxidos de carotenoides
20% E/P	Esteroles
30 - 50% E/P	Carotenoides monohidroxilados
100% E ó 5% etanol/E	Carotenoides polihidroxilados

Los carotenoides monohidroxilados se separan con alúmina, carbonato de calcio y óxido de magnesio. Las xantofilas requieren un adsorbente más fuerte, como celulosa. La sílica gel es más recomendada para separaciones preliminares, donde los compuestos difieren mucho en su polaridad (Davies, 1976).

La recromatografía se puede llevar a cabo también en columnas de MgO:Hyflosuper cel (1:2) activado y eluir con un solvente apropiado (Adewusi & Bradbury, 1993).

Para la separación de isómeros, las fracciones se cromatografían individualmente en columnas de  $\text{Ca(OH)}_2$ , o en una columna formada por 3 cm de  $\text{Ca(OH)}_2$  y 7 cm  $\text{Mg(OH)}_2:\text{Ca(OH)}_2$  1:6 y desarrollados con proporciones desde 0.5% de p-metilanisol en éter de petróleo, aumentando gradualmente la concentración del p-metilanisol hasta eluir todos los carotenoides (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

Los isómeros *cis* y *todo-trans* de xantofilas pueden ser separados en columnas de carbonato de cinc, desarrolladas con 30% de acetona en éter de petróleo. Los isómeros *cis* y *todo-trans* de carotenos pueden ser separados en columnas de hidróxido de calcio y celite (1:1) y desarrollada con concentraciones de 0-10% de acetona en éter de petróleo (Davies, 1976).

En un estudio realizado para comparar los resultados obtenidos por cromatografía en columna abierta, con los de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha podido observar que las fracciones en columna abierta no tienen una separación adecuada, lo cual afecta considerablemente las bandas de carotenoides contenidos en pequeñas cantidades, cuyas bandas son difíciles de observar y por lo tanto no se colectan o se colectan contaminadas y/o incompletas. Además, se ha notado que las fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta contienen impurezas que son alrededor de un 10% del total en los carotenoides más abundantes. El estudio concluye que la cromatografía en columna abierta es apropiada para la cuantificación de los carotenoides que se encuentran en mayor proporción (Adewusi & Bradbury, 1993).

#### b. Cromatografía en capa fina

Las aplicaciones principales de la cromatografía en capa fina en el análisis de carotenoides permiten

- efectuar un examen preliminar de la muestra, que puede ayudar a elegir la fase estacionaria en la cromatografía en columna,
- purificar los carotenoides, en pequeña escala,
- identificar de los carotenoides basados en su *R<sub>f</sub>*.

La preparación de las placas depende del uso que se les va a dar (preparativa o analítica); el adsorbente más utilizado es sílica gel y se le puede adicionar antioxidantes, o prepararlo en una solución al 3% de KOH, para disminuir la acidez de la sílica gel (Davies, 1976). Para cromatografiar carotenos y carotenoides mono- y diol, se utilizan placas de  $\text{Ca(OH)}_2$ :sílica gel, mientras que para los polioles, se utilizan placas de sílica gel solamente (Tee & Lim, 1991).

La detección de los carotenoides en cromatografía en capa fina es fácil debido a que son coloreados y no necesitan de ningún revelador, sin embargo, se decoloran fácilmente. Por ésta misma razón, si se realiza cromatografía preparativa es necesario retirar rápidamente los pigmentos del adsorbente con solventes adecuados (Davies, 1976).

#### c. Cromatografía de adsorción en papel

Se han utilizado muchos tipos de papel como adsorbente, como los impregnados con sílica gel, óxido de aluminio, hidróxido de aluminio o carbonato de cinc. Se utilizan después de haber sido activadas a 105-150°C (Davies, 1976).

El desarrollo de la cromatografía puede llevarse a cabo tanto en forma ascendente, como radial. En comparación con la cromatografía en capa fina, la cantidad de muestra que se necesita y los tiempos de desarrollo son similares; sin embargo, la recuperación es mayor en papel y los *R<sub>f</sub>*s obtenidos son más reproducibles; pero la cromatografía en capa fina permite mejor resolución y es más versátil debido a que hay una mayor variedad de adsorbentes disponibles (Davies, 1976).

#### d. Cromatografía líquida de alta resolución

Las ventajas que presentan los métodos de HPLC son: rapidez, simplicidad, reproducibilidad, exactitud, separación eficiente, sensibilidad y menor exposición al oxígeno, luz, adsorbente y solvente. (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Sin embargo su principal limitante es el alto costo del equipo y los solventes utilizados.

La separación de carotenoides por HPLC fue reportada por primera vez en 1970, cuando a un sistema de columna abierta se le aplicó gas nitrógeno a presión, para reducir la exposición al oxígeno. Más tarde se empezaron a proponer métodos utilizando fase normal, con MgO o sílica en la columna, pero el MgO no es suficientemente estable en una columna para HPLC, y la sílica promueve la degradación de los carotenoides en la columna (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). También se utilizaron otros adsorbentes como ZnCO<sub>3</sub>, pero el análisis duraba 5 horas, eluyendo primero los carotenos y luego las xantofilas (Craft, 1992).

La mayor parte de los métodos utilizan fase reversa para la cuantificación, donde las fases estacionarias son polímeros, que poseen enlaces con cadenas hidrocarbonadas de octil u octadecil (Craft, 1992). Antes de colocar la columna, se coloca una precolumna, que contiene el mismo material de empaque de la columna, pero el tamaño de la partícula es mayor; se utiliza para atrapar contaminantes y para proteger la columna (Tee & Lim, 1991). Las fases

móviles más comunes son combinaciones de acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, metanol y hexano utilizados isocráticamente (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Al contrario de la fase normal, los carotenos son retenidos con mayor fuerza (Craft, 1992). Algunas de las ventajas de la fase reversa, es que el empaque de las columnas no es sensible a la humedad; se equilibran rápidamente después de ser utilizadas con diferentes proporciones de solventes; son compatibles con la mayoría de solventes; abarca todo el rango de polaridad de los carotenoides y son comercialmente accesibles. Es necesario notar que no todos los empaques C<sub>18</sub> son iguales, se diferencian en tamaño y forma de partícula, diámetro del poro, recubrimiento superficial, y los enlaces monómeros o polímeros de la fase estacionaria, que son factores que afectan la separación (Craft, 1992).

En las columnas usualmente se utilizan partículas de 3 a 10 µm. Las ventajas de un reducido tamaño de partícula son una alta eficiencia y menor consumo de solvente, sin embargo, presentan la desventaja de que disminuye la vida útil de la columna, a menos que se utilice una precolumna. En cuanto a la forma de la partícula, se utilizan de preferencia partículas esféricas y no irregulares, ya que proporcionan mayor reproducibilidad (Craft, 1992).

Respecto al tamaño del poro y al recubrimiento superficial no hay muchos estudios, pero generalmente se utilizan columnas con alto recubrimiento superficial pues aumenta los tiempos de retención (Craft, 1992)

Otro factor muy importante es la forma en que se sintetizan los enlaces C<sub>18</sub> en la sílica. Según algunos estudios, se obtienen mejores resultados con la fase polimérica, pero presenta algunas desventajas como que la fase móvil debe ser metanol en más de un 90%, lo que limita la solubilidad de algunos compuestos (Craft, 1992). Sin embargo, con las fases poliméricas se obtienen mejores separaciones, principalmente entre luteína y zeaxantina, en comparación con las fases intermedias y monoméricas (Epler, 1992).

Se ha observado también, que el porcentaje de recuperación de patrones en la columna aumenta, si se reemplazan las partes metálicas de ésta por materiales inertes, como teflón (Scott, 1992).

La influencia de la temperatura en la separación con frecuencia es menospreciada, pero es muy importante, ya que puede modificar la forma de las partículas de la fase estacionaria, lo que afecta la reproducibilidad del método, causando diferencias en el número de picos, y en los tiempos de retención. Se ha observado que al disminuir la temperatura mejora la resolución (Craft, 1992). Sin embargo, un artículo publicado por Scott y Hart en 1993, evalúa la separación en HPLC a diferentes temperaturas, desde 15 a 30°C, donde se observa, que a temperaturas menores de 20°C, no hay una buena separación entre equinenona y β-criptoxantina, mientras que a temperaturas mayores de 25°C, la separación entre luteína/zeaxantina y α- y β-carotenos disminuye considerablemente (Scott & Hart, 1993).

La fase móvil es la variable que más se manipula, pero los cambios no tienen efectos dramáticos en la resolución. En el análisis de carotenoides se necesitan solventes orgánicos de baja viscosidad, que solubilizan carotenoides y que no sufran cambios con la presión. Todas estas consideraciones limitan la selección a acetonitrilo y metanol. En un artículo donde se evaluaron 68 columnas, se encontró que con las fases basadas en metanol, el porcentaje de recuperación es mucho mayor que con las fases basadas en acetonitrilo. Por otro lado la toxicidad y el costo del metanol son menores que el acetonitrilo (Craft, 1992). Sin embargo, las fases que no contienen metanol dan una mejor resolución entre zeaxantina y luteína, aunque el pico de la luteína se distorsiona, además de no permitir una buena separación entre licopeno y equinenona (Nells & Leenheer, 1983). Esto se soluciona adicionando un 5% de metanol a la fase (Scott, 1992).

La adición de modificadores mejora la recuperación de los carotenoides en su paso por la columna, a la vez que reduce o elimina la degradación de las mismas. Se ha encontrado que la adición de 0.1% de trietilamina a la fase móvil mejora la recuperación del carotenoide en la columna hasta un 42%. Además, la adición de trietilamina reduce los tiempos de retención y mejora la resolución de la línea base. El acetato de amonio mejora la recuperación en porcentajes variables, y más aún si se combina con la trietilamina; sin embargo, disminuye la separación entre luteína y zeaxantina, pero aumenta la separación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. La explicación del efecto de estos modificadores no es clara, pero se atribuye a que tienen una acción amortiguadora de acidez en la fase móvil, o en los grupos silanol de la fase estacionaria, o elimina la interacción con iones metálicos que puedan encontrarse como impurezas (Hart & Scott, 1995). Entre los solventes utilizados como modificadores están diclorometano y cloroformo (no son muy recomendados debido a que pueden contener trazas de HCl), tetrahidrofurano, acetato de etilo o acetona (Craft, 1992).

En ocasiones se ha trabajado con gradientes de elución, que cambian las proporciones de los solventes de la fase móvil con el tiempo; esto presenta las ventajas de obtener un rango de analitos más amplio y aumenta la sensibilidad y selectividad. Sin embargo presenta muchas desventajas: hace el análisis más complejo; requiere equipo adicional; el tiempo para equilibrar la columna después de cada corrida es mayor, requiriéndose mayor cantidad de solventes, excluyéndose a algunos detectores, y aumentándose la variabilidad (Craft, 1992).

Uno de los problemas de fase reversa, es la baja retención de los carotenoides más polares. Se han realizado trabajos donde se incluye agua en la fase móvil, pero esto causa distorsión en los picos, y precipitación parcial en de los carotenoides en la columna (Nells & Leenheer, 1983).

Con respecto a los patrones, solamente  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos, licopeno y luteína se encuentran comercialmente, los otros deben aislarse por cromatografía en columna abierta o por HPLC. Las soluciones patrón no son estables y



deben ser preparadas antes de usarse. En el **CUADRO V** del Anexo I, se presentan varias metodologías utilizadas para el aislamiento, purificación y almacenamiento de patrones.

Para cuantificación de carotenoides se utilizan patrones internos, como el decapreno- $\beta$ -caroteno, que no se encuentra comercialmente; y el sudán I, que es muy utilizado, pero que no cumple con la regla de tener una estructura similar a los carotenoides, además que su tiempo de retención es similar al de algunas xantofilas (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

La mayoría de separaciones se llevan a cabo en columnas de 25 cm de largo y con partículas de 5  $\mu$ m. Los coeficientes de variación reportados son de un 5%, y sus porcentajes de recuperación son mayores al 98% (Rodríguez-Amaya, 1989).

En el **CUADRO VI** del Anexo I, se muestran algunos métodos HPLC reportados.

La técnica aún no es utilizada ampliamente, debido a que el equipo y los solventes utilizados tienen un alto costo, requiere una resolución óptima y una calibración con patrones adecuados (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

## 6. Identificación

Para establecer la identidad de los carotenoides, una de las características más importantes son sus espectros de absorción, que se encuentran en función del cromóforo (la absorción inicial de la cadena poliénica es influenciada por la presencia de otros grupos funcionales) (Davies, 1976). Para la identificación se determina el espectro de absorción en por lo menos tres solventes diferentes (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992).

Cuando se lleva a cabo la cromatografía, el orden de elución también da una idea de que carotenoide puede ser, o por lo menos si se trata de un caroteno o una xantofila.

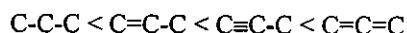
Recientemente, la espectroscopía de masas, proporciona una idea más clara de la estructura del carotenoide en cuestión. La espectroscopía infrarroja se utiliza para determinar la identidad de los grupos funcionales presentes; la identidad y posición de estos grupos funcionales se comprueba con reacciones químicas específicas. La resonancia magnética nuclear y resonancia magnética de  $^{13}\text{C}$  se han utilizado también en ocasiones para determinar estructuras (Davies, 1976).

### a. Características de adsorción de carotenoides

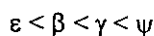
La fuerza de adsorción de los carotenoides está relacionada con su estructura química. Es difícil hacer una lista de las características de adsorción de los carotenoides conocidos, sin embargo, se pueden establecer ciertas generalidades relacionando estructura y afinidad de adsorción (Davies, 1976).

#### i. Para cromatografía en columna

- En los carotenos, la adsorción está definida por el número de dobles enlaces, la naturaleza de los grupos finales, y el tamaño de la molécula, mientras que en las xantofilas está definido por la naturaleza del grupo oxigenado.
- Referente al tipo de enlaces múltiples que estén presentes en la molécula, se ha logrado concluir que se incrementa la afinidad de adsorción, según lo siguiente:



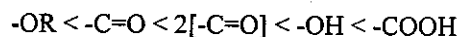
- Un caroteno simétrico es mejor adsorbido que un caroteno asimétrico con igual número de dobles enlaces.
- Las estructuras alicíclicas tienen mayor afinidad de adsorción que las cíclicas, así, el  $\beta$ -caroteno eluye en una columna antes que el  $\tau$ -caroteno, y éste antes que el licopeno; el orden en que aumenta la afinidad de adsorción es:



El  $\varepsilon$ -caroteno y el licopeno, son los carotenoides insaturados más adsorbidos.

- La adsorción se incrementa con el largo de la cadena: el escualeno ( $C_{30}$ ) es menos adsorbido que el licoperseno ( $C_{40}$ ).

- La presencia de grupos oxigenados aumenta la afinidad de adsorción del carotenoide de la siguiente forma:



- Los 5,8-epóxidos son mejor adsorbidos que sus análogos 5,6-.
- Los efectos de los sustituyentes no son aditivos: una segunda sustitución tiene menos efecto que la primera.
- Los isómeros *cis* son más adsorbidos que los todo-*trans*.
- Al aumentar el número de enlaces en posición *cis*, aumenta la adsorción.
- Si el enlace *cis* está en el centro de la estructura, es menos adsorbido que si se encuentra en los extremos.

Existen diferencias entre los distintos tipos de adsorbentes utilizados, pero éstas generalidades son muy útiles para sacar conclusiones (Davies, 1976).

## ii. Cromatografía en capa fina

Además de la estructura del carotenoide, en este tipo de cromatografía, el  $R_f$  está influenciado por otros factores como:

- Una alta concentración da como resultado una elongación hacia el frente del solvente.
- La contaminación puede modificar el  $R_f$ .
- El incremento de la temperatura, aumenta los valores de  $R_f$ .
- Si se utiliza una cámara saturada para el desarrollo de la cromatografía, se obtienen valores de  $R_f$  mayores.
- En placas de sílica gel o alúmina, la movilidad depende también de la humedad: si ésta aumenta, decrece la migración.
- La mezcla de solventes tiene que ser reemplazada con frecuencia, no debería de ser utilizada para más de dos corridas, pues se consume en cada una.

Debido a todos estos factores, que en ocasiones dificultan que las condiciones sean exactamente las mismas, la cromatografía en capa fina sólo se puede utilizar para identificar carotenoides si se utilizan patrones de referencia en la misma corrida (Davies, 1976).

Esta técnica es muy utilizada para comprobar la pureza de los carotenoides aislados y generalmente se hace en placas de sílica gel con 3% de metanol en benceno para xantofilas y 5% de metanol en éter de petróleo para carotenos (Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988).

## b. Métodos espectroscópicos

Generalmente, los espectros de absorción de los carotenoides son determinados en éter de petróleo, y los de las xantofilas, en etanol. Se pueden utilizar otros solventes como acetona, cloroformo y benceno (Davies, 1976).

La configuración geométrica de cada carotenoide debe ser tomada en cuenta para reconocer si su espectro de absorción debe ser tomado sólo en la región visible, o también en la región ultravioleta. En el **CUADRO VII** del Anexo I, se presentan los máximos de absorción para algunos carotenoides, en diferentes solventes (Davies, 1976).

Se pueden establecer algunas generalidades de los efectos estructurales en los espectros de absorción de los carotenoides:

- Dobles enlaces conjugados: El aumento de los dobles enlaces conjugados desplaza del máximo de absorción a mayores longitudes de onda a la vez que aumenta el valor del coeficiente de absorción molar  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  (Davies, 1976).

- Grupos finales cíclicos: Cuando no hay anillos al final de las estructuras, los máximos de absorbancia se desplazan a longitudes de onda mayores de 8 a 17 nm en comparación con los isómeros cíclicos (Davies, 1976).
- Grupos carbonilo: La introducción de grupos carbonilos en una cadena poliénica, causa el desplazamiento a mayores longitudes de onda, y la pérdida de la estructura fina en el espectro de absorbancia. El aumento en el máximo de absorción varía de 7 a 13 nm (Davies, 1976).
- Grupos hidroxilo: La introducción de uno o más grupos hidroxilos en la cadena poliénica, no ha mostrado un cambio significativo en los máximos de absorción de los carotenoides (Davies, 1976).
- Grupos epóxidos: La formación de un grupo epóxido 5,6- entre un anillo y la cadena poliénica, produce una disminución de aproximadamente 3 nm. Si el epóxido que se forma está en posiciones 5,8- hay una disminución de 20 a 25 nm en los máximos de absorción (Davies, 1976). Para verificar la presencia de grupos epóxidos, se hace reaccionar la solución del carotenoide con HCl al 0.1 M en etanol y se vuelven a determinar sus máximos de absorción (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992).
- Configuración electrónica: Los isómeros *cis* tienen un efecto hipsocrómico e hipocrómico de aproximadamente 4 nm, en los espectros de absorción en comparación con los correspondientes *todo-trans*. Una característica importante en la apariencia del espectro de absorción de los isómeros *cis* es la aparición de un pico en la región ultravioleta, generalmente entre 320 y 380 nm. En el **CUADRO VIII** del Anexo I, se muestra la posición del pico *cis* de algunos carotenoides en éter de petróleo en relación con la banda de mayor absorción del isómero *todo-trans* (Davies, 1976).

Para verificar la forma del isómero, se induce la estereomutación por tratamiento con luz en presencia de yodo, si se trata de un isómero *cis*, no se observará efecto en el máximo de absorción, pero si es un isómero *trans*, se observará una disminución de 4 nm en el máximo (Davies, 1976).

- Solvente: Se puede establecer una generalidad para el efecto del solvente, indicando la absorción máxima en éter de petróleo (40-60°C):

Eter de petróleo (60-80°C)	+ 0-2 nm
Hexano	+ 0-2 nm
Metanol	+ 0-2 nm
Etanol	+ 0-2 nm
Eter dietílico	+ 1-3 nm
Acetona	+ 2-4 nm
Cloroformo	+ 12-16 nm
Benceno	+ 14-20 nm

Tolueno	+ 14-20 nm
Piridina	+ 18-24 nm
Disulfuro de carbono	+ 30-40 nm

Debido a esto, para basar la identificación de un carotenoide en sus espectros de absorbancia, es preciso hacerlo por lo menos en dos solventes diferentes. La presencia de agua en el solvente tiene un efecto hipsocrómico que pueden llegar a ser cercana a la región del ultravioleta (Davies, 1976).

- Carotenoides acomplejados con proteínas: La mayoría de reportes encontrados en la literatura, muestran un efecto batocrómico para el máximo de absorción de los carotenoides unidos a proteínas (Davies, 1976).
- Bajas temperaturas: Los efectos de tomar los espectros de absorbancia de carotenoides a bajas temperaturas (-70°C), son: a) Efecto batocrómico de 12 a 40 nm, que puede ser hasta 70 como en el caso de la violeritrina, y b) acentuación de la estructura fina y aparición de nuevas bandas. Gracias a esta técnica, se han podido estudiar con más facilidad los isómeros de carotenoides (Davies, 1976).

#### c. Otros métodos espectroscópicos

Para la elucidación de estructuras se han utilizado otros métodos como espectroscopía de masas, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y resonancia de  $^{13}\text{C}$ .

#### d. Reacciones químicas específicas

Utilizando un espectro infrarrojo se pueden determinar los grupos funcionales presentes en la molécula, y se puede comprobar por reacciones químicas específicas para los grupos funcionales, entre las que se utilizan frecuentemente, se pueden mencionar:

##### i. Grupos hidroxilo:

- Acetilación: Para acetilar los grupos hidroxilos primarios, secundarios y terciarios, es recomendable utilizar cloruro de acetilo en lugar de ácido acético, que sólo reacciona con los grupos primarios y secundarios. La muestra se deja reaccionar en atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y en la oscuridad por 12 horas, utilizando piridina como solvente. El producto se extrae con éter dietílico. Las xantofilas se pueden recuperar al saponificar los acetatos en 5% de KOH metanólico por una hora (Davies, 1976).

- Silización: Los grupos hidroxilo ternarios se pueden convertir en los correspondientes ésteres de trimetilsililo (TMS). La xantofila se disuelve en piridina y se le deja reaccionar con hexametildisilano y trimetilclorosilano por una hora a temperatura ambiente (Davies, 1976).
- Metilación: La metilación de los grupos hidroxilo se lleva a cabo comúnmente utilizando ácido clorhídrico y metanol, y es aplicable a hidroxilos secundarios alílicos con un doble enlace. La reacción se lleva a cabo dejando las xantofilas por tres horas a temperatura ambiente. Se verifica por un aumento en el *R<sub>f</sub>* (Davies, 1976).
- Oxidación: Esta es una prueba para grupos hidroxilo alílicos y su oxidación a las correspondientes cetonas que se verifica por un efecto batocrómico en su espectro de absorción (Davies, 1976).
- Deshidratación: El tratamiento de algunos carotenoides con cloroformo acidificado con ácido clorhídrico, elimina agua de los grupos hidroxilos primarios, secundarios y terciarios alílicos. La reacción se puede verificar por un efecto batocrómico que varía entre 10 y 16 nm. Los carotenoides pueden recuperarse por lavados con solución de bicarbonato sódico en agua (Davies, 1976).

#### ii. Epóxidos:

Uno de los procedimientos más importantes para la identificación de 5,6-epóxidos, es su transformación a 5,8-epóxidos, por acción de ácidos, que se verifica por un desplazamiento hipsocrómico de 17 a 22 nm. Esta reacción se lleva a cabo adicionando una gota de ácido clorhídrico concentrado a la cubeta donde se lee la solución. Tanto los epóxidos 5,6-, como los 5,8- reaccionan con ácidos dando un color azul; si se les hace reaccionar con una mezcla de éter dietílico, metanol y ácido clorhídrico concentrado (10:9:1 v/v), los monoepóxidos dan un color verde, los diepóxidos azul-verdoso. La reacción se puede llevar a cabo también exponiendo la placa obtenida por cromatografía en capa fina a vapores de ácido clorhídrico concentrado (Davies, 1976).

#### iii. Grupos carbonilo:

La reacción más utilizada para reconocer grupos carbonilo es la reducción; se puede llevar a cabo con hidruro de aluminio y litio, donde los carotenos producidos son menos polares que las xantofilas de las que provienen, además se evidencia un efecto hipsocrómico por disminución de la conjugación. Se pueden distinguir los grupos carbonilos por sus reacciones con estos reactivos: aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres reaccionan con el hidruro de litio y aluminio, pero con el borohidruro de sodio solo reaccionan aldehídos y cetonas (Davies, 1976).

La reacción con borohidruro de sodio se realiza agregando a 5 ml de la solución del carotenoide, 100 mg de borohidruro. Después de 5 min. se determina su espectro de absorción: un efecto hipsocrómico de 20 a 30 nm indica la presencia de un grupo carbonilo.

### 7. Cuantificación

El método oficial para la cuantificación de carotenoides es espectrofotométrico, para lo cual se requiere que el carotenoide sea puro y que el coeficiente de absorción molar sea conocido. Los coeficientes de absorción molar ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ ) de los carotenoides están dados en soluciones al 1% (1 g en 100 ml de solución), en celdas de 1 cm de paso de luz. La cantidad de carotenoide se calcula utilizando la fórmula

$$x = \frac{y}{\frac{E_{1\text{ cm}}^{1\%}}{\times 100}}$$

donde  $x$  son los gramos de carotenoide, y  $y$  son los ml de solución. En el **CUADRO IX** del Anexo I, se listan los coeficientes de absorción de algunos carotenoides en diferentes solventes (Davies, 1976).

## IV. JUSTIFICACION

El estudio de los carotenoides ha cobrado mayor importancia no sólo por la actividad como provitamina A de algunos de ellos, sino también debido a su papel como antioxidantes, lo que se ha asociado con la prevención de algunos tipos de cáncer.

Debido a esta importancia biológica, se necesita un método rápido y específico para cuantificar los principales carotenoides presentes en alimentos.

La biodisponibilidad de los carotenoides está influenciada por muchos factores como son la edad y el estado fisiológico del individuo, la forma en que se encuentran los carotenoides en los alimentos, y la forma en que se prepara el alimento. La investigación en este campo frecuentemente se dificulta debido a que las metodologías que se utilizan son largas y costosas, y porque los carotenos son sensibles a la luz, el calor, el oxígeno, los ácidos, y en algunos casos a los álcalis.

Por estas razones se hace necesario la implementación de un método para la determinación del perfil de los carotenoides que se encuentran con mayor frecuencia en los alimentos, que permita obtener resultados confiables y pueda ser usado en estudios de biodisponibilidad. De los tres métodos utilizados para análisis de carotenoides: cromatografías en columna abierta, en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución, se considera al último como el mejor, ya que provoca menos isomerización y requiere menos tiempo (Bushway, 1985).

Este trabajo se dedicará a desarrollar, optimizar y validar procedimientos para la determinación de los principales carotenoides de importancia biológica, utilizando la metodología de HPLC.



## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Montar un método rápido, exacto, preciso y de bajo costo para el análisis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina en frutas y vegetales, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

### B. ESPECIFICOS

1. Optimizar la metodología para aislar específicamente los carotenoides más abundantes en frutas y vegetales, para utilizarlos como patrones.
2. Validar el método para obtener los perfiles de carotenoides en mezclas de frutas y vegetales.

## **VI. HIPOTESIS**

Utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es posible establecer un método rápido, preciso, exacto y a bajo costo que permita determinar seis carotenoides:  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina en frutas y vegetales.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. UNIVERSO Y MUESTRA

#### 1. Universo

Frutas y vegetales que contengan carotenoides.

#### 2. Muestra

Se realizará un muestreo a conveniencia, para el aislamiento de patrones. Se utilizarán zanahoria, espinaca y papaya.

Para la validación del método se utilizarán dos mezclas, una de vegetales de 10% de espinaca, 45% de zanahoria, y 45% de tomate; y una de frutas con 50% de papaya y 50% de naranja. Los porcentajes serán calculados con base en peso húmedo.

### B. MATERIALES

#### 1. Reactivos

Acetona, ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) PM=58.08,  $d=0.791$ , 99.5%

Eter de petróleo 30-60°C,  $d=0.640$ , grado analítico

Metanol, ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) PM=32.04,  $d=0.791$ , 99.9%

Etanol, ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) PM=46.07,  $d=0.785$ , grado reactivo

Eter dietílico, ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) PM=74.12,  $d=0.708$ , 99%

Tetrahidrofurano, ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) PM= 72.11,  $d=0.889$ , 99.9%

Diclorometano, ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) PM=84.93,  $d=1.325$ , 99.9%

Acetonitrilo, ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) pm=41.05,  $d=0.786$ , 99.9%

Hexano, ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) PM= 86.18,  $d=0.659$ , 95%

Cloroformo, ( $\text{CHCl}_3$ ) PM=119.18,  $d=1.492$ , 99.8%

Benceno, ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ) PM=78.11,  $d=0.874$ , 99%

Sulfato de sodio, ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) PM=142.04, 99%

Cloruro de sodio, ( $\text{NaCl}$ ) PM=58.44, 98%

Hyflosuper cel

Oxido de magnesio, ( $\text{MgO}$ ) PM=40.31, 98%

Gas nitrógeno, 95-99%

$\alpha$ -caroteno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) PM=536.9, Tipo V

$\beta$ -caroteno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) PM=536.9, Tipo IV

Licopeno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) PM=536.9, 90-95%

$\beta$ -criptoxantina, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}$ ) PM=568.9

Luteína, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ) PM=568.9, 90%

Zeaxantina, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ) PM=568.9

## 2. Cristalería

Beakers de 5, 10, 30, 50, 150, 400, 600 y 1000 ml

Probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 ml

Quitasatos de 125, 250 y 500 ml

Embudos con filtro de vidrio poroso

Frascos de color ámbar de 2, 5, 10, 30, 50, 300 y 500 ml

Agitadores de vidrio

Columnas para cromatografía, de 25 cm x 2.5 cm, 4.6 mm de diámetro interno y empaque de  $\text{C}_{18}$

Placas de vidrio para cromatografía de 20 x 20 cm

Cámaras cromatográficas para placas de 20 x 20 cm

Ampollas de separación de 250, 500 y 1000 ml

Balones 24/40 con tapón esmerilado de 50, 125 y 250 ml

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 10 y 15 cm

Balones volumétricos de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ml

Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml

Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml

Celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz

### 3. Equipo

Balanza analítica Sartorius ( $\pm 0.0001$  g)

Balanza semianalítica ( $\pm 0.001$  g)

Bomba de vacío

Procesadora de alimentos de dos velocidades, Bati-Max de Cocina

Rotavapor

Columna Supercosil LC-18-5 de 5  $\mu\text{m}$

Cromatógrafo líquido constituido por:

Cromatógrafo Varian 5500 con detector UV

Interfase Varian IIM-A

Sistema de procesador de datos DS-654

Impresora HP Thinkjet

Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lamda 3B

Computadora Epson Action PC 1500

Impresora Epson Stylus 800

### C. METODOS

#### 1. Método para determinación de carotenoides en verduras y frutas por cromatografía en columna abierta

##### a. Extracción de pigmentos

- Enfriar 300 ml de acetona por cada muestra que se va a utilizar.
- Pesar la muestra (20 a 50 g de frutas y 5-10 g de verduras, dependiendo de la intensidad del color). Dejar la muestra en acetona fría por 5 min.
- Colocar la muestra en una licuadora, adicionar 1-2 cucharadas de Hyflosuper cel, licuar por 1 minuto y filtrar.
- Repetir la extracción hasta que el filtrado sea incoloro.

- Transferir a 100 ml de éter de petróleo colocados en una ampolla de separación y adicionar una alícuota del extracto acetónico. ¡No agitar! Adicionar agua destilada y dejar que se separen las fases. Descartar la fase acuosa. Adicionar más extracto y repetir el procedimiento.
- Cuando todo el extracto se haya adicionado, lavar 5 veces más con agua para eliminar los restos de acetona.

#### b. Saponificación

- Adicionar 100 ml de KOH en metanol al 10%. Cubrir con papel aluminio y dejar de 12 a 16 horas a temperatura ambiente.
- Lavar la solución con agua destilada para eliminar el álcali. Adicionar al agua por alícuotas para evitar la formación de emulsiones.
- Cuando todo el extracto se haya adicionado, lavar hasta que el agua no esté alcalina. - Secar con sulfato de sodio anhidro.

#### c. Cromatografía en columna

- Concentrar la solución en un rotavapor a menos de 40°C hasta un volumen aproximado de 20 ml.
- Empacar una columna de 10 cm de alto por 2 cm de diámetro, con una mezcla MgO:Hyflosuper cel (1:1). Colocar una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro en la parte superior. Acondicionar la columna con éter de petróleo y adicionar la muestra. Eluir con fracciones de 50 ml de soluciones al 2, 4, 8 y 10% de éter etílico, 4, 6, 8 y 10% de acetona, ambos en éter de petróleo. El volumen puede variar dependiendo de la resolución de las bandas. Si no hay separación se cambiar a un solvente más polar.

#### d. Identificación y cuantificación de carotenoides

- Espectros de absorción: Llevar cada fracción a un volumen establecido de un solvente puro, obtener su espectro de absorción y leer su absorbancia. Los carotenoides generalmente presentan tres máximos de absorbancia. Esos máximos deben ser comparados con los valores dados en la literatura.
- Cromatografía en capa fina: Los carotenoides son aislados aplicando una alícuota a una placa de sílica gel de 0.25 mm de grosor, activada a 110°C 1 h. Se desarrolla utilizando una fase móvil de metanol en benceno al 3%.

- Metilación: Ayuda a la identificación de hidroxilos alifáticos. Los carotenoides se disuelven en 20 ml de metanol, se les agrega 2 gotas de HCl 2N y se deja reposar 3 horas en la obscuridad a temperatura ambiente. La solución se transfiere a éter de petróleo y se desarrolla una separación cromatográfica en capa fina.
- Prueba de epóxidos: La placa cromatográfica expone a vapores de HCl. La presencia de epóxidos se evidencia por el cambio de color de amarillo o anaranjado a azul o verde.
- Cuantificación de carotenoides: Se realiza a partir de su máximo de absorbancia, aplicando la ley de Beer. Los valores de las absorbancias son presentados en un cuadro por Davies (1976). Los resultados finales son expresados en  $\mu\text{g}$  de carotenoide por gramo de muestra:

$$\text{Carotenoide } (\mu, \text{g / g}) = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{absorción} \times 10}{\frac{1\%}{A_{1\text{cm}}} \times \text{peso (g)} \times 100}$$

## 2. Método para determinación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (Hart & Scott, 1995)

### a. Extracción

- Pesar 10 g de muestra.
- Adicionar 1 g de  $\text{MgCO}_3$ .
- Adicionar 50 ml de tetrahidrofurano:MeOH (1:1 v/v) conteniendo el patrón interno.
- Homogeneizar 1 minuto en una licuadora o batidora.
- Filtrar.
- Repetir la extracción con dos alícuotas más de la mezcla tetrahidrofurano:Metanol.
- Transferir a una ampolla de separación con 50 ml de éter de petróleo (conteniendo 0.1% de BHT) y 50 ml de solución de NaCl 10%.
- Descartar la fase acuosa y evaporar la sequedad.
- Reconstituir en 5 ml de diclorometano.

### b. Saponificación

El procedimiento de saponificación se utiliza solo para pimientos y frutas.

- Se utilizan 4 ml del extracto reconstituido en diclorometano.
- Se les adiciona 4 ml de KOH al 10% en MeOH.
- Se deja reposar una hora bajo atmósfera de nitrógeno.
- Se extrae con 20 ml de éter de petróleo (conteniendo 0.1% de BHT), lavando con 20 ml solución de NaCl al 10% hasta que los lavados sean neutros.
- La fase etérea es llevada a sequedad y reconstituída con 4 ml de diclorometano.

### c. Condiciones para la cromatografía

- Precolumna 5  $\mu\text{m}$  ODS2 de 100 x 4.6 mm.
- Columna 5  $\mu\text{m}$  Vydac 201TP54 250 x 4.6 mm.
- Temperatura 22.5°C  $\pm$  0.1.
- Fase móvil acetonitrilo:diclorometano:metanol 75:20:5 v/v/v con 0.1% de BHT y 0.05% de trietilamina; el metanol contiene 0.05 M de acetato de amonio.
- Flujo de 1.5 ml/min.
- Detección a 450 nm.

### d. Cuantificación

- La concentración de los carotenoides ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) se calcula usando los factores de repuestas en comparación con la  $\beta$ -criptoxantina, que se utiliza como patrón.
- Factor relativo de respuesta

$$RF = \frac{\text{Area del pico de la solución del carotenoide (1 } \mu\text{g / ml)}}{\text{Area del pico de la solución de } \beta\text{-criptoxantina (1 } \mu\text{g / ml)}}$$

Los factores de respuesta usados fueron 1.068 para luteína, 1.150 para zeaxantina, 0.996 para licopeno, 1.114 para  $\alpha$ -caroteno y 1.004 para  $\beta$ -caroteno.



- Cálculo de la concentración de las muestras:

$$\text{Conc. del carotenoide } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Área del pico del carotenoide}}{\text{Área de la } \beta\text{-criptoxantina}} \times \text{RF} \times \text{factor de dilución} \times \frac{100}{\% \text{rec. del SI}}$$

$$\text{Conc. del carotenoide } (\mu\text{g/100g}) = \frac{\text{conc. de carotenoide } (\mu\text{g/ml})}{\text{conc. del alimento en el extracto } (\text{g/ml})} \times 100$$

### 3. Método para la separación y purificación de carotenoides por cromatografía en capa fina (Khachik, Beecher & Whittaker, 1986).

#### a. Extracción

- Se pesan entre 60 y 150 g de muestra, se le adiciona un 200% de su peso de sulfato de sodio anhidro, y un 10% de carbonato de magnesio.
- Se extraen con tetrahidrofurano hasta que el filtrado sea incoloro.
- Se evapora a sequedad y se pasa a hexano.

#### b. Separación

- El extracto concentrado y disuelto en hexano se aplica a placas semipreparativas de  $C_{18}$  y se eluye con metanol:acetonitrilo:hexano:cloruro de metileno (15:80:2.5:2.5).
- Las bandas separadas se raspan y se disuelven en un solvente apropiado.

#### c. Purificación

- Las bandas obtenidas se disuelven en el mínimo volumen posible y se aplican a placas de sílica gel, usando éter de petróleo:acetona (2:1) como fase móvil.

#### d. Identificación

- Se toman los espectros UV-Vis de los carotenoides obtenidos.
- Se comprueba la pureza por HPLC.

### D. PROCEDIMIENTO

#### 1. Purificación de patrones

El método en columna abierta es el que se utiliza normalmente para la determinación de carotenoides, éste método permite aislar suficiente cantidad de cada uno de ellos y leer su absorbancia en un espectrofotómetro para determinar su concentración.

Por esta razón se eligió, para el aislamiento de patrones. De las bandas que se obtuvieron por éste método, solo se tomará la parte central de cada una, para obtener al carotenoide en cuestión con un mayor grado de pureza.

La identificación de los carotenoides se confirmó por lo menos con dos pruebas:

- a. Orden de elución en la columna, en una columna empacada con MgO:Hyflosuper cel (1:2)
  - b. Espectro de absorción comparado con los de patrones comerciales o aislados en el laboratorio;
- cuando existió duda acerca de la identidad del carotenoide aislado, se realizaron pruebas específicas para los posibles carotenoides, por ejemplo:

- a. Estereomutación *cis-trans*, que se realiza con luz, en presencia de yodo.
- b. Prueba de la presencia de grupos epóxidos.
- c. Metilación de los grupos hidróxidos secundarios alílicos a un doble enlace

éstas pruebas se encuentran descritas en la sección seis, de los antecedentes.

Ya identificados, la pureza se confirmó por HPLC, cuando fue necesario se efectuó otra cromatografía para purificarlos. Esta cromatografía consistió en hacer una columna empacada con MgO:Hyflosuper cel (1:1), para que las bandas eluyeran utilizando solventes de mayor polaridad, lo que permitió una mejor separación de los posibles contaminantes.

La elección de las muestras para el aislamiento de patrones se llevó a cabo en la siguiente forma:

- a. Luteína: se realizaron pruebas con chaya y espinaca.
- b. Zeaxantina: se realizaron pruebas con maíz y con papaya.
- c.  $\beta$ -criptoxantina: se realizaron pruebas con papaya roja.

- d. Licopeno: se realizaron pruebas con tomate y papaya.
- e.  $\alpha$ -caroteno: se realizaron pruebas con zanahoria, chaya y espinaca.
- f.  $\beta$ -caroteno: se realizaron pruebas con zanahoria, chaya, espinaca y papaya.

Se eligieron estos vegetales y frutas debido a que contienen gran cantidad de carotenoides reportados, según las tablas de composición de alimentos, y además, son fácilmente accesibles.

## 2. Determinación de las condiciones para la cromatografía

Se hicieron pruebas para determinar la mejor separación, en un tiempo adecuado de los carotenoides de interés, los parámetros que se consideraron fueron:

- a. Columna
- b. Composición de la fase móvil
- c. Longitud de onda de detección
- d. Velocidad del flujo

Para éstas pruebas, se inyectaron patrones individuales y mezclas de ellos.

## 3. Optimización del método

Para el tratamiento de la muestra previo al análisis por HPLC, se tomaron como base los métodos de Rodríguez-Amaya *et al.* (1989) y de Hart y Scott (1995). Se evaluaron cinco pasos del procedimiento:

- a. Solvente de extracción: Se preparó una mezcla de vegetales con 12 g de espinaca y 12 g de tomate. La mezcla se dividió en seis fracciones iguales; tres se extrajeron con una mezcla MeOH:THF (1:1), y tres con acetona. La extracción se llevó a cabo hasta obtener un filtrado transparente.
- b. Cambio de solvente polar a éter de petróleo: Se extrajeron 15 g de espinaca y 15 g de tomate, el extracto se dividió en seis alícuotas: tres se adicionaron a 100 ml de éter de petróleo por fracciones de 30 a 40 ml y luego de cada adición se cambió el agua de la ampolla de separación; las otras tres se adicionaron totalmente a 50 ml de éter de petróleo y la fase acuosa resultante se reextrajo con 50 ml más de éter.
- c. Solvente de saponificación: Se extrajeron 18 g de papaya roja, luego de pasar todo el extracto a éter de petróleo, se dividió en nueve fracciones y se evaporaron a sequedad. Tres fracciones se disolvieron en 100 ml de MeOH:THF (1:1), tres en 100 ml de éter de petróleo y tres en 100 ml de diclorometano. Se

- adicionaron 100 ml de KOH al 10% p/v a cada fracción y se dejaron reposar por 5 horas. Luego la fase orgánica se lavó con agua hasta eliminar todo el KOH.
- d. Tiempo de saponificación: Se extrajeron 24 g de papaya, el extracto se pasó a éter de petróleo y se dividió en 12 fracciones de 50 ml cada una. A cada fracción se le adicionó, por triplicado, 50 ml de KOH al 10%. Las muestras se dejaron 1, 3, 5 y 16 horas. Después de la saponificación la fase orgánica se lavó hasta eliminar todo el KOH.
- e. Solvente de inyección: Se extrajeron 30 g de espinaca y 30 g de tomate. Al final de la extracción se dividieron en doce fracciones iguales y se llevaron a sequedad. Las fracciones se reconstituyeron, por triplicado, con 5 ml MeOH:THF (1:1), etanol, cloroformo o acetona.
- Las comparaciones se llevaron a cabo por carotenoide, en base a las concentraciones obtenidas en  $\mu\text{g/ml}$ .

## E. VALIDACION

Se realizó la validación del método, con base en la Farmacopea de los Estados Unidos, que incluye los siguientes parámetros:

a. Exactitud: Es la comparación de los resultados obtenidos, con los datos reales. Se expresa como el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{cant. experimental}}{\text{cant. teórica}} \times 100$$

Para su determinación, a una matriz que contenga todos los componentes de una muestra, excepto el analito, se le adiciona una solución del analito a una concentración semejante a la esperada en las muestras (Parker, 1991).

En el caso de los carotenoides en alimentos, se analizaron por triplicado, dos muestras: a una de ellas se le adicionó una solución de aproximadamente 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada carotenoide.

El porcentaje de recuperación se determinó tres veces para vegetales y tres veces para frutas.

Para el experimento de recuperación se usaron frutas o vegetales, según fuera el caso, del color más pálido que sea posible.

b. Precisión: Es el grado de reproducibilidad y repetibilidad de un método, expresado por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación) de los valores obtenidos de la misma muestra en diferentes condiciones (Parker, 1991).

La desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación porcentual (CV %) se calcula por:

$$CV \% = \frac{DS}{Promedio} \times 100$$

Se realizaron tres experimentos para vegetales y tres para frutas.

Para vegetales se preparó una papilla de espinaca, zanahoria y tomate, luego de filtrar eliminar toda la fibra de los vegetales, se repartió en doce fracciones de aproximadamente 5 g cada una. Todas se guardaron cerradas, en atmósfera de nitrógeno, a - 20 °C y protegidas de la luz. Se analizaron en tres días diferentes: en réplicas de 6, 3 y 3 cada una. Con los datos obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual por día, y entre el promedio obtenido cada día.

Para las frutas, se preparó otra papilla con papaya y se siguió el mismo procedimiento que se realizó para los vegetales.

c. Especificidad: Es la habilidad de un método analítico para determinar el analito en presencia de otros componentes de la matriz de la muestra. Se puede expresar como la diferencia de los resultados entre dos grupos de muestras: una que contenga impurezas y productos de degradación, y otra que solo contenga el analito (Parker, 1991).

En éste trabajo, la especificidad solo se determinará por el aumento en las áreas de los picos de los carotenoides en la determinación de los porcentajes de recuperación: se espera una diferencia al comparar la muestra tomada como blanco y la muestra con patrones agregados.

d. Linealidad y rango: La linealidad es la capacidad de un método para obtener, de forma directa o después de una transformación matemática, resultados proporcionales a las concentraciones de analito dentro de un rango determinado.

El rango de un método analítico es el intervalo cuyos límites inferior y superior determinan al analito con precisión, exactitud y linealidad.

La linealidad se calcula por un tratamiento de regresión lineal entre los resultados obtenidos y la concentración de analito, generalmente se utiliza el método de mínimos cuadrados. La pendiente y el coeficiente de correlación de la regresión indican la linealidad (Parker, 1991).

En el método, se inyectaron soluciones de cada carotenoide de concentraciones entre 0.0 y 10 µg/ml (la concentración exacta se determinará por espectrofotometría UV-vis), para obtener las curvas respectivas.

e. Límite de detección: Es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse.

Para encontrar el límite de detección de un método, se corre una muestra blanco que no contiene analito, y se corren muestras que contengan diferentes concentraciones. Se busca que el límite de detección sea el doble o el triple de la medición que da el blanco, es decir una relación 2:1 ó 3:1.

Para técnicas como HPLC, se busca una relación señal:ruido de 2:1 ó 3:1, donde la señal es la altura del pico del analito dividido por el valor absoluto de la fluctuación del ruido de la línea base (Parker, 1991)

f. Límite de cuantificación: Es el nivel más bajo de concentración de analito que se puede determinar con precisión y exactitud en las condiciones normales de análisis.

En HPLC se calcula como el valor que tenga una relación señal:ruido de 10:1 (Parker, 1991).

Tanto para el límite de detección como el de cuantificación, se midieron las alturas de los picos obtenidos en la curva de cada carotenoide. La medición se hizo con un escalímetro, en la escala 1:33 1/3, por ser una medida más exacta que la común de 1:100, que es en milímetros. Para obtener alturas mayores a bajas concentraciones, los cromatogramas se imprimieron a una atenuación de 1, que es la más baja con la que se puede trabajar en el equipo.

Para obtener tanto el límite de detección como el de cuantificación, es necesario obtener la ecuación correspondiente a la recta que relaciona concentración ( $x$ ), con la razón señal/ruido ( $y$ ). Al substituir el valor de  $y$  por 3, se obtiene un valor de  $x$  que corresponde al límite de detección; y al substituir el valor de  $y$  por 10, se obtiene un valor de  $x$  que corresponde al límite de cuantificación.

## VIII. RESULTADOS

### A. PURIFICACION DE PATRONES

Los carotenoides se identificaron en base a cuatro parámetros:

1. Orden de elución en la columna
2. Espectros de absorción
3. Pruebas espectrofotométricas
4. Cromatografía en capa fina

#### 1. Orden de elución en la columna

Con base en la experiencia obtenida después de realizar repeticiones de diferentes muestras, y con ayuda de los espectros de absorción, se logró identificar el orden de elución de los carotenoides en cromatografía en columna abierta, usando MgO:Hyflosuper cel como fase estacionaria.

**CUADRO I.** ORDEN DE ELUCION DE LOS CAROTENOIDES EN COLUMNA EMPACADA CON MgO:HYFLOSUPER CEL (1:2)

Carotenoide	Porcentaje de acetona en éter de petróleo
$\alpha$ -caroteno	3
$\beta$ -caroteno	5 - 8
$\beta$ -criptoxantina	15 - 20
neoxantina	20
violaxantina	35
luteína	40
zeaxantina	40
licopeno	70 - 100

## 2. Espectros de absorción

Según los datos de máximos de absorción recopilados por Davies (1976), se identificaron cada una de las bandas obtenidas en la cromatografía en columna. Los máximos de absorción de las bandas obtenidas de mezclas de vegetales y de papaya fueron:

**CUADRO II. MAXIMOS DE ABSORCION OBTENIDOS EN LA PURIFICACION DE PATRONES**

Carotenoide	Solvente	Longitud de onda (nm)								
		Referencia (Davies, 1976)			Patrones comerciales			Patrones aislados de vegetales		
Luteína	Etanol	422	445	474	(418)	445	473	(421)	447	472
Zeaxantina	Etanol	(428)	451	478		453	478		449	475
Licopeno	Cloroformo	458	484	518	456	483	516	456	483	516
$\beta$ -criptoxantina	Cloroformo	(435)	459	485	(438)	462	489		462	490
$\alpha$ -caroteno	Eter de petróleo	422	444	473	421	444	473	420	443	471
$\beta$ -caroteno	Eter de petróleo	(425)	448	475	(423)	449	476	(422)	448	475
Neoxantina	Etanol	415	438	467				415	437	465

Los datos que se encuentran entre paréntesis corresponden a hombros, y no a picos definidos.

En las **FIGURAS I - VI** del Anexo III se encuentran los espectros de absorción obtenidos para patrones comerciales, y en las **FIGURAS VII - XII**, se encuentran los espectros de absorción obtenidos para los carotenoides aislados durante la investigación.

## 3. Pruebas espectrofotométricas

En algunos casos en que se tenía dudas acerca de la identidad de un carotenoide, se realizaron dos pruebas espectrofotométricas básicas:



a. Prueba de la configuración electrónica:

Al reaccionar con yodo, los enlaces que se encuentran en posición *trans* cambian a su isómero *cis*, que es más estable. El hecho de que la estereomutación *trans-cis* se lleve a cabo, se observa por la disminución de 4 nm en el máximo de absorción, sin que la forma del espectro cambie. En el caso específico del licopeno, no se observó ninguna disminución en la posición del máximo de absorción; por lo que se concluye que se aisló en forma *cis*.

En las **FIGURAS XIII y XIV** del Anexo III se puede observar que no hay cambio significativo en el máximo de absorción del  $\beta$ -caroteno, lo que indica que éste carotenoide se encuentra en su forma *cis*.

b. Prueba para grupos epóxidos:

En presencia de ácido, los grupos epóxido tienden a romperse. Sin embargo, en el caso de estructuras similares a los carotenoides donde la estereoposición de la cadena permite la formación de un enlace más estable, puede darse solamente el cambio de posición del grupo epóxido.

Así, los epóxidos 5,6- se transforman en 5,8- al reaccionar con HCl. La reacción se evidencia en el espectro de absorción por un desplazamiento hipsocrómico de 17 a 22 nm. Se realizaron pruebas para determinar la identidad de la neoxantina y la violaxantina, que tienen grupos epóxidos; en éste caso se recurrió a ésta prueba específica, ya que su orden de elución en la columna, sus espectros de absorción y sus tiempos de retención son similares a la luteína y a la zeaxantina; pero estos últimos no poseen grupos epóxidos.

En las **FIGURAS XV y XVI** del Anexo III se encuentran los espectros de absorción obtenidos para la neoxantina y para la prueba que se llevó a cabo con HCl: se observó una disminución de 14 nm en el máximo de absorción, por lo cual se concluye que el carotenoide presenta un grupo epóxido.

c. Prueba para grupos HO- alílicos secundarios:

Los grupos HO- adyacentes a grupos alílicos reaccionan con metanol en presencia de ácido para formar grupos metóxido (MeO-), que no permiten una mayor conjugación de los pares electrónicos por el efecto de hiperconjugación de los hidrógenos del grupo metilo. Este movimiento de electrones se refleja en un movimiento hipsocrómico hacia el azul.

Esta prueba ayuda a diferenciar entre luteína y zeaxantina.

Esta prueba solamente fue confirmatoria ya que la mayoría de vegetales solo contienen luteína. Los únicos alimentos que contienen estos carotenoides juntos son el maíz y el durazno.

#### 4. Cromatografía en capa fina

Solo se utilizó para diferenciar entre carotenos y xantofilas, ya que con las pruebas realizadas, usando metanol-éter de petróleo ó acetona-éter de petróleo como fase móvil, solo se logró que los carotenos eluyan con el frente del solvente, y las xantofilas queden casi en el origen de la aplicación a la placa.

También se utilizó para evidenciar la presencia de epóxidos, que toman una coloración azul-verdosa al exponer la placa a vapores de HCl. Sin embargo, la prueba espectrofotométrica para los epóxidos se considera más confiable debido a que no depende solamente de un cambio de color, sino que éste cambio se puede graficar por el espectro de absorción.

## B. FUENTES DE CAROTENOIDES

Se realizaron pruebas para aislar patrones a partir de los siguientes vegetales: espinaca, chaya, zanahoria y tomate para obtener luteína y  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos. Para licopeno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina fueron a partir de papaya.

Según los resultados obtenidos en las pruebas, se logró establecer los alimento que son la mejor fuente para aislar patrones:

**CUADRO III. FUENTES DE CAROTENOIDES PARA AISLAMIENTO DE PATRONES**

Carotenoide	Vegetal o fruta	Concentración aproximada obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )
Luteína	Espinaca	150
Zeaxantina	Papaya	80
$\beta$ -criptoxantina	Papaya	80
Licopeno	Papaya	200
$\alpha$ -caroteno	Zanahoria	400
$\beta$ -caroteno	Espinaca o zanahoria	500

## C. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES PARA LA CROMATOGRAFIA

### 1. Columna

En el laboratorio se contaba con la columna Supercosil LC-18-5 de 5  $\mu\text{m}$ ; que, según los reportes del artículo de Epler *et al.* (1992), esta columna tiene fase estacionaria intermedia y en ella se pueden separar  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, pero difícilmente se logra separar luteína y zeaxantina. Sin embargo, se realizaron algunas pruebas para separar éstas dos xantofilas, sin lograr ningún resultado positivo.

## 2. Composición de la fase móvil

En base a los solventes más comunes reportados, que se utilizan en los métodos HPLC para carotenoides, se inició las pruebas con una fase móvil de diclorometano:metanol:acetonitrilo 20:5:75. Esta fase no proporciona una separación absoluta entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos. Se ensayó también utilizar una composición 17:8:75 con estos mismos solventes, pero tampoco se consideró adecuada debido a que separa los carotenos, pero deforma los picos de las xantofilas.

Se realizaron pruebas con otra fase móvil que combina diclorometano, metanol y tetrahidrofurano, sin obtener mayor diferencia con respecto a la fase anterior.

La tercera composición de solventes que se ensayó fue metanol:tetrahidrofurano, con proporciones desde 90:10 hasta 87:13; ésta última proporciona la mejor separación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos con una resolución de 0.7205.

En las **FIGURA XVII** del Anexo III, se ejemplifica un cromatograma obtenido en el análisis de muestras: en el tiempo 3.941 minutos se encuentra Luteína + Zeaxantina, en el tiempo 9.820 minutos se encuentra la  $\beta$ -criptoxantina, en el 21.654 el Licopeno, y en 24.364 y 25.829 se encuentran  $\alpha$ - y  $\beta$ - carotenos respectivamente.

## 3. Longitud de onda

Se trabajó el análisis a una longitud de onda fija de 450 nm. Se eligió este valor debido a que en éste punto se encuentra el pico máximo de absorción en la mayoría de los carotenoides de interés.

## 4. Velocidad del flujo

El flujo de 1.5 ml/min se utilizó debido a que proporciona una buena separación entre picos, sin hacer el tiempo final de cada análisis excesivamente largo: 25 minutos.

## D. OPTIMIZACION DEL METODO

Según se indica en el procedimiento, se realizaron comparaciones entre los cinco pasos que variaban de un método a otro. Las comparaciones se realizaron en base a la concentración obtenida para cada carotenoide.

**CUADRO IV. COMPARACION ENTRE METODOS DE ANALISIS DE CAROTENOIDES**

Paso	Variables				Paso elegido
	1	2	3	4	
Solvente de extracción	Acetona	MeOH:THF (1:1)			MeOH:THF (1:1)
Cambio de un solvente polar a éter de petróleo	Adición por fracciones	Adición del extracto completo			Adición por fracciones
Solvente de saponificación	MeOH:THF (1:1)	Eter de petróleo	Diclorometano		Éter de petróleo
Tiempo de saponificación	1 hora	3 horas	5 horas	18 horas	3 horas
Solvente de inyección	MeOH:THF (1:1)	Etanol	Cloroformo	Acetona	MeOH:THF (1:1)

Los resultados estadísticos se encuentran en los **CUADRO I al V** del Anexo II.

### E. METODO

En el Anexo IV, se transcribe el método implementado, que incluye las correcciones efectuadas a partir de la validación.

## F. VALIDACION DEL METODO

En cuanto a la validación del método, se determinaron los siguientes puntos:

### 1. Exactitud

**CUADRO V. PORCENTAJES DE RECUPERACION EN VEGETALES**

Carotenoide	Porcentajes de recuperación (%)				
	Experimentos			Media $\pm$ DS	CV (%)
	1	2	3		
Luteína	113	103	103	106 $\pm$ 4	4
$\beta$ -Criptoxantina	81	95	85	87 $\pm$ 6	7
Licopeno	86	84	86	85 $\pm$ 1	1
$\alpha$ -Caroteno	104	95	97	98 $\pm$ 4	4
$\beta$ -Caroteno	91	96	95	94 $\pm$ 2	3

**CUADRO VI. PORCENTAJES DE RECUPERACION EN FRUTAS**

Carotenoide	Porcentajes de recuperación en frutas (%)				
	Experimentos			Media $\pm$ DS	CV (%)
	1	2	3		
Luteína	79	78	57	71 $\pm$ 10	14
$\beta$ -Criptoxantina	75	60	92	76 $\pm$ 13	17
Licopeno	81	104	73	83 $\pm$ 16	19
$\alpha$ -Caroteno	85	64	67	72 $\pm$ 9	13
$\beta$ -Caroteno	88	85	87	87 $\pm$ 1	1

## 2. Precisión

CUADRO VII. VARIACION INTRAENSAYO EN VEGETALES

Réplica	Carotenoide ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento)				
	Luteína	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno
1	712	814	102	360	1152
2	620	547	57	254	853
3	601	620	77	327	1042
4	736	691	63	333	1082
5	711	566	68	400	1132
6	621	617	88	303	939
Media $\pm$ DS	667 $\pm$ 54	643 $\pm$ 89	76 $\pm$ 15	329 $\pm$ 45	1034 $\pm$ 106
CV (%)	8	14	20	14	10

CUADRO VIII. VARIACION INTERENSAYO EN VEGETALES

Día	Carotenoide ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento)				
	Luteína	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno
1	667 $\pm$ 54	643 $\pm$ 89	76 $\pm$ 15	329 $\pm$ 45	1034 $\pm$ 106
2	615 $\pm$ 86	685 $\pm$ 27	61 $\pm$ 11	414 $\pm$ 54	865 $\pm$ 50
3	618 $\pm$ 96	618 $\pm$ 49	47 $\pm$ 2	289 $\pm$ 18	856 $\pm$ 56
Media $\pm$ DS	633 $\pm$ 24	648 $\pm$ 28	62 $\pm$ 12	344 $\pm$ 52	918 $\pm$ 82
CV (%)	4	4	19	15	9

**CUADRO IX. VARIACION INTRAENSAYO EN FRUTAS**

Réplica	Carotenoide ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de alimento)			
	Luteína	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	$\beta$ -caroteno
1	108	103	815	26
2	150	116	789	30
3	108	93	689	24
4	124	88	616	23
5	104	85	671	21
6	134	99	759	21
Media $\pm$ DS	121 $\pm$ 17	97 $\pm$ 10	723 $\pm$ 70	24 $\pm$ 3
CV (%)	14	11	10	13

**CUADRO X. VARIACION INTERENSAYO EN FRUTAS**

Día	Carotenoide ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de alimento)			
	Luteína	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	$\beta$ -caroteno
1	121 $\pm$ 17	97 $\pm$ 10	723 $\pm$ 70	24 $\pm$ 3
2	96 $\pm$ 9	90 $\pm$ 4	698 $\pm$ 45	21 $\pm$ 0.5
3	115 $\pm$ 18	89 $\pm$ 10	761 $\pm$ 91	27 $\pm$ 4
Media $\pm$ DS	111 $\pm$ 11	92 $\pm$ 4	728 $\pm$ 26	24 $\pm$ 3
CV (%)	10	4	3	11

### 3. Linealidad, límites de detección y cuantificación

Las inyecciones de las soluciones se llevaron a cabo en atenuación 1, y a la sensibilidad más baja del detector: 0.002 UA/mV.



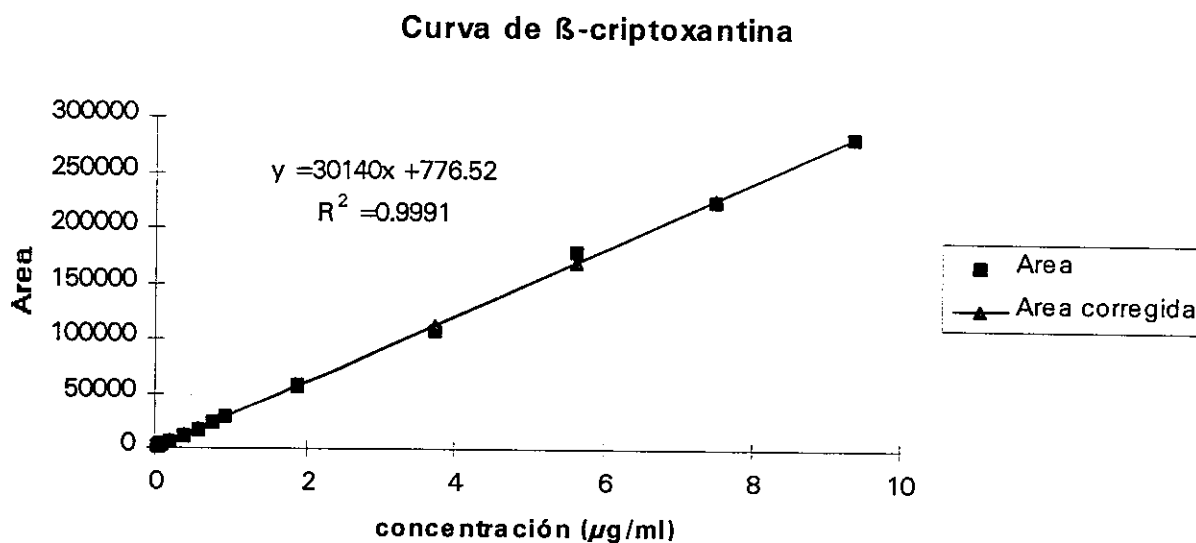
Las concentraciones exactas de las soluciones se determinaron en base a los datos obtenidos a partir de su espectro de absorción.

El procedimiento seguido para los cálculos del intervalo lineal, y los límites de detección y cuantificación, se ejemplifica usando los resultados obtenidos para la  $\beta$ -criptoxantina.

Los resultados obtenidos para los otros carotenoides, se tabulan en los **CUADROS VI al XII** del Anexo II, y se grafican en las **FIGURAS 1 al VI**, también en el Anexo II.

**CUADRO XI. CURVA DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
0.019	1711
0.037	2422
0.056	3150
0.093	3954
0.19	6095
0.37	11044
0.56	16469
0.75	22825
0.93	29599
1.87	58208
3.74	107992
5.60	177311
7.47	223753
9.34	281504
Ecuación: $y = (30140 \pm 256) x + (776 \pm 952)$	
Coeficiente de correlación: 0.9996	
Grados de libertad: 13	



**CUADRO XII.** CURVA DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA, RELACION CONCENTRACION:AREA:SEÑAL/RUIDO

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Altura (escala 1:33 1/3)	Razón Señal/ruido
0.0	0	0
0.019	4	0.57
0.037	13	1.8
0.056	15	2.1
0.093	21	3.0
0.19	40	5.7
0.37	83	11.9
0.56	124	17.7
0.75	171	24.4
0.93	207	29.6
Ecuación: $y = (31.75 \pm 0.38) x + (0.14 \pm 0.18)$		
Grados de libertad: 9		

**CUADRO XIII. LINEALIDAD Y LIMITES DE DETECCION Y CUANTIFICACION**

Carotenoide	Linealidad			Límite de detección		Límite de cuantificación	
	Ecuación	grados de libertad	coeficiente de correlación (r)	1. (µg/ml)	2. (mg/100 g)	1. (µg/ml)	2. (mg/100 g)
Luteína	$y = (15682 \pm 253) x + (1629 \pm 1047)$	12	0.9986	1. 0.043	2. 0.0043	1. 0.19	2. 0.019
β-Criptoxantina	$y = (30140 \pm 256) x + (777 \pm 952)$	13	0.9996	1. 0.089	2. 0.0089	1. 0.31	2. 0.031
Licopeno	$y = (11796 \pm 174) x - (1904 \pm 819)$	7	0.9993	1. 0.18	2. 0.018	1. 0.88	2. 0.088
α-Caroteno	$y = (16528 \pm 460) x - (2189 \pm 1985)$	6	0.9981	1. 0.38	2. 0.038	1. 1.2	2. 0.12
β-Caroteno	$y = (17724 \pm 207) x - (730 \pm 563)$	8	0.9995	1. 0.28	2. 0.028	1. 0.83	2. 0.083

## IX. DISCUSION

Los resultados que se obtuvieron al aislar patrones, fueron satisfactorios; ya que se logró aislarlos con un alto grado de pureza. Sin embargo, la cantidad que se obtiene de cada carotenoide, depende de la matriz utilizada. Además, la concentración no es reproducible debido a la variabilidad entre alimentos, ya que la cantidad de carotenoides dependen del suelo, grado de madurez, del vegetal o fruta, el clima, las condiciones a las que han estado expuestas y otros factores.

Para aislar los carotenoides no se tomó en cuenta la especie, debido a que lo que se buscaba era que el método pudiera aplicarse a cualquier tipo de alimento. Los únicos parámetros que se tomaron en cuenta para elegir el alimento, fueron que estuviera fresco, y que su color fuera intenso.

Al final se determinó que los alimentos más adecuados para obtener patrones eran espinaca, zanahoria y papaya, tal como se indica en el CUADRO III de los Resultados. Esto se determinó con base en:

- a. La facilidad adquisitiva del alimento
- b. La mayor facilidad de extracción
- c. La concentración más alta

Para almacenar los carotenoides aislados, se tomaron las siguientes precauciones: mantenerlos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , adicionarles BHT (1%) como antioxidante y guardarlos bajo atmósfera de nitrógeno. Bajo éstas condiciones los patrones permanecían razonablemente estables utilizándolos tres veces por semana, durante aproximadamente dos meses. La degradación se verificaba por la aparición de picos correspondientes a impurezas, en los cromatogramas respectivos. Debido a esta degradación, con la extracción de 40 gramos espinaca y 80 gramos de papaya, se obtenía la cantidad suficiente de patrones para dos meses de trabajo.

Con la columna que se tenía para montar y validar el método, no es posible lograr una separación para luteína y zeaxantina, por lo que la hipótesis de la investigación se rechaza: solo se pueden separar cinco carotenoides de los seis propuestos, además, la separación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos, no fue óptima: la resolución, obtenida con la fórmula

$$R = \frac{2 (tr_2 - tr_1)}{Wb_2 - Wb_1}$$

fue de 0.7205 entre los carotenos, éste resultado se esperaba que fuese lo más cercano a 1, para una separación total entre dos compuestos.

La luteína y la zeaxantina será reportada siempre como luteína, y se cuantifica con base en ésta solamente.

Según los resultados que se observan en los **CUADROS I a V** del Anexo II. se evaluaron las diferencias entre los métodos más comunes para el análisis de carotenoides, reportados en la literatura. Solamente se eligió el paso en base a su menor variación y la mayor cantidad de carotenoides reportados en el análisis. En algunos casos, estos parámetros no coinciden para todos los carotenoides, entonces se tomó el que favoreciera a la mayoría de ellos.

Para determinar los porcentajes de recuperación, lo ideal es contar con muestras que no contengan el analito que se desea encontrar, es difícil encontrar un vegetal o fruta que no contenga carotenoides. por lo que se optó por utilizar alguno que tuviera muy poco, se eligió camote para los vegetales, y papaya para las frutas, procurando en éste caso, que su coloración fuere la más pálida posible.

La exactitud en las frutas no se determinó para al  $\alpha$ -caroteno, debido a que, según las tablas de composición de alimentos, no se encuentra en cantidades cuantificables.

Se puede observar una variabilidad entre los resultados obtenidos: la recuperación de frutas, es menor que para vegetales, y su coeficiente de variación (CV (%)) es mayor. Esto se debe a que las frutas llevan el proceso de saponificación con KOH, el que puede producir algún tipo de degradación en los carotenoides.

En general, se puede observar que la variación intraensayo es mayor que la variación interensayo, lo que se debe a que, en ésta última, los promedios de cada día permiten cierta compensación entre los datos, lo cual no se da en la variación intraensayo. Esto se debe a que la homogenización de la muestra utilizando la Bati-Max, no es efectiva. Sin embargo, éste equipo fue el que mejor se adaptó a las necesidades del método: por el hecho de que la extracción se lleva a cabo utilizando solventes, no se puede usar una licuadora o cualquier equipo que tenga partes plásticas.

En el caso de las alturas de los picos cromatográficos, se utilizó una escala 1:33  $1/3$ , debido a que permite diferenciar entre mediciones muy cercanas, lo que la escala 1:100 no permite. En el caso de la linealidad, el número de puntos utilizados estaba limitado para que el tamaño del pico no fuera mayor que los márgenes utilizados en la hoja de impresión del cromatograma. Se utilizó la atenuación más baja, 1, que permite detectar cantidades más pequeñas.

## X. CONCLUSIONES

1. El método que se montó es eficiente para la separación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, y licopeno. Sin embargo, con la columna utilizada, no es posible lograr la separación entre luteína y zeaxantina. Con estos resultados, se debe rechazar la hipótesis planteada para la investigación.
2. Los alimentos que se consideran más apropiados para aislar carotenoides, son espinaca, zanahoria y papaya.
3. Si los patrones de carotenoides se almacenan en recipientes protegidos de la luz, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y bajo atmósfera de nitrógeno, se mantienen en condiciones razonablemente estables, por dos meses.
4. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los carotenoides en alimentos son:

Carotenoide	Porcentajes de recuperación (%)	
	Vegetales	Frutas
Luteína	$106 \pm 4$	$71 \pm 10$
$\beta$ -Criptoxantina	$87 \pm 6$	$76 \pm 13$
Licopeno	$85 \pm 1$	$83 \pm 16$
$\alpha$ -Caroteno	$98 \pm 4$	$72 \pm 9$
$\beta$ -Caroteno	$94 \pm 2$	$87 \pm 1$

## XI. RECOMENDACIONES

1. En la medida de las posibilidades del laboratorio que vaya a utilizar éste método, experimentar el análisis con una columna polimérica para lograr separación entre luteína y zeaxantina. En el artículo publicado por Epler *et al* (1992), hay un listado de las que ellos evaluaron y cumplen con ésta característica.
2. Validación con participación en estudios colaborativos interlaboratorios.

## XII. REFERENCIAS

1. ADEWUSI, Steve R.A. y Howard Bradbury. Carotenoids in Cassava: Comparison of Open-Column and HPLC Methods of Analysis. *J. Sci. Food Agric.* **62**: 375-383, 1993.
2. BENDICH, Adrienne y James Allen Olson. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* **3**: 1927-1932, 1989.
3. BRUSHWAY, R.J. Separation of Carotenoids in fruits and vegetables by High Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **8** (8): 1527-1547, 1985.
4. BUSHWAY, R. J. y A. M. Wilson. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **15**: 165-169, 1982. Citado en RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* **5**: 191-225, 1989.
5. CLYDESDALE, Y. Francis. Pigments. En Principles of food science. New York, Marcel Dekker, 1976. Part 1. pp 417-425.
6. CHEN, B. H. y S.H. Yang. An improved analytical method for the determination of carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. *Anal. Chem.* **44**: 61-66, 1992.
7. CRAFT, Neal E. Carotenoid Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Methods: Reference Compendium. En Methods in Enzymology. 1992. Vol. 213. pp 185-205.
8. DAVIES, B.H. Carotenoids. En Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 2 ed. London, Academic Press, 1976. Vol. 2. pp 38-165.
9. DI MASCIO, P., M. E. Murphy y H. Sies. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* **53**:194S-200S, 1991. Citado en Scott, J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.* **45**: 357-364, 1992.



10. EPLER, Katherine, L. C. Sander, R. G. Ziegler, S. A. Wise y N. E. Craft. Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *J. Chromatogr.* **595**: 89-101, 1992.
11. FAO/WHO Expert Consultation. Requirements of vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B<sub>12</sub>. Roma, Food and Agriculture Organization of The United Nations, 1988. pp 21-29.
12. GAYLE, K. G., T. Chen y T. Philip. Quantitative Analysis of Carotenoids and Carotenoid Esters in Fruits by HPLC: Red Bell Peppers. *J. Food Sci.* **52**(4): 1071-1073, 1987.
13. GOODWIN, T.W. Carotenoids. En Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. London, Academic Press, 1965. pp 112-137.
14. HART, David y K. J. Scott. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* **54**: 101-111, 1995.
15. HSIEH, Y. P. C. y M. Karel. Rapid extraction and determination of  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenes in foods. *J. Chromatogr.* **259**:515-518, 1983. Citado en RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* **5**: 191-225, 1989.
16. KIMURA, Mieko, D. Rodríguez-Amaya y H. Godoy. Assessment of the Saponification Step on the Quantitative Determination of Carotenoids and Provitamins A. *Food Chem.* **35**: 187-195, 1990.
17. KHACHIK, Frederick, G. Beecher & N. Whittaker. Separation, Identification and Quantification of the Major Carotenoid and Chlorophyll Constituents in Extracts of Several Green Vegetables by Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **34**(4): 603-616, 1986.
18. KHACHIK, Frederick, M. B. Goli, G. R. Beecher, J. Holden, W. R. Lusby, M. D. Tenorio y M. Barrera. Effect of Food Preparation on Qualitative and Quantitative Distribution of Major Carotenoid Constituents of Tomatoes and Several Green Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **40**(3): 390-398, 1992.

19. KRINSKY, Norman. Carotenoids and cancer in animal models. *Am. Inst. Nutr.* 119:123-126, 1989.
20. LATINFOODS. Memorias de la primera reunión sobre tablas de composición de alimentos. Latinfoods, 11-14 Nov. 1986. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 37 (4): 609-810, 1986.
21. MANGLES, Ann Reed, J. M. Holden, G. Beecher, M. Forman y E. Lanza. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.* 93: 284-296, 1993.
22. MINGUEZ-MOSQUERA, Isabel, B. Gandul-Rojas y L. Gallardo-Guerrero. Rapid Method of Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Virgin Olive Oil by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 40(1): 60-63, 1992.
23. MORRIS, Richard, et al. Catalog Handbook of Fine Chemicals: Aldrich. 1996-1997.
24. NELLS, H. J. y A. P. De Leenheer. Isocratic Nonaqueous Reversed-Phase Liquid Chromatography of Carotenoids. *Anal. Chem.* 55: 270-275, 1983.
25. OFFICIAL Methods of Analysis of the AOAC. 14 ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1984. pp 834-835.
26. OLSON, James A. Vitamin A. En Present Knowledge in Nutrition. 6 ed. Washington, D.C., International Life Sciences Institute, 1990. pp 96-107.
27. PARQUER, Gail Abbott. Validation of Methods Used in the Florida Department of Agriculture and Consumer Services' Chemical Residue Laboratory. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(5): 868-872, 1991.
28. QUACKENBUSH, Forrest, y Robert Smallidge. Nonaqueous Reverse Phase Liquid Chromatography System for Separation and Quantitation of Provitamins A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69(5): 767-772, 1986.

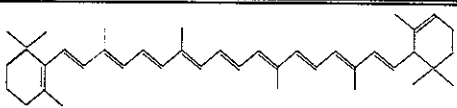
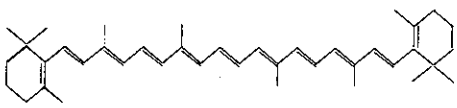
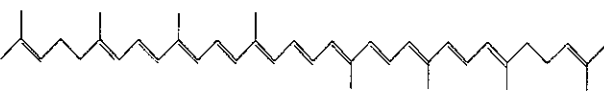
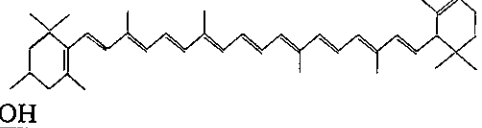
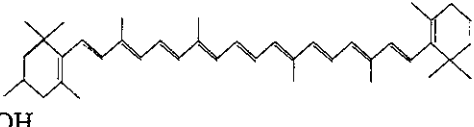
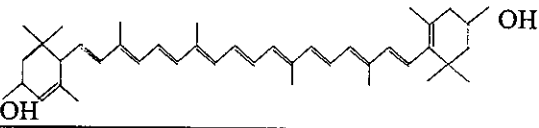
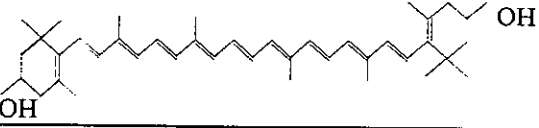
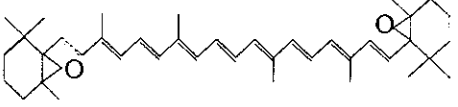
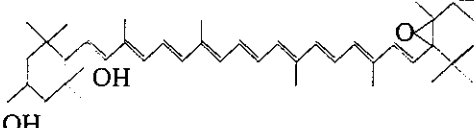
29. RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* **5**: 191-225, 1989.
30. RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. y Jaime Amaya-Farfán. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **42**(2):180-191, 1992.
31. RODRIGUEZ-AMAYA, Delia, M. Kimura, H. T. Godoy y H. K. Arima. Assessment of Provitamin A Determination by Open Column Chromatography / Visible Absorption Spectrophotometry. *J. Chromatogr. Sci.* **26**(12): 624-629, 1988.
32. SCOTT, K. J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.* **45**: 357-364, 1992.
33. SCOTT, K. J. y D. J. Hart. Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC - 2: Column temperature. *Food Chem.* **47**: 403-405, 1993.
34. SPEEK, A. J., C. R. Temelilwa y J. Shrijever. Determination of  $\beta$ -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem.* **19**:65-74, 1986. Citado en Rodríguez-Amaya, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* **5**: 191-225, 1989.
35. STEWART, I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**:132-136, 1977. Citado en Rodríguez-Amaya, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* **5**: 191-225, 1989
36. TEE, E-Siong y C. Lim. The analysis of Carotenoids and Retinoids: a review. *Food Chem.* **41**:147-192, 1991.
37. TEE, E-Siong. Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* **31**(1/2): 103-163, 1992.

38. WOLF, Ron, T. Cori y Pete Gleich. Catalog Sigma. 1995.
39. ZAKARIA, M., K. L. Simpson, P. R. Brown y A. Krstulovic. Use of reversed-phase, high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J. Chromatogr.* 176:109-117, 1979. Citado en Rodríguez-Amaya, Delia B. Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutrient Anal.* 5: 191-225, 1989.

### XIII. ANEXOS

#### A. ANEXO I

CUADRO I. PRINCIPALES CAROTENOIDES ENCONTRADOS EN LOS ALIMENTOS.

CAROTENOIDES	ESTRUCTURA
$\alpha$ -caroteno (Precursor de vitamina A)	
$\beta$ -caroteno (Precursor de vitamina A)	
Licopeno	
$\alpha$ -criptoxantina (Precursor de vitamina A)	 OH
$\beta$ -criptoxantina (Precursor de vitamina A)	 OH
Luteína	 OH OH
Zeaxantina	 OH OH
Violaxantina	 O
Neoxantina	 OH OH

**CUADRO II.** ACTIVIDAD PROVITAMINA A DE ALGUNOS CAROTENOIDES (Tee, 1992).

CAROTENOIDE	ACTIVIDAD (%)
$\alpha$ -caroteno	50 - 54
$\beta$ -caroteno	100
$\gamma$ -caroteno	42-45
$\beta$ -zeacaroteno	20 - 40
5,6-monoepoxi- $\beta$ -caroteno	21
$\beta$ -criptoxantina	50-60
$\beta$ -isocriptoxantina	48
$\beta$ -apo-8-carotenol	72

**CUADRO III. REQUERIMIENTOS DIARIOS DE VITAMINA A (ER/DIA) (FAO/WHO, 1988).**

Grupo	Edad (años)	Requerimiento basal	Nivel seguro de ingesta
Infantes	0 - 1	180	350
Niños	1 - 10	200 - 250	400
Mujeres	10 - 70	270	500
	embarazadas	+ 100	+ 100
	lactantes	+ 180	+ 350
Hombres	10 - 70	300	500 - 600

CUADRO IV. CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (Mangles *et al.*, 1993).

Alimento	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína + zeaxantina
Manzana	0	26	0	0	0
Brócoli	36	700	0	0	1900
Calabaza	1	15	0	0	26
Zanahoria	3600	7900	0	0	260
Maíz amarillo	50	51	0	0	780
Arvejas	44	630	0	0	740
Mango	0	1300	54	0	0
Aceituna verde	0	280	19	0	510
Papaya	0	99	470	0	0
Durazno	0	99	42	0	14
Espinaca	0	4100	0	0	102000
Camote	0	8900	0	0	0
Tomate	0	520	0	3100	100



CUADRO IV. CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) (Mangles *et al.*, 1993).

Alimento	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína + zeaxantina
Manzana	0	26	0	0	0
Brócoli	36	700	0	0	1900
Calabaza	1	15	0	0	26
Zanahoria	3600	7900	0	0	260
Maíz amarillo	50	51	0	0	780
Arvejas	44	630	0	0	740
Mango	0	1300	54	0	0
Aceituna verde	0	280	19	0	510
Papaya	0	99	470	0	0
Durazno	0	99	42	0	14
Espinaca	0	4100	0	0	102000
Camote	0	8900	0	0	0
Tomate	0	520	0	3100	100

CUADRO V: INFORMACION REFERENTE A PATRONES.

Carotenoide	Obtención	Soluciones	Estabilidad	Referencia
$\alpha$ - y $\beta$ -carotenos, $\beta$ -criptoxantina		Se disuelven 25 mg del patrón en 100 ml de THF	De 6 a 8 meses a $-20^{\circ}\text{C}$ .	(Bushway, 1985)
$\alpha$ -, $\beta$ - y <i>cis</i> - $\beta$ - carotenos		Se disuelven en cloroformo y se llevan a volumen con hexano.	Se almacena a $-18^{\circ}\text{C}$	(Hart & Scott, 1995)
Equinonona y $\beta$ - criptoxantina		Se disuelven en cloroformo:hexano 1:1.	Se almacenan a $-18^{\circ}\text{C}$	(Hart & Scott, 1995)
Licopeno		Se disuelve en cloroformo.	Se divide en alícuotas de 1 ml y se seca con nitrógeno. Se almacena a $-18^{\circ}\text{C}$ .	(Hart & Scott, 1995)
Carotenoides	Se cromatografían en placas C-18, eluyendo con MeOH:acetonitrilo:hexano:cloruro de metileno (15:80:2.5:2.5). Se recromatografían en placas de sílica gel, eluyendo con éter de petróleo:acetona (2:1)			(Kimura, Rodríguez-Amaya & Godoy, 1990)
Carotenoides	Saponificar con KOH metanólico, luego los patrones se separan en una placa de sílica gel, eluyendo con éter de petróleo:acetona:dielilamina (10:4:1). Luego se purifican: el $\beta$ -caroteno en éter de petróleo, la luteína con diclorometano:acetato de etilo (4:1), violaxantina y neoxantina por benceno:acetona (4:1).			(Kimura, Rodríguez-Amaya & Godoy, 1990)

CUADRO VI: METODOS HPLC PARA DETERMINACION DE CAROTENOIDES.

Muestra: Carotenoides	Preparación de la muestra	Fases móvil y estacionaria	Identificación	Cuantificación	Referencia
Jugo de naranja: $\alpha$ - caroteno, $\beta$ - caroteno, $\beta$ - criptoxantina	Extracción con DCM:MeOH, con MgCO <sub>3</sub> agitar 2 horas, filtrar. Transferir a hexano, secar, redissolver en éter, saponificar 2 horas. Secar y disolver en benceno con BHT.	Gradiente de acetona y hexano; MgO.	Espectros de absorción, $\alpha$ - y $\beta$ -carotenos por cromatografía y $\beta$ - criptoxantina por espectroscopia de masas.	Curvas de calibración de cada carotenoide (áreas), aislados por HPLC y cuantificado por absorbancia a 440 nm.	Stewart, 1989
Tomate: $\beta$ - caroteno.	Saponificación por 14 horas a temperatura ambiente, dejar que precipite en EP a 10°C, filtrar.	8% CHCl <sub>3</sub> en CH <sub>3</sub> CN, Partisil-PXS-5/ODS	Tiempos de retención comparado con un patrón. Espectro de absorción visible.	Curva de calibración con patrón de $\beta$ - caroteno (áreas), detector a 470 nm.	Rodríguez- Amaya, 1989
Zanahoria, papa, arándanos: $\alpha$ - y $\beta$ - carotenos.	Extracción con THF, MgCO <sub>3</sub> y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , cambiar a EP(solo para papa y arándanos), secar, disolver en THF.	CH <sub>3</sub> CH:THF:H <sub>2</sub> O (85:12.5:2.5), Partisil 5 ODS.	Tiempos de retención comparados con patrones, comparación de Rf's en dos sistemas de TLC, espectro de absorción visible.	Curvas de calibración de patrones (alturas), detector a 470 nm.	Bushway & Wilson, 1989
Zanahoria, tomate, glicey, cunote, durazno: $\alpha$ - y $\beta$ - carotenos.	Extracción con acetona:EP, agitar y centrifugar, evaporar la capa superior, redissolver en EP y filtrar.	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> CN (8:92), Bondapak C <sub>18</sub>	No descrito.	Usando patrones.	Hsieh & Karel, 1989

<p>Bruselas, arvejas, brócoli, calabaza, coliflor, lechuga, perejil, frijol, pimiento, maíz dulce, espinaca, cebolla y tomate: <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>-, cis-<math>\beta</math>-carotenos, luteína licopeno, <math>\beta</math>-criptoxantina, y zeaxantina.</p>	<p>10 g de muestra, 1 g de <math>MgCO_3</math>, extraer con THF:MeOH (1:1), adicionar el SI, extraer con 100 ml más. Cambiar a 50 ml de EP, evaporar y llevar a 5 ml con DCM. Saponificar con 5 ml de KOH 10% en MeOH, cambiar a 20 ml de EP, evaporar y llevar a volumen con DCM.</p>	<p>ACN:MeOH:DCM (75:20:5), Vydac 201TP54 5<math>\mu</math>.</p>	<p>Tiempos de retención, detección a 450 nm, con un detector de arreglo de diodos se determinó el espectro visible.</p>	<p>Comparando las áreas de los patrones con la de una muestra control de <math>\beta</math>-criptoxantina.</p>	<p>Hart &amp; Scott, 1995</p>
<p>Brócoli, calabaza, espinaca y brusela: neoxantina, violaxantina, luteína, <math>\beta</math>-caroteno.</p>	<p>20-150 g de muestra, 40 g de <math>Na_2SO_4</math>, 2 g de <math>MgCO_3</math>, se extraen con THF, se evapora y se pasa a éter de petróleo. Se evapora a sequedad y se reconstituye en hexano.</p>	<p>MeOH:ACN: <math>CH_2Cl_2</math>:Hexano (22:55:11.5:11.5), (15:80:2.5:2.5) y el gradiente de elución: 15:75:5:5, de 12 a 35 min. cambia a 15:40:22.5:22.5, Microsorb C18.</p>	<p>Espectros de absorción visible, reacciones químicas y espectroscopía de masas.</p>	<p>Por comparación de las áreas obtenidas por HPLC con las de los patrones aislados por TLC.</p>	<p>Khachik, Beecher &amp; Whittaker, 1986</p>
<p>Brócoli, espinaca, arvejas, tomates: neoxantina, luteína, licopeno, neorosporeno, <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>-, <math>\gamma</math>-y <math>\zeta</math>-carotenos.</p>	<p>60 - 100 g de muestra, se agrega el patrón interno. 6-10 g de <math>MgCO_3</math>, extraer con 500 ml de THF a 0°C, concentrar y cambiar a EP lavando con agua. Evaporar a sequedad y reconstituir en fase móvil.</p>	<p>Con gradiente de elución ACN:MeOH:DCM:hexano 85:10:2.5:2.5, a los 12 minutos se empieza a cambiar a 45:10:22.5:22.5 para completarlo en 40 minutos. Microsorb C18.</p>	<p>Espectros de absorción visible, reacciones químicas y espectroscopía de masas.</p>	<p>Por comparación de las áreas obtenidas por HPLC con las de los patrones aislados por TLC.</p>	<p>Khachik <i>et al</i>, 1992</p>

Hojas de papa, yuca, arvejas, glucos: $\beta$ -caroteno.	Saponificar en presencia de ascorbato de sodio y $\text{Na}_2\text{S}$ , reflujar a ebullición en baño de agua por 30 minutos, enfriar, extraer con éter diisopropílico. Lavar con solución de KOH, secar con papel blue-ribbon, redissolver en la fase móvil.	MeOH:CH <sub>3</sub> CN:CHCl <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O (200:250:90:11), ODS-Hypersil, 3 $\mu$ m.	No descrito.	Comparando con el patrón de $\beta$ -caroteno (altura)	Speck, Temelliwa & Shrijever, 1989
Yuca: $\alpha$ -, $\beta$ - $\zeta$ - y $\gamma$ -carotenos, $\beta$ -criptoxantina y luteína.	Extracción con acetona, cambiar a EP, concentrar a 10 ml.	CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub> :MeOH (70:20:10), Spherisorb ODS-2 5 $\mu$ .	Tiempos de retención comparados con patrones, detección a 450 y 340 nm.	Comparando con los patrones externos correspondientes (áreas), aislados por cromatografía en columna abierta.	Adewusi & Bredbury, 1993
Patrones de luteína, zeaxantina, cantaxantina, $\beta$ -criptoxantina. Equimenona, licopeno, toruleno, $\alpha$ - y $\beta$ -caroteno.		ACN:DCM (80:20), ACN:DCM:MeOH (70:20:10), ACN:Acetato de etilo (80:20), ACN:acetato de etilo:MeOH (70:20:10), Zorbax ODS (25 cm).	Tiempos de retención comparados con patrones, detección a 450 nm.		Nells & Leenheer, 1983
Jugo de naranja: $\beta$ -criptoxantina, $\alpha$ - y $\beta$ -caroteno y zeaxantina.	2-20 g de muestra, extraer. Reducir a sequedad. Adicionar 50 ml de etanol y 5 ml de KOH al 60%, y calentar 30 min. Extraer con hexano, secar y cambiar a columna de MgO. Secar y redissolver con cloroformo, agregar sudán I.	MeOH:CHCl <sub>3</sub> (94:6), Vydac 201TP, 5 $\mu$ .	Tiempos de retención comparados con patrones, detección a 475 nm.	Usando Sudán I como patrón interno (áreas).	Quacken bush & Smallidge, 1986

<p><math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-caroteno</p>	<p>10 g de muestra, 20 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g de MgCO<sub>3</sub> y 100 ml de THF, extraer. Llevar a 500 ml y evaporar 100 o 500 ml a 10 ml.</p>	<p>Isooctano:THF (99,5:0,5), Soherisorb alumina; ACN, MeOH, THF (50:35:15), Zorbax ODS 7-8<math>\mu</math>; ACN:MeOH:THF (40:52:8), Vydac 210TP54 5<math>\mu</math>; ACN:MeOH:THF (40:52:8), Vydac 218TP54 5<math>\mu</math>; ACN:MeOH:THF (58:35:7), NovaPak C18 4<math>\mu</math>; MeOH:CHCl<sub>3</sub> (90:10), Vydac 201TP54 5<math>\mu</math>; MeOH:THF (90:10), Vydac 201TP54 5<math>\mu</math>.</p>	<p>Tiempos de retención comparados con patrones, espectros visibles tomados de 470 a 450.</p>	<p>Bushway, 1985</p>
---	--	---	---	----------------------

**CUADRO VII: MAXIMOS DE ABSORCION DE CAROTENOIDES EN DIFERENTES SOLVENTES (Davies, 1976).**

CAROTENOIDE	MAXIMOS DE ABSORCION (nm)												
	HEXANO		ETER DE PETROLEO		ETANOL		ACETONA		CLOROFORMO		BENCENO		
Anteraxantina	(421)	445	470	422	445	472	422	444	472	430	456	484	
$\alpha$ -Caroteno	420	442	472	422	444	473	423	444	473	433	457	484	
$\beta$ -caroteno	(425)	450	477	(425)	448	475	(427)	449	475	435	461	485	(435)
$\beta$ -Caroteno 5,6-epóxido	423	444	473		447	478					459	492	460
$\tau$ -Caroteno	437	462	492	437	462	494	(440)	460	489	446	475	509	447
$\alpha$ -Criptoxantina	421	446	475										433
$\beta$ -Criptoxantina	(425)	446	475	(425)	449	476	(428)	449	473	(435)	459	485	
Luteína	420	445	475	421	445	474	422	445	474	435	458	485	433
Licopeno	448	473	504	446	472	505	446	472	503	458	484	518	455
Neoxantina	415	435	462	418	442	467	415	438	467	423	448	476	
Violaxantina		443	472	418	442	466	417	440	469	426	449	478	427
Zeaxantina	(426)	450	480	424	449	476	(428)	450	478	(434)	459	488	(440)

Los números encerrados en paréntesis indican que se trata de un hombro en el espectro de absorción.

**CUADRO VIII.: POSICION DEL PICO CIS EN ETER DE PETROLEO, COMPARANDO CON LA MAYOR LONGITUD DE ONDA DE LOS ISOMEROS TODO-TRANS (Davies, 1976).**

CAROTENOIDE	PICO CIS	DIFERENCIA (nm) ENTRE EL PICO CIS Y:	
		BANDA A MAYOR LONGITUD DE ONDA	$\lambda_{\max}$
Anteraxantina	331	141	115
$\alpha$ -Caroteno	331	143	114.5
$\beta$ -caroteno	338	142	114
$\beta$ -caroteno 5,6-epóxido	330	145	116
$\gamma$ -Caroteno	349	143	112
$\beta$ -criptoxantina	339	141	113
Luteína	331	143	114.5
Licopeno	362	141	111
Zeaxantina	336	144	116



CUADRO IX.  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  DE CAROTENOIDES (Davies, 1976).

CAROTENOIDE	SOLVENTE	$E^{1\%}_{1\text{ cm}}$	$\lambda$ (nm)
$\alpha$ -caroteno	Eter de petróleo	2800	444
$\alpha$ -caroteno	Hexano	2800	444
$\alpha$ -caroteno	Disulfuro de carbono	2180	477
$\beta$ -caroteno	Eter de petróleo	2592	453
$\beta$ -caroteno	Hexano	2592	453
$\beta$ -caroteno	Etanol	2620	453
$\beta$ -caroteno	Ciclohexano	2505	457
$\beta$ -caroteno	Cloroformo	2396	465
$\beta$ -caroteno	Disulfuro de carbono	2008	484
$\gamma$ -caroteno	Eter de petróleo	3100	462
$\gamma$ -caroteno	Hexano	2760	462
$\alpha$ -criptoxantina	Hexano	2636	446
$\alpha$ -criptoxantina	Benceno	2355	457
$\beta$ -criptoxantina	Hexano	2460	446
$\beta$ -criptoxantina	Cloroformo	2190	459
$\beta$ -criptoxantina	Eter de petróleo	2386	452
Luteína	Etanol	2550	445
Luteína	Benceno	2236	458
Luteína	Disulfuro de carbono	2160	475
Licopeno	Cloroformo	3259	484
Licopeno	Eter de petróleo	3450	472
Licopeno	Benceno	3370	487
Neoxantina	Etanol	2243	439
Violaxantina	Etanol	2550	443
Violaxantina	Benceno	2240	454
Zeaxantina	Eter de petróleo	2350	452
Zeaxantina	Etanol	2540	450
Zeaxantina	Acetona	2340	452

## B. ANEXO II

CUADRO I: OPTIMIZACION DE LA EXTRACCION: SOLVENTE DE EXTRACCION

Carotenoide	Variable	Cantidad obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )			Media	CV (%)
		1	2	3		
Luteína	Acetona	21.70	15.97	14.26	17.31	22.52
	MeOH:THF (1:1)	14.18	12.61	12.20	13.00	8.02
$\beta$ -criptoxantina	Acetona	12.95	7.39	5.53	8.62	44.80
	MeOH:THF (1:1)	27.45	27.56	27.11	27.38	0.85
Licopeno	Acetona	12.12	14.06	11.19	12.45	11.77
	MeOH:THF (1:1)	21.50	21.61	12.73	18.61	27.38
$\beta$ -caroteno	Acetona	18.19	14.21	14.12	15.51	14.98
	MeOH:THF (1:1)	15.83	12.56	16.58	14.99	14.27

El solvente que presenta menor variación (excepto en el caso del licopeno) es la mezcla MEOH:THF (1:1), además extrae mayor cantidad de  $\beta$ -criptoxantina.

CUADRO II: OPTIMIZACION DE LA EXTRACCION: CAMBIO DE SOLVENTE POLAR A ETER DE PETROLEO

Carotenoide	Variable	Cantidad obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )			Media	CV (%)
		1	2	3		
Luteína	Adición por fracciones	10.70	15.48	12.88	13.02	18.35
	Adición total y reextracción	13.72	14.57	12.28	13.52	8.59
$\beta$ -criptoxantina	Adición por fracciones	4.70	5.66	3.83	4.74	18.25
	Adición total y reextracción	4.35	4.87	3.81	4.34	17.37
Licopeno	Adición por fracciones	2.71	3.38	4.05	3.38	19.80
	Adición total y reextracción	6.12	7.22	6.41	6.58	8.68
$\beta$ -caroteno	Adición por fracciones	8.74	7.50	6.26	7.50	16.51
	Adición total y reextracción	4.53	7.22	5.23	4.53	21.64

El tratamiento que presenta menor variación (excepto en el caso del  $\beta$ -caroteno) es la adición completa del extracto con posterior reextracción de la fase acuosa, además, se obtiene una mayor cantidad de licopeno.

**CUADRO III: OPTIMIZACION DE LA SAPONIFICACION: SOLVENTE DE SAPONIFICACION**

Carotenoide	Variable	Cantidad obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )			Media	CV (%)
		1	2	3		
$\beta$ -criptoxantina	MeOH:THF(1:1)	1.23	1.21	1.23	1.23	0.95
	Eter de petróleo	1.07	1.06	1.07	1.07	0.83
	Diclorometano	0.42	0.42		0.42	0.48
Licopeno	MeOH:THF(1:1)	5.73	5.26	5.27	5.42	4.94
	Eter de petróleo	6.49	6.23	6.21	6.31	2.43
	Diclorometano	2.11	1.79		1.95	11.53
$\beta$ -caroteno	MeOH:THF(1:1)	0.50	0.57	0.58	0.55	8.20
	Eter de petróleo	0.60	0.67	0.77	0.68	12.57
	Diclorometano	0.23	0.21		0.21	6.47

El solvente que presenta menor variación (excepto en el caso del  $\beta$ -caroteno) es la saponificación en éter de petróleo.

**CUADRO IV: OPTIMIZACION DE LA SAPONIFICACION: TIEMPO DE SAPONIFICACION**

Carotenoide	Variable	Cantidad obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )			Media	CV (%)
		1	2	3		
$\beta$ -criptoxantina	1 hora	0.58	0.45	0.54	0.52	13.65
	3 horas	0.93	1.10	0.84	0.95	13.98
	5 horas	1.26	1.21	1.24	1.24	2.29
	16 horas	1.34	1.35	0.74	1.14	30.43
Licopeno	1 hora	7.40	6.82	6.59	6.94	5.99
	3 horas	7.01	7.02	6.38	6.80	5.38
	5 horas	6.87	6.74	6.69	6.77	1.34
	16 horas	7.29	7.19	6.21	6.89	8.57
$\beta$ -caroteno	1 hora	0.59	0.51	0.44	0.51	14.77
	3 horas	0.57	0.58	0.47	0.54	10.93
	5 horas	0.57	0.62	0.62	0.60	4.57
	16 horas	0.64	0.57	0.61	0.51	33.89

El tiempo que presenta menor variación es de 5 horas, además de permitir que se obtenga una mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno y de  $\beta$ -criptoxantina.

**CUADRO V: OPTIMIZACION DE LA INYECCION: SOLVENTE DE INYECCION**

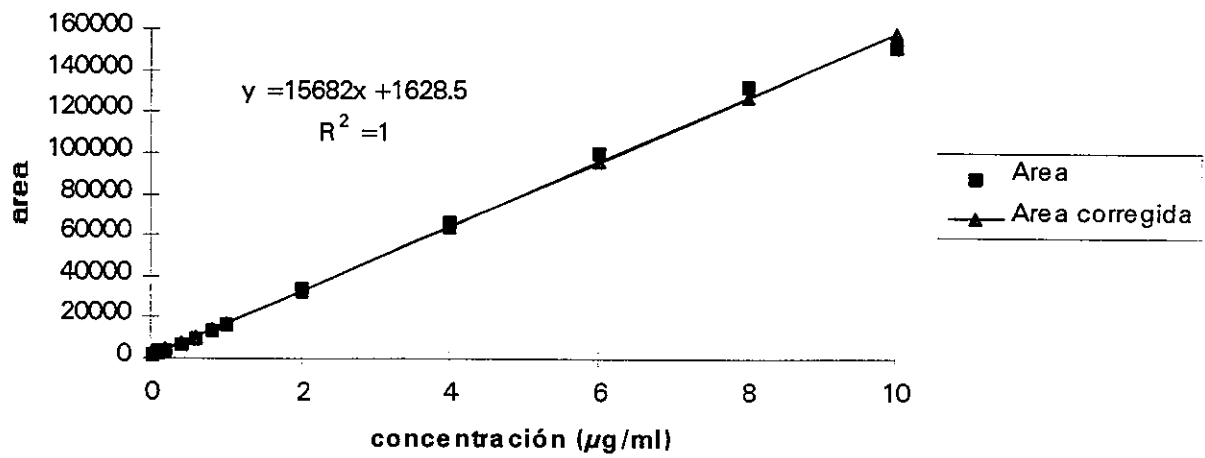
Carotenoide	Variable	Cantidad obtenida ( $\mu\text{g/ml}$ )			Media	CV (%)
		1	2	3		
Luteína	Acetona	6.50	4.73	4.47	5.23	21.12
	MeOH:THF (1:1)	4.70	5.11	4.63	4.81	5.48
	Etanol	6.62	6.35	5.48	6.15	9.71
	Cloroformo	5.11	14.57		9.48	68.03
$\beta$ -criptoxantina	Acetona	8.27	7.41	7.03	7.57	8.37
	MeOH:THF (1:1)	6.57	6.36	6.89	6.56	3.34
	Etanol	7.96	7.65	7.33	7.64	4.10
	Cloroformo	8.11	8.37		8.24	2.23
Licopeno	Acetona	3.62	3.04	2.93	3.20	11.59
	MeOH:THF (1:1)	3.36	3.22	3.24	3.27	2.33
	Etanol	0.67	0.68	0.75	0.70	5.76
	Cloroformo	3.71	3.70		3.70	0.19
$\beta$ -caroteno	Acetona	5.98	4.84	4.90	5.24	12.30
	MeOH:THF (1:1)	5.19	5.10	5.20	5.19	1.10
	Etanol	5.78	5.46	5.53	5.59	3.02
	Cloroformo	5.99	5.51		5.74	5.90

El solvente que presenta menos variación es la mezcla MeOH:THF (1:1).

CUADRO VI: CURVA DE LUTEINA, RELACION CONCENTRACION, AREA.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
0.040	1955
0.080	2824
0.100	3864
0.200	3965
0.400	6762
0.600	9811
0.800	13193
1.00	16687
2.00	33917
4.00	65638
6.00	100010
8.00	131923
10.00	151577
Ecuación: $y = (15682 \pm 253) x + (1629 \pm 1047)$	

FIGURA I: Curva de luteína



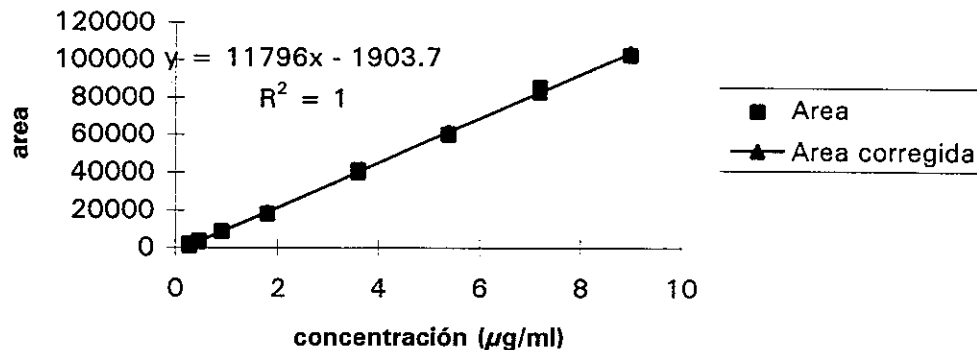
**CUADRO VII: CURVA DE LUTEINA, RELACION CONCENTRACION:ALTURA:SEÑAL/RUIDO**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Altura (escala 1:33 1/3)	Señal/ruido
0.0	0	0
0.020	7	1.4
0.040	14	2.8
0.060	19	3.8
0.080	25	5.0
0.10	30	6.0
0.20	53	10.6
0.40	103	20.6
0.60	150	30.0
0.80	197	39.4
Ecuación: $y = (48.38 \pm 0.34) x + (0.93 \pm 0.12)$		

**CUADRO VIII: CURVA DE LICOPENO, RELACION CONCENTRACION, AREA.**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
0.27	2093
0.45	3420
0.90	8539
1.79	18052
3.59	41088
5.38	59957
7.18	85493
8.97	102676
Ecuación: $y = (11796 \pm 174) x - (1904 \pm 819)$	

FIGURA II: Curva de licopeno



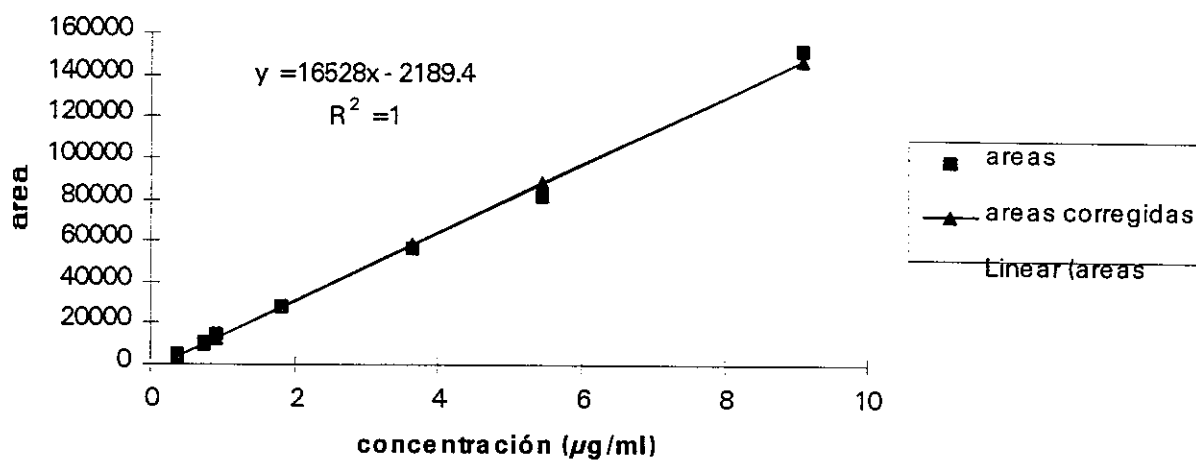
CUADRO IX: CURVA DE LICOPENO RELACION CONCENTRACION: ALTURA:SEÑAL/RUIDO

Concentración (µg/ml)	Altura (escala 1:33 1/3)	Señal/ruido
0.0	0	0
0.27	10	2.0
0.45	15	3.0
0.72	28	5.6
0.90	40	8.0
1.79	83	16.6
3.59	174	34.8
Ecuación: $y = (10.01 \pm 0.13) x - (1.21 \pm 0.23)$		

CUADRO X: CURVA DE α-CAROTENO RELACION CONCENTRACION, AREA.

Concentración (µg/ml)	Area
0.36	5183
0.73	10183
0.91	14760
1.82	28166
3.63	55787
5.45	81720
9.08	152017
Ecuación: $y = (16528 \pm 460) x - (2189 \pm 1985)$	

FIGURA III: Curva de a-caroteno

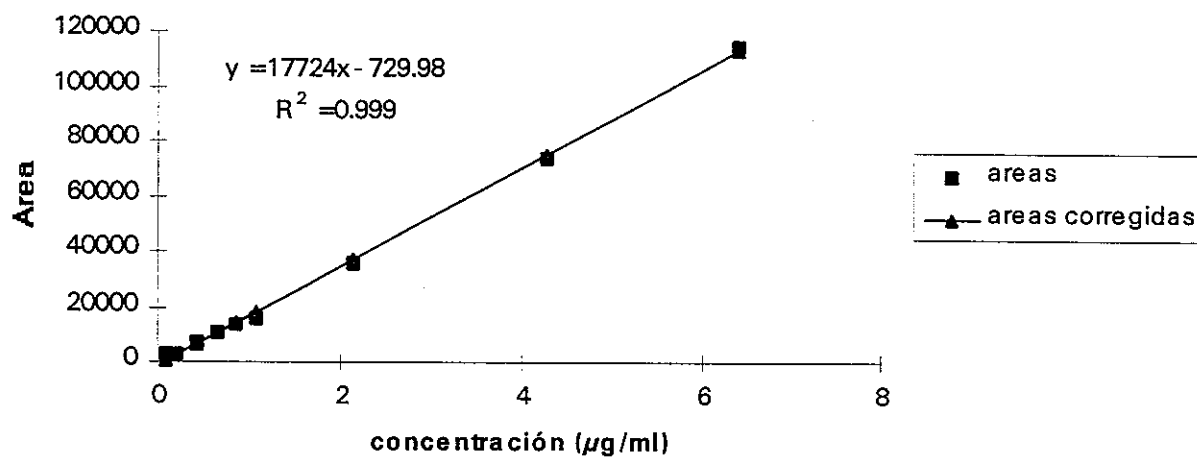
CUADRO XI: CURVA DE  $\alpha$ -CAROTENO, RELACION CONCENTRACION:ALTURA:SEÑAL/RUIDO

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Altura (escala 1:33 1/3)	Señal/ruido
0.0	0	0
0.18	13	1.7
0.36	20	2.7
0.73	42	5.6
0.91	59	7.9
1.09	65	8.7
1.82	114	15.2
Ecuación: $y = (8.37 \pm 0.29) x - (0.14 \pm 0.29)$		



CUADRO XII: CURVA DE  $\beta$ -CAROTENO, RELACION CONCENTRACION, AREA.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
0.090	2661
0.21	3267
0.43	7248
0.64	11100
0.85	14162
1.07	16342
2.13	35936
4.26	73710
6.40	114006
Ecuación: $y = (17724 \pm 207) x - (730 \pm 563)$	

FIGURA IV: Curva de  $\beta$ -caroteno

**CUADRO XII: CURVA DE  $\beta$ -CAROTENO, RELACION CONCENTRACION:ALTURA:SEÑAL/RUIDO**

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Altura (escala 1:33 1/3)	Señal/ruido
0.0	0	0
0.09	6	1.1
0.21	13	2.5
0.43	24	4.6
0.64	42	8.0
0.85	52	9.9
1.07	63	12.0
2.13	141	26.9
Ecuación: $y = (12.57 \pm 0.37) x - (0.45 \pm 0.37)$		

## C. ANEXO III

FIGURA I: ESPECTRO DE ABSORCION DE LUTEINA EN ETANOL (PATRON COMERCIAL)

X: USER001 : absc 550.0- 350.0; pts 201; int 1.00; ord 0.0046-0.5067; a  
 inf: 11:02:02 97/07/21 Estandar de luteina. 1.2 en 5 ml.

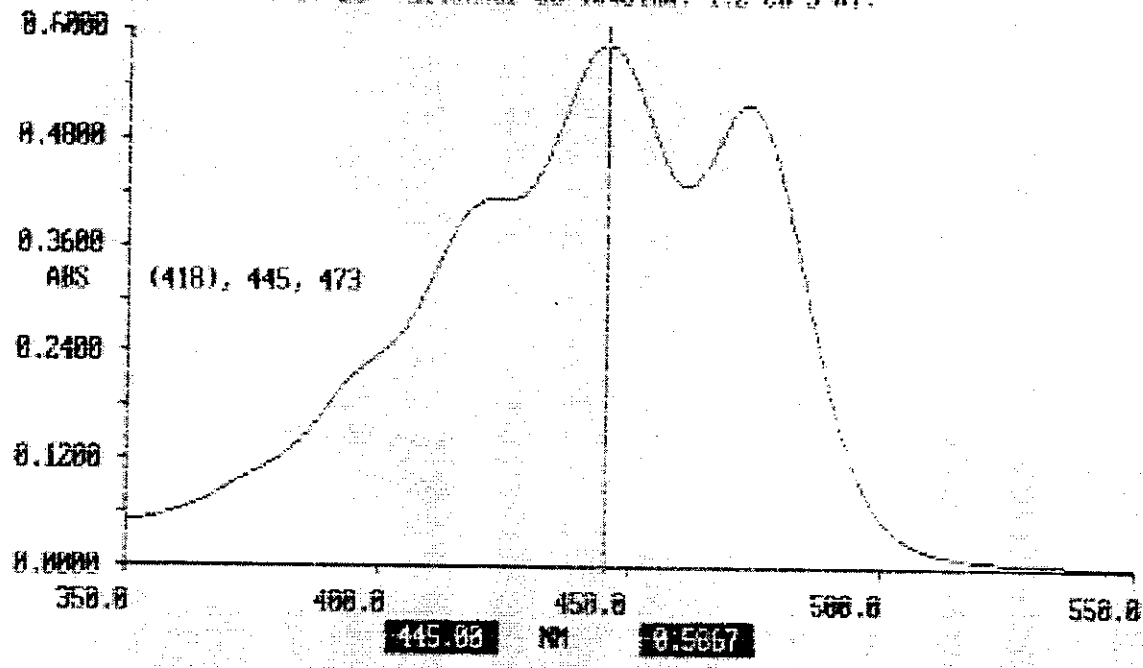


FIGURA II: ESPECTRO DE ABSORCION DE ZEAXANTINA EN ETANOL (PATRON COMERCIAL)

X: USER001 : absc 550.0- 350.0; pts 201; int 1.00; ord 0.0185-2.6958; a  
 inf: 11:11:39 97/08/08 Estandar de zeaxantina. 0.15 en 1.

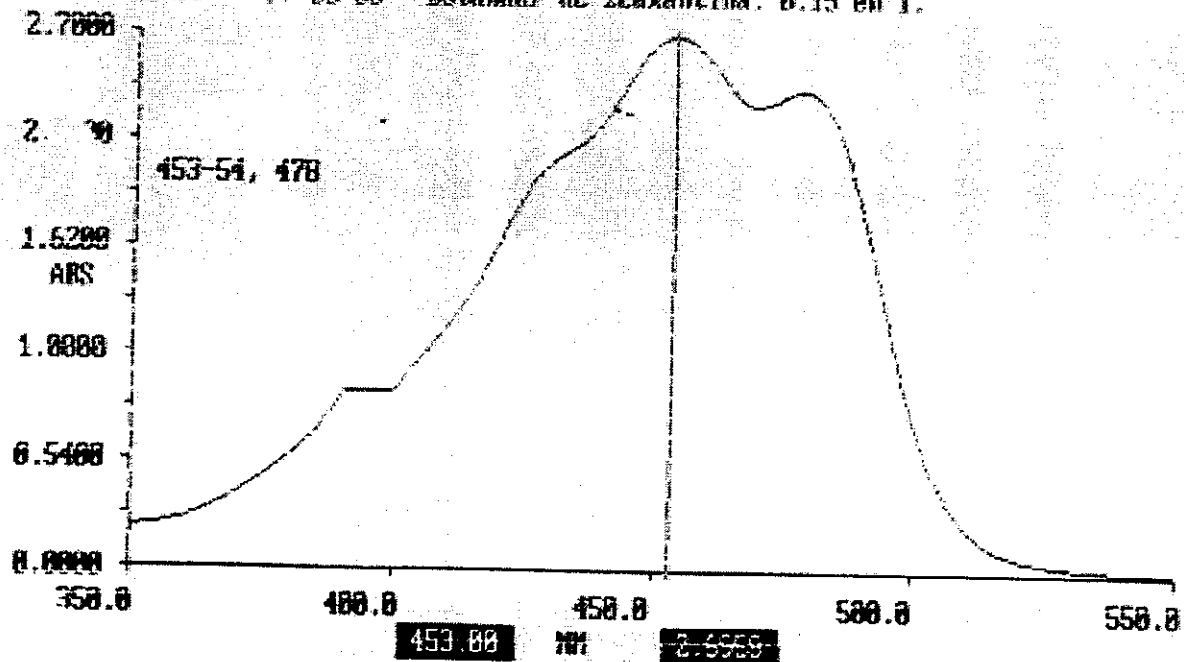


FIGURA III: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA EN CLOROFORMO (PATRON COMERCIAL)

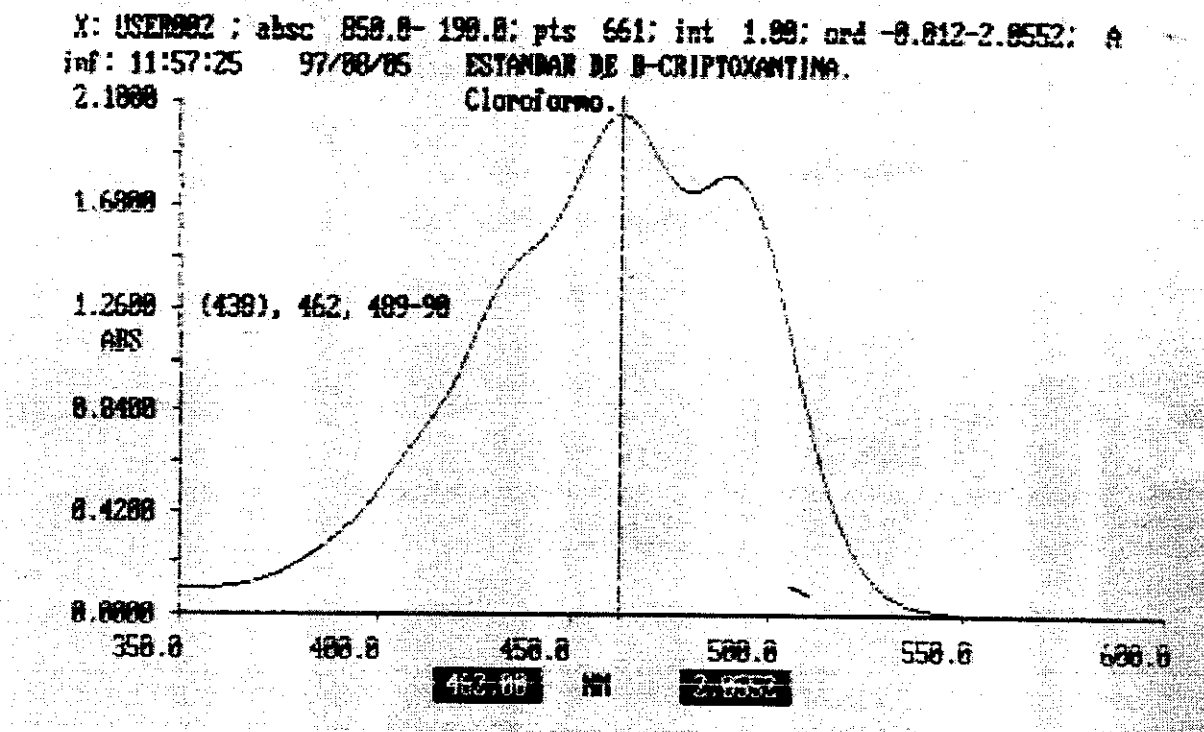


FIGURA IV: ESPECTRO DE ABSORCION DE LICOPENO EN CLOROFORMO (PATRON COMERCIAL)

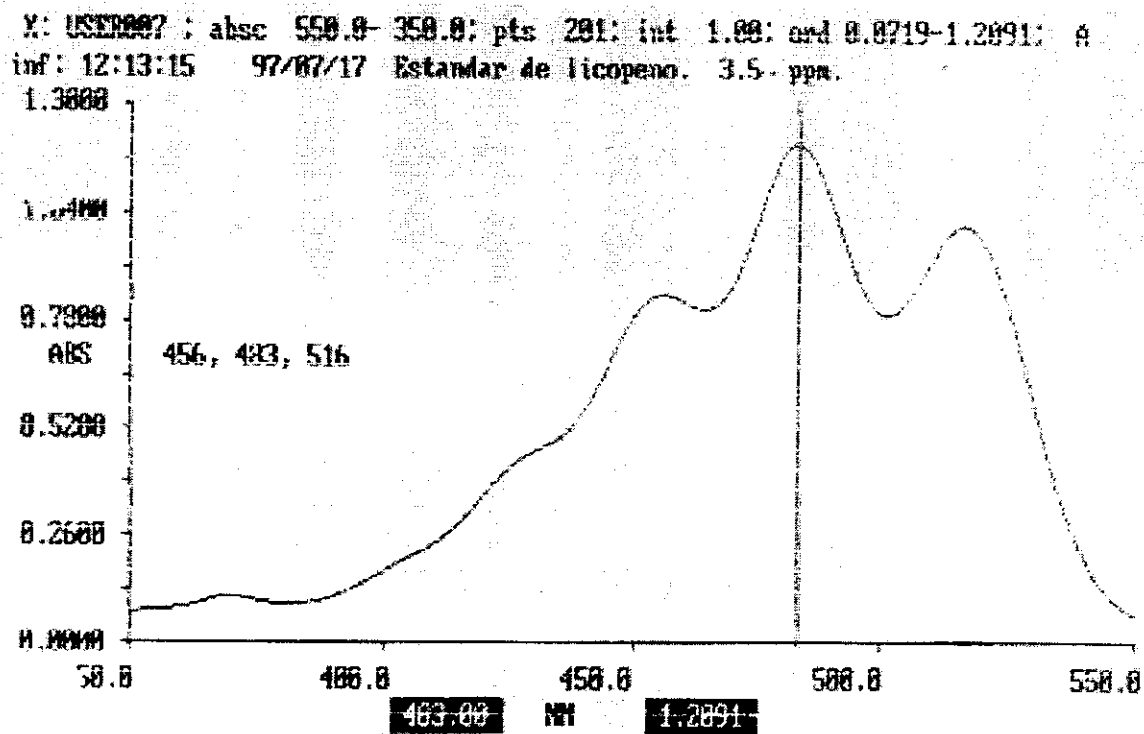


FIGURA V: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\alpha$ -CAROTENO EN ETER DE PETROLEO (PATRON COMERCIAL)

X: USER001 ; absc 550.0- 350.0; pts 201; int 1.00; ord -0.011-0.2118; A  
inf: 00:57:56 97/07/22 Estandar de  $\alpha$ -caroteno. 0.2 en 5 ml.

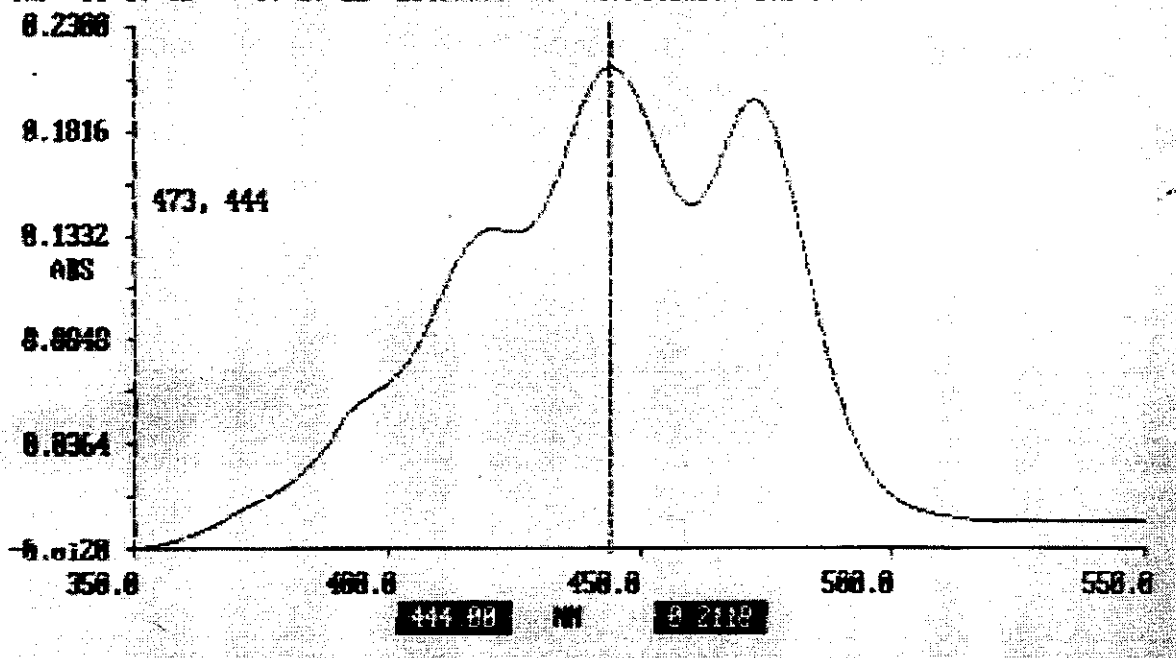


FIGURA VI: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CAROTENO EN ETER DE PETROLEO (PATRON COMERCIAL)

X: USER001 ; absc 550.0- 350.0; pts 201; int 1.00; ord 0.0185-2.4435; A  
inf: 09:19:40 97/07/29 Estandar de  $\beta$ -caroteno. 0.3 en 5.

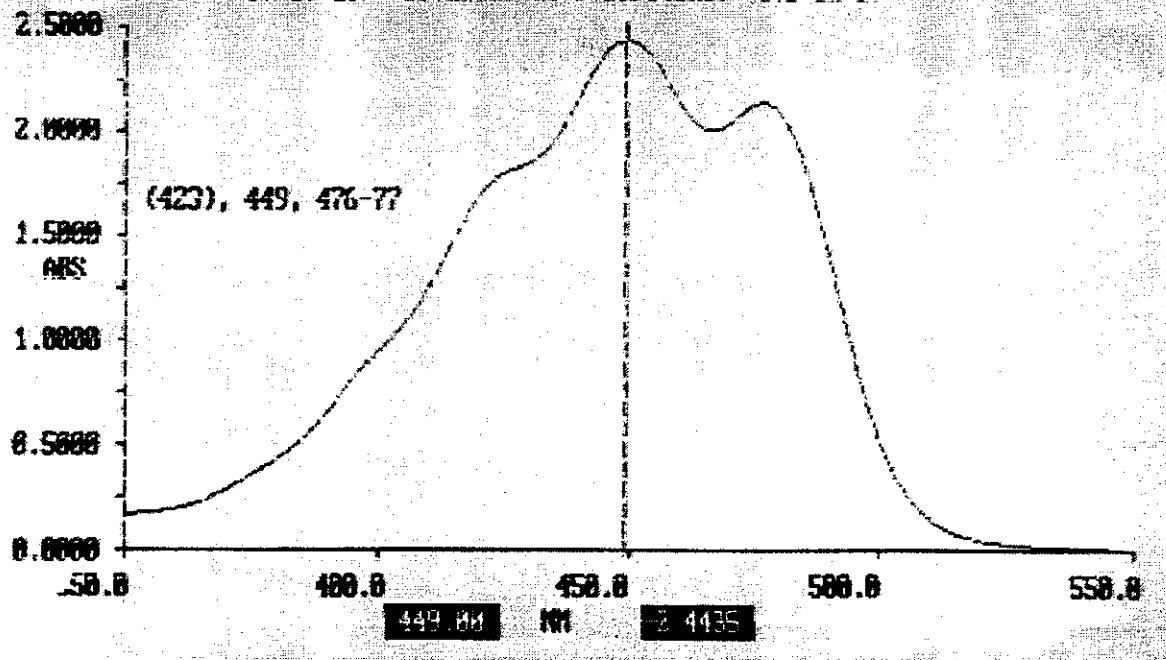


FIGURA VII: ESPECTRO DE ABSORCION DE LUTEINA EN ETANOL

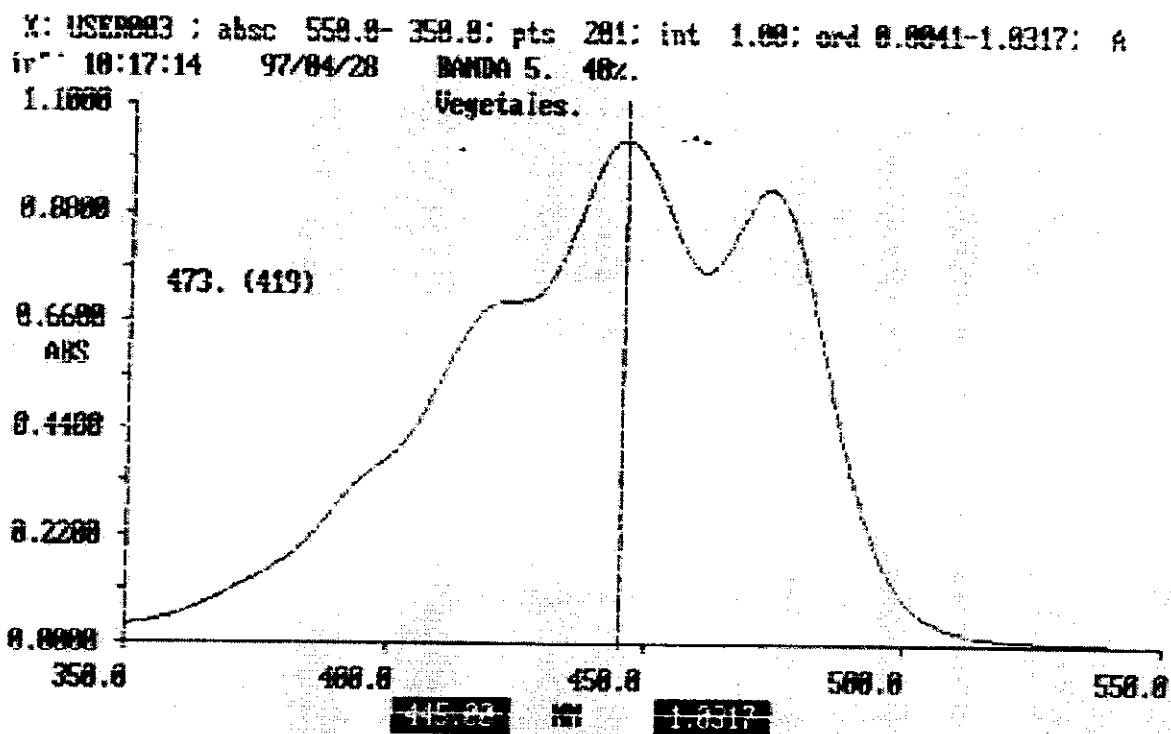


FIGURA VIII: ESPECTRO DE ABSORCION DE ZEAXANTINA EN ETANOL

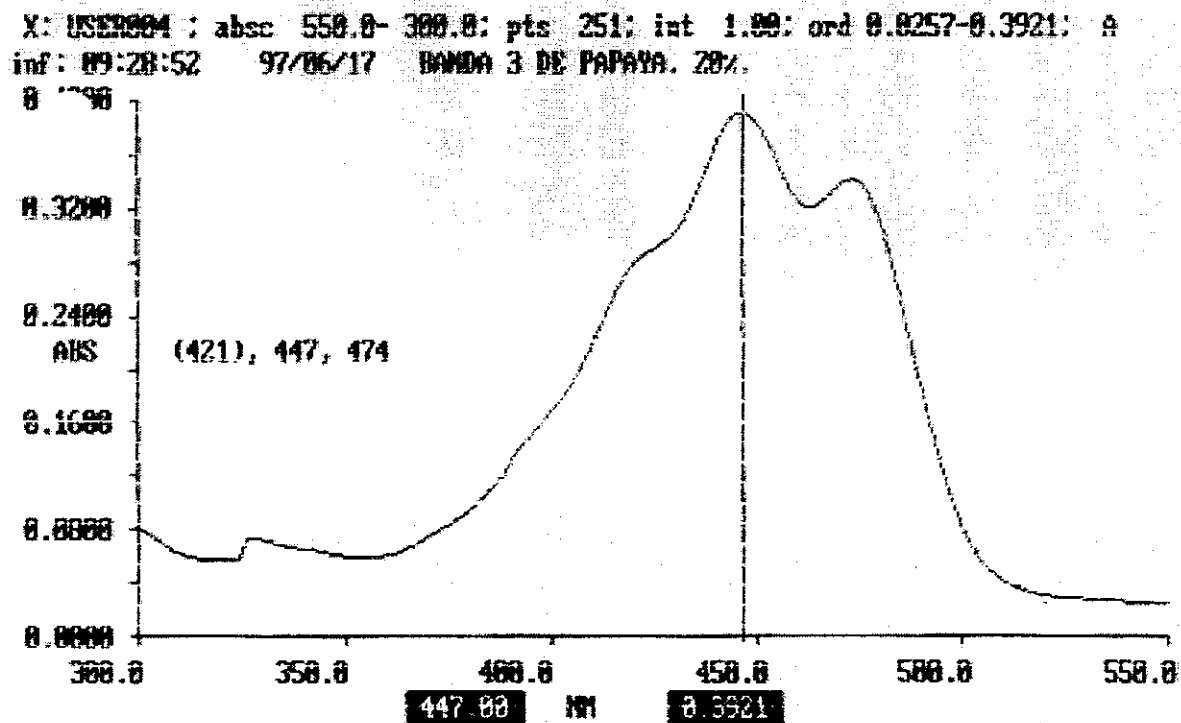


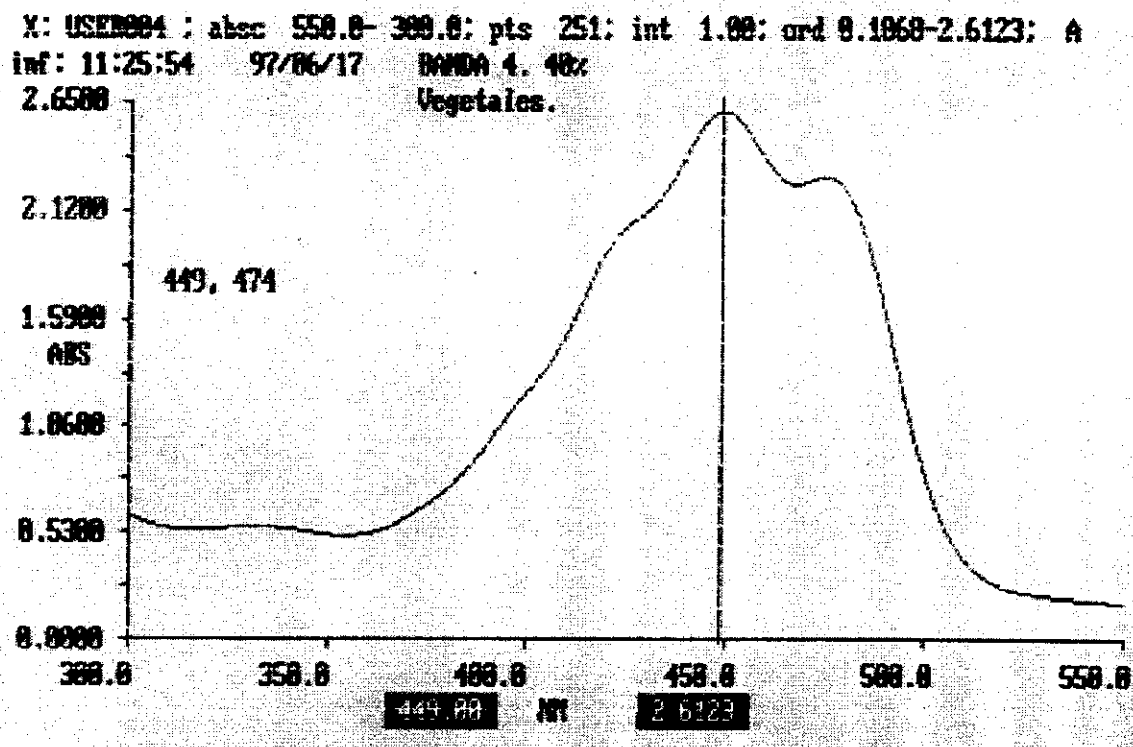
FIGURA IX: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CRIFTOXANTINA EN CLOROFORMO

FIGURA X: ESPECTRO DE ABSORCION DE LICOPENO EN CLOROFORMO

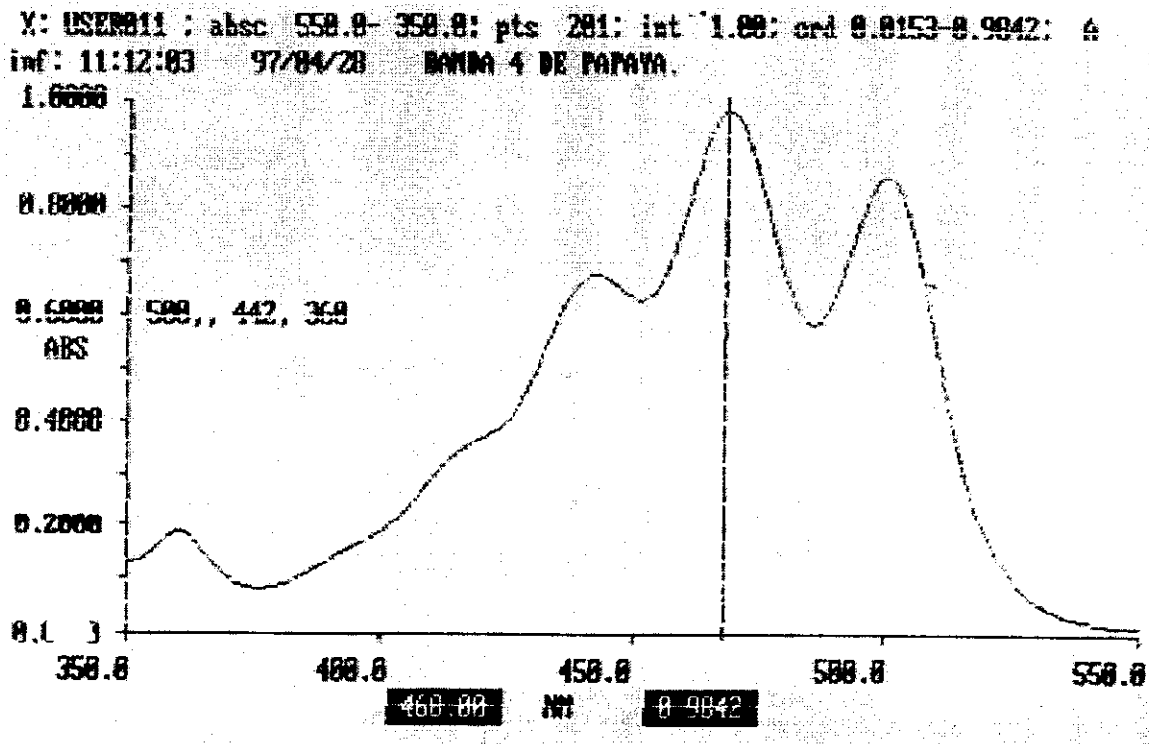
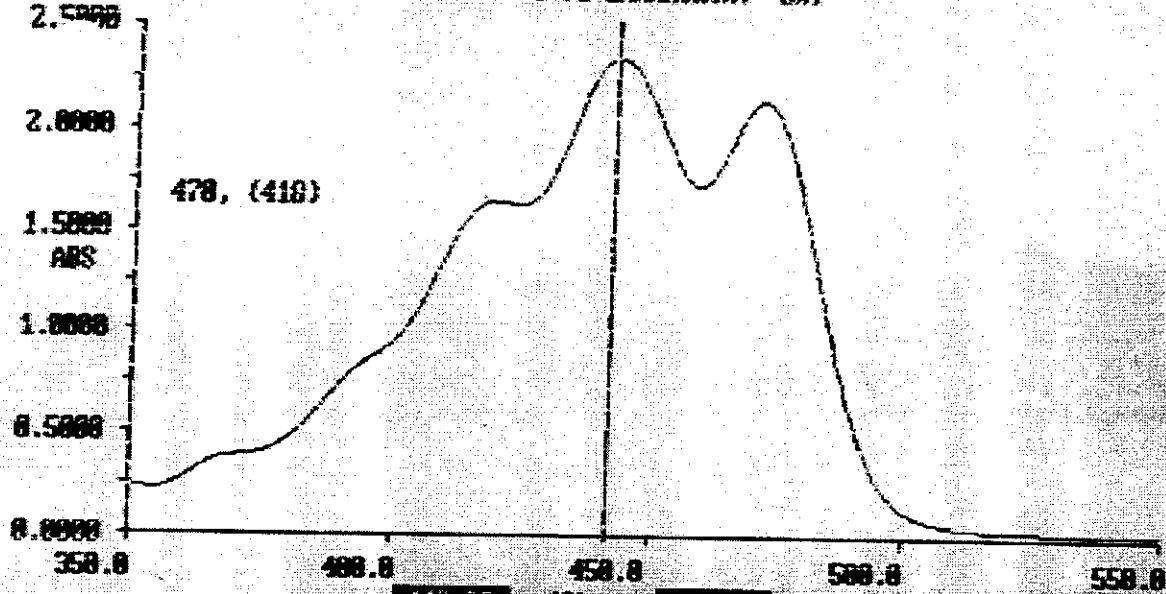


FIGURA XI: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\alpha$ -CAROTENO EN ETER DE PETROLEO

X: USER012 : absc 550.0- 350.0: pts 201: int 1.00: ord 0.0276-2.3525: a  
 inf: 11:23:52 97/04/28 BANDA 1 DE ZAMAHORIA. 3%.

FIGURA XII: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CAROTENO EN ETER DE PETROLEO

X: USER013 : absc 550.0- 350.0: pts 201: int 1.00: ord 0.0043-1.1304: a  
 inf: 11:33:22 97/04/28 BANDA 2 DE ZAMAHORIA. 8%.

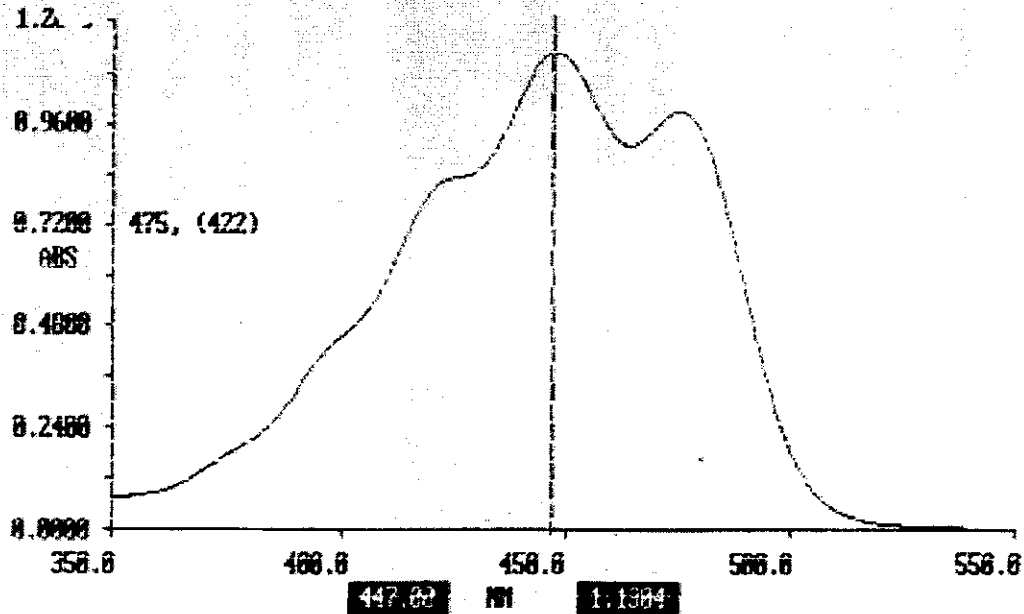
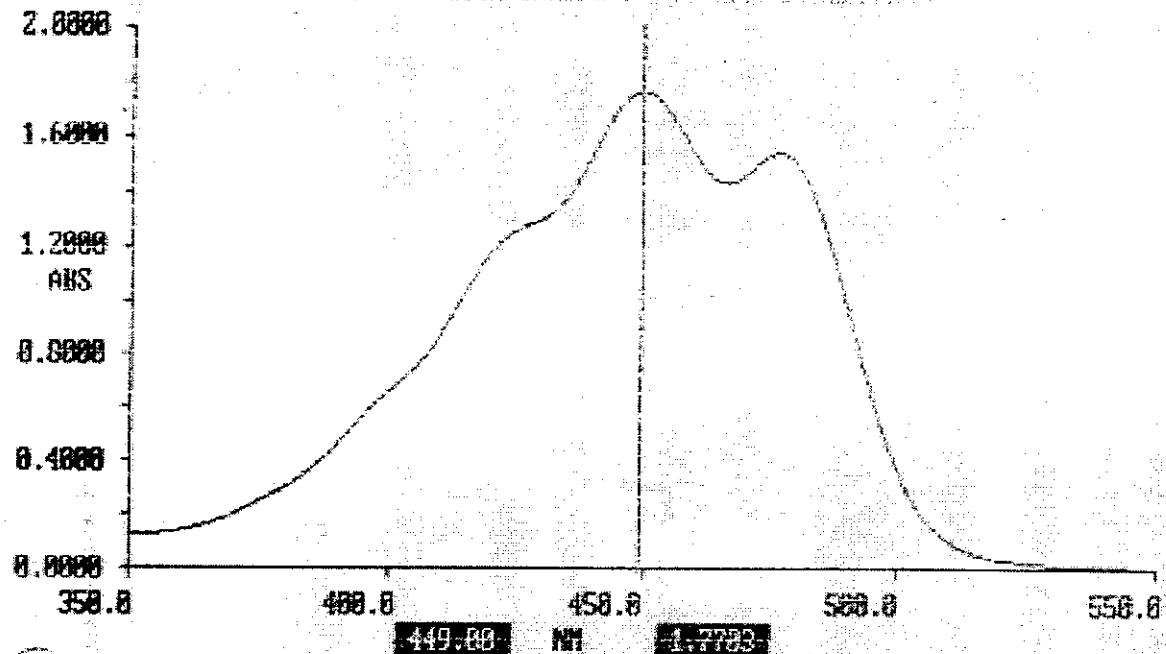




FIGURA XIII: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CAROTENO EN HEXANO

X: USER003 : absc 550.0- 350.0; pts 291; int 1.00; ord 0.0000-1.7700; a  
inf: 12:19:46 97/04/07 ESTANDAR DE  $\beta$ -CAROTENO EN HEXANO.

FIGURA XIV: ESPECTRO DE ABSORCION DE  $\beta$ -CAROTENO EN HEXANO LUEGO DE LA PRUEBA CON YODO

X: USER004 : absc 550.0- 350.0; pts 281; int 1.00; ord 0.1461-1.0390; a  
inf: 12:27:42 97/04/07 ESTANDAR DE  $\beta$ -CAROTENO EN HEXANO.

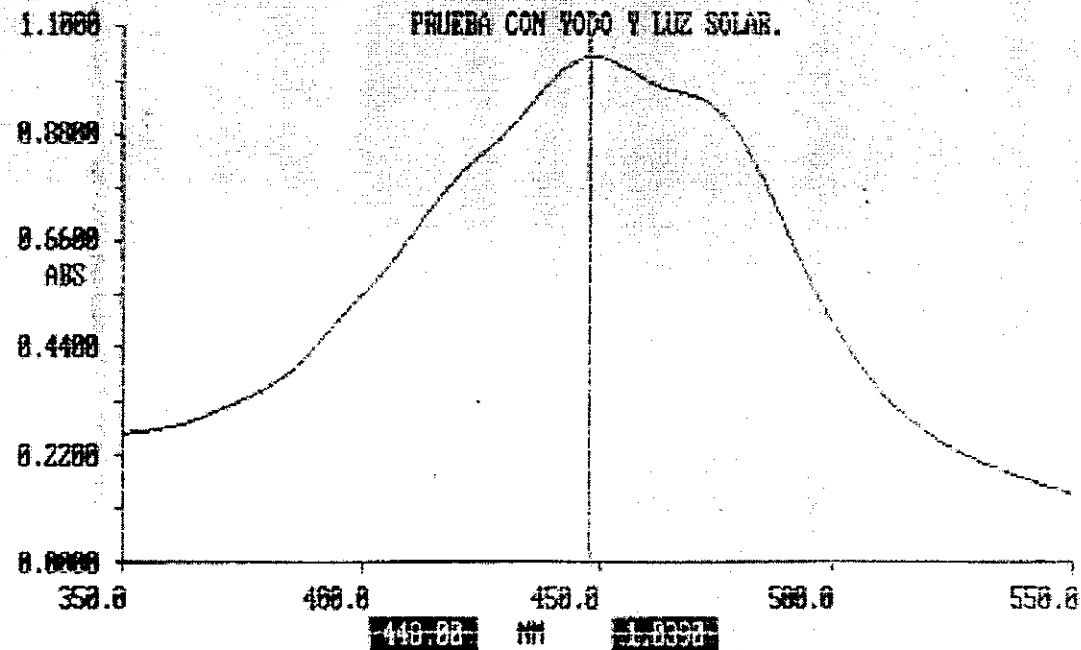


FIGURA XV: ESPECTRO DE ABSORCION DE NEOXANTINA

X: USEE0003 ; absc 550.0- 350.0; pts 251; int 1.00; ord 0.0070-2.3787; A  
 inf: 15:31:01 97/06/20 Neoxantina.

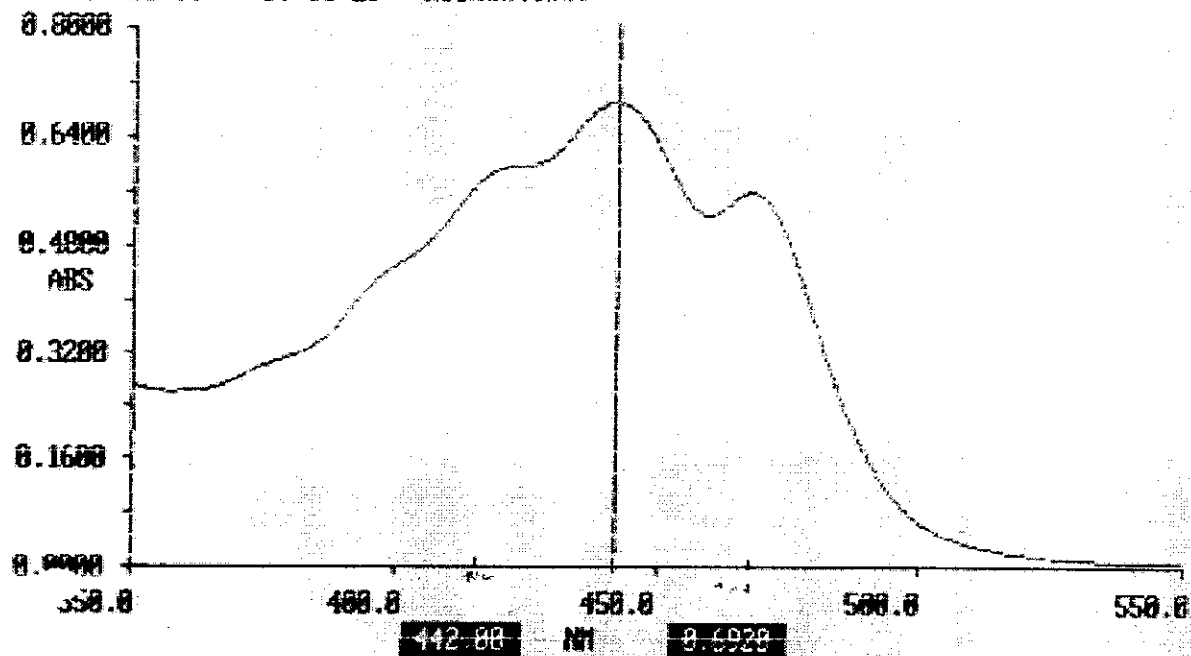


FIGURA XVI: ESPECTRO DE ABSORCION DE NEOXANTINA LUEGO DE LA PRUEBA CON HCl

X: USEE0004 ; absc 550.0- 350.0; pts 291; int 1.00; ord 0.0404-0.5013; A  
 inf: 15:39:25 97/06/20 Neoxantina. Prueba con HCl.

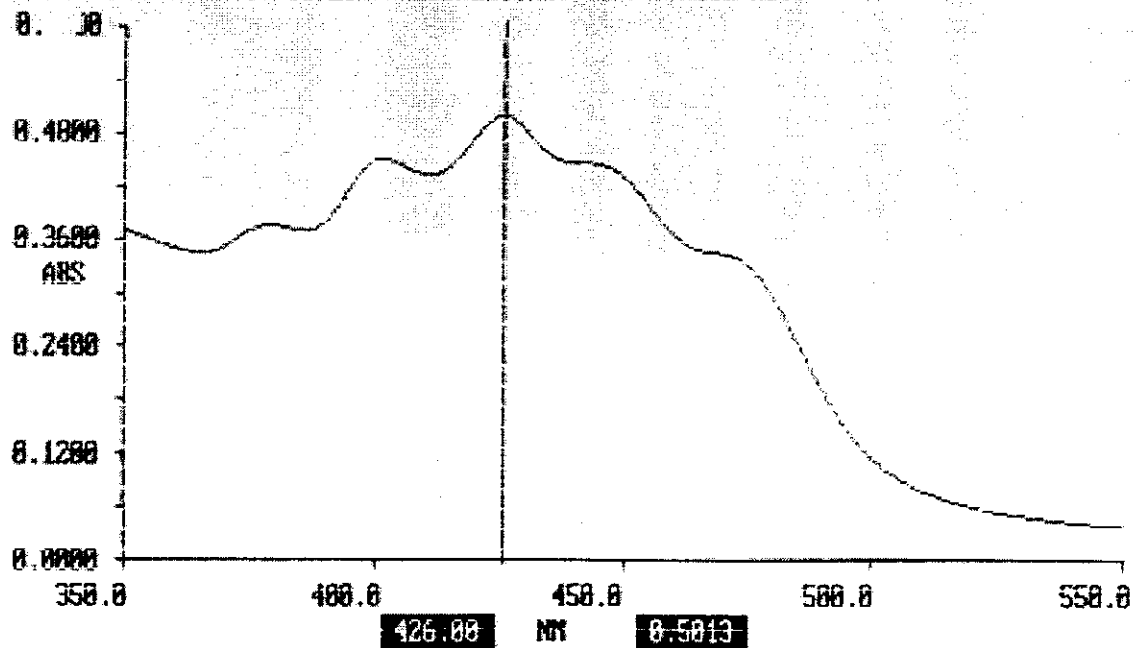


FIGURA XV: ESPECTRO DE ABSORCION DE NEOXANTINA

X: USE0003 ; absc 550.0- 350.0; pts 251; int 1.00; ord 0.0070-2.3707; A  
inf: 15:31:01 97/06/20 Neoxantina.

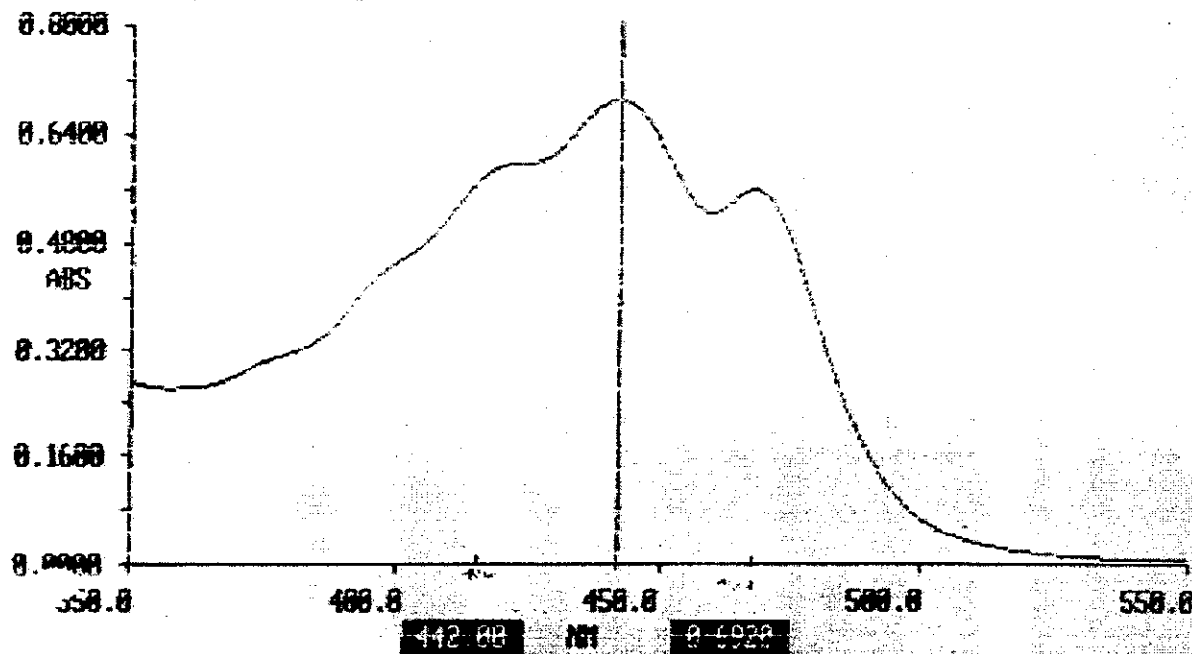


FIGURA XVI: ESPECTRO DE ABSORCION DE NEOXANTINA LUEGO DE LA PRUEBA CON HCl

X: USE0004 ; absc 550.0- 350.0; pts 201; int 1.00; ord 0.0404-0.5013; A  
inf: 15:39:25 97/06/20 Neoxantina. Prueba con HCl.

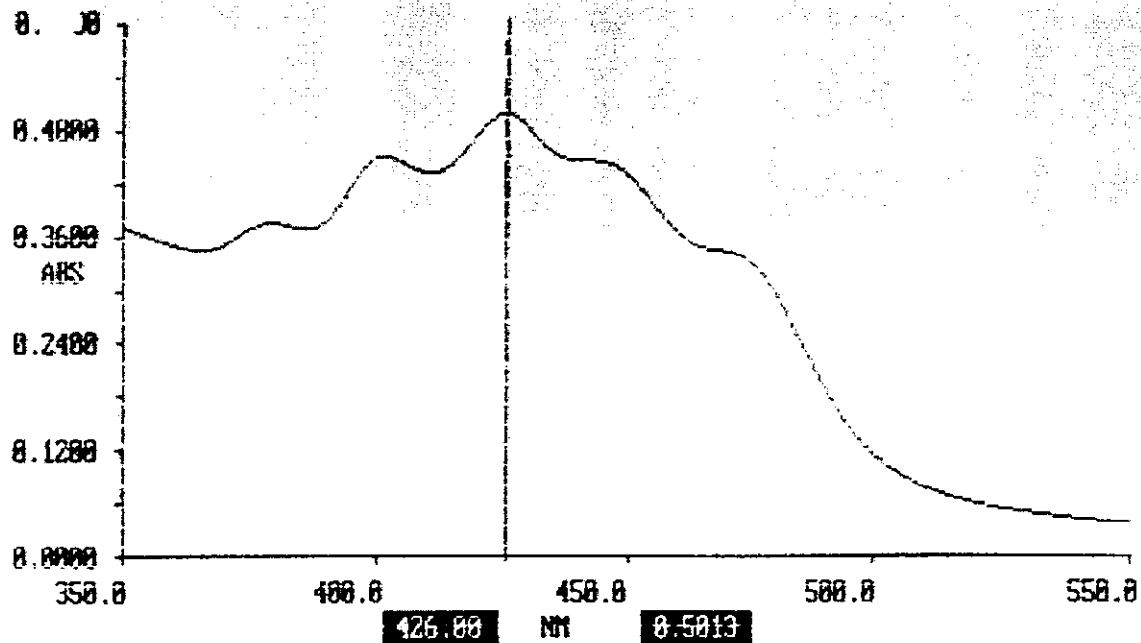
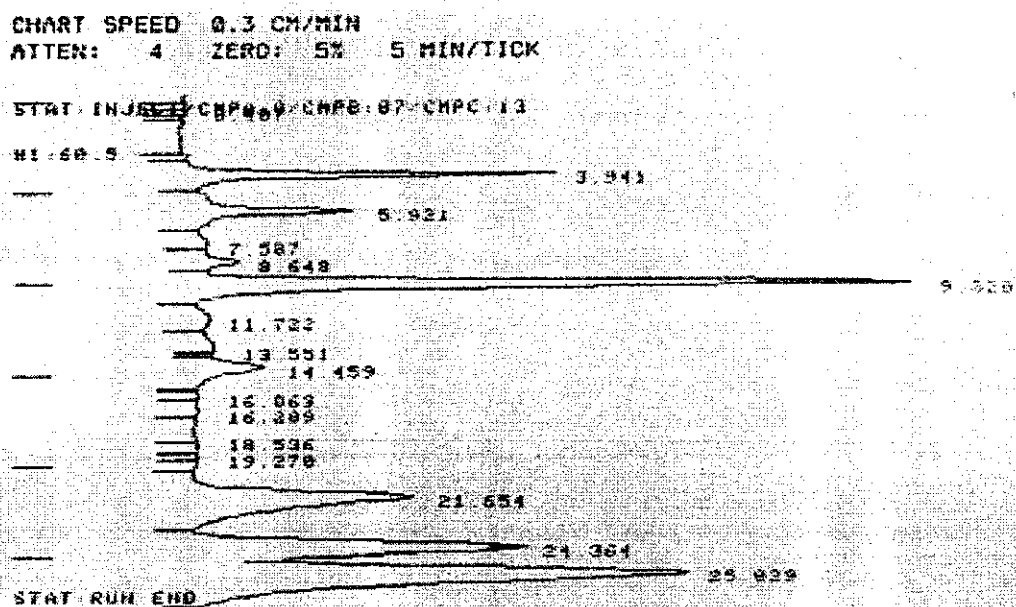


FIGURA XVII: CROMATOGRAMA OBTENIDO LUEGO DE INYECTAR UNA MUESTRA QUE CONTIENE TODOS LOS CAROTENOIDES DE INTERES PARA EL METODO



**D. ANEXO IV**

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA  
LABORATORIO DE COMPOSICION DE ALIMENTOS

REVISION No. 1  
Fecha: Agosto de 1998

**DETERMINACION DE PERFIL DE CAROTENOIDES  
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION**

Técnica montada por: Edna Ramos Fecha: Agosto de 1998  
Ultima revisión efectuada por: Edna Ramos

**I. REFERENCIAS**

EPLER, Katherine, L. C. Sander, R. G. Ziegler, S. A. Wise y N. E. Craft. Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *J. Chromatogr.* **595**: 89-101, 1992.

HART, David y K. J. Scott. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* **54**: 101-111, 1985.

**II. PRINCIPIO**

Este método determina la concentración de los principales carotenoides presentes en vegetales y frutas: luteína + zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos. La extracción se realiza con una mezcla de metanol y tetrahidrofurano, para eliminar el agua y tener la polaridad adecuada para solubilizar los carotenoides presentes. Solo las frutas y los pimientos necesitan saponificación, debido a que éste proceso libera los ésteres de carotenoides, y ayuda a eliminar la materia grasa. Es necesario pasar el extracto a éter de petróleo para eliminar los complejos de proteínas que hayan sido arrastrados en la extracción.

La cromatografía líquida de alta resolución se realiza con una fase estacionaria apolar ( $C_{18}$ ) con sílica desactivada y con una fase móvil de metanol:agua (87:13).

Las concentraciones se calculan por comparación de las áreas obtenidas en comparación con el patrón externo de  $\beta$ -caroteno.

**III. PUNTOS CRITICOS Y PRECAUCIONES**

Es importante llevar a cabo todo el procedimiento con las lámparas apagadas o con lámparas que posean filtros de luz. Cubrir las muestras con tela negra.

#### IV. EQUIPO

Balanza analítica Sartorius ( $\pm 0.0001$  g)  
 Balanza semianalítica ( $\pm 0.001$  g)  
 Bomba de vacío  
 Procesadora de alimentos de dos velocidades, Bati-Max de Kocina  
 Rotavapor  
 Columna Supercosil LC-18-5 de  $5 \mu\text{m}$   
 Cromatógrafo líquido constituido por:  
     Cromatógrafo Varian 5500 con detector UV  
     Automuestreador Vista 9090  
     Interfase Varian IIM-A  
     Sistema de procesador de datos DS-654  
     Impresora HP Thinkjet  
 Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 3B

#### V. MATERIALES

Beakers de 150, 400 y 1000 ml  
 Probetas de 25, 50, 100 y 250 ml  
 Quitasatos de 125 y 250 ml  
 Embudos con filtro de vidrio poroso  
 Frascos de color ámbar de 5, 10, 30, 50, 300 y 500 ml  
 Agitadores de vidrio  
 Ampollas de separación de 250 y 500 ml  
 Balones 24/40 con tapón esmerilado de 125 y 250 ml  
 Balones volumétricos de 1, 5, 10 y 25 ml  
 Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml  
 Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml  
 Celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz

#### VI. REACTIVOS

Acetona, ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )  $\text{PM}=58.08$ ,  $d=0.791$ , 99.5%  
 Eter de petróleo 30-60°C,  $d=0.640$ , grado analítico  
 Metanol, ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\text{PM}=32.04$ ,  $d=0.791$ , 99.9%  
 Etanol, ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )  $\text{PM}=46.07$ ,  $d=0.785$ , grado reactivo  
 Tetrahidrofurano, ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ )  $\text{PM}=72.11$ ,  $d=0.889$ , 99.9%  
 Cloroformo, ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{PM}=119.18$ ,  $d=1.492$ , 99.8%  
 Sulfato de sodio, ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )  $\text{PM}=142.04$ , 99%  
 Cloruro de sodio, ( $\text{NaCl}$ )  $\text{PM}=58.44$ , 98%  
 Hyfosuper cel  
 $\alpha$ -caroteno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ )  $\text{PM}=536.9$ , Tipo V  
 $\beta$ -caroteno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ )  $\text{PM}=536.9$ , Tipo IV  
 Licopeno, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ )  $\text{PM}=536.9$ , 90-95%  
 $\beta$ -criptoxantina, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}$ )  $\text{PM}=568.9$   
 Luteína, ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ )  $\text{PM}=568.9$ , 90%

## VIIA. SOLUCIONES

### A. Solución de Metanol:Tetrahidrofurano (1:1)

#### Composición

Metanol ..... 1 parte  
THF ..... 1 parte

#### Preparación

En un beaker de 1000 ml agregue 400 ml de metanol, agregue 400 ml de tetrahidrofurano. Agite hasta mezclar ambos solventes. Agregue 0.8 g de BHT.

#### Almacenamiento

Guarde en un frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente.

### B. Solución de hidróxido de potasio al 10% p/v en metanol

#### Composición

KOH ..... 10 % p/v

#### Preparación

Pese 40 g de hidróxido de potasio y agregue a 300 ml de metanol. Agite vigorosamente con una varilla de agitador y lleve a volumen de 400 ml con metanol.

#### Almacenamiento

Guárdese en un frasco plástico con tapón de rosca.

## VIIIB. SOLUCIONES PATRON

### A. Solución de $\beta$ -caroteno de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

#### Composición

$\beta$ -caroteno ..... 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

#### Preparación

Pipetee 10.0 ml de la solución de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (es la concentración aproximada a la que se obtiene el patrón) y transfiera a un balón volumétrico de 25 ml. Lleve a volumen con éter de petróleo. Para determinar su concentración lea su absorbancia a 451 nm y divida el resultado obtenido por 0.2950.

### Almacenamiento

Guarde en un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca a - 20°C.

### B. Solución de $\beta$ -caroteno de 5 $\mu\text{g/ml}$

#### Composición

$\beta$ -caroteno ..... 5  $\mu\text{g/ml}$

#### Preparación

Pipetee 0.5 ml de la solución de 100  $\mu\text{g/ml}$  y transfiera a un balón volumétrico de 10 ml. Lleve a volumen con éter de petróleo. Para determinar su concentración lea su absorbancia a 451 nm y divida el resultado obtenido por 0.2950.

#### Almacenamiento

Guarde en un frasco de vidrio oscuro con tapón de rosca a - 20°C.

## VIII. PROCEDIMIENTO

### A. Extracción

1. Homogeneice la muestra.
2. En un beaker de 400 ml, pese 5.0 g para los vegetales y 8.0 g para las frutas, agregue una cucharada de hyflosupercel y 50 ml de la mezcla metanol:THF. Deje reposar por 10 minutos en la obscuridad.
3. Licúe durante un minuto, utilizando la Bati-max en la velocidad baja. Filtre al vacío utilizando un embudo de filtro de vidrio poroso.
4. Repita la extracción con fracciones de 50 ml, hasta que el residuo quede incoloro.
5. Adicione el filtrado a una ampolla de separación de 250 ml. Agregue 50 ml de éter de petróleo y 50 ml de agua. Deje reposar en la obscuridad por 30 minutos.
6. Transfiera la fase acuosa que se encuentra en la parte inferior de la ampolla a otra ampolla de separación de 250 ml y adiciónale 50 ml más de éter de petróleo.
7. Si el color en la fase acuosa es muy intenso, repita la extracción con éter de petróleo una vez más.
8. Transfiera el extracto etéreo a un balón de 250 ml 24/40.
9. Evapórelo a sequedad.

### B. Saponificación

Este procedimiento solo se lleva a cabo para frutas, pimientos, y alimentos que contengan grasas.

1. Luego de transferir el extracto etéreo a un balón, adiciónale 100 ml de solución de hidróxido de sodio al 10% en metanol.
2. Agítelo suavemente durante cinco horas, en la obscuridad.



3. Transfiera el contenido del balón a una ampolla de separación de 500 ml conteniendo 100 ml de agua destilada.
4. Lave el extracto etéreo con agua destilada, hasta que se elimine todo el hidróxido, haciendo pruebas constantes con fenoftaleína.
5. Transfiera el extracto etéreo a un balón de 250 ml 24/40.
6. Evapórelo a sequedad.

### C. Cromatografía

1. Reconstituya la muestra contenida en el balón con 5 ml de mezcla metanol:THF.
2. Filtre con un filtro de membrana de 0.2

### IX. CALCULOS

La concentración de un carotenoide en el alimento se obtiene utilizando un factor relativo de respuesta (RF), en base al patrón de  $\beta$ -caroteno de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Los RF encontrados para los carotenoides son los siguientes:

Luteína	1.1488
$\beta$ -criptoxantina	1.3314
Licopeno	0.8841
$\alpha$ -caroteno	1.3983
$\beta$ -caroteno	1.0000

Los RF se obtuvieron con la siguiente ecuación

$$RF = \frac{\text{Area del pico de la solución del carotenoide (1 } \mu\text{g / ml)}}{\text{Area del pico de la solución de } \beta\text{-caroteno (1 } \mu\text{g / ml)}}$$

Para encontrar la concentración del carotenoide en el alimento introduzca en las siguientes ecuaciones los datos correspondientes:

$$\text{Conc. del carotenoide (} \mu\text{g / ml)} = \frac{\text{Area del pico del carotenoide x conc. std. de } \beta\text{-caroteno}}{RF \times \text{Area del pico del } \beta\text{-caroteno}}$$

$$\text{Conc. del carotenoide (} \mu\text{g / 100g)} = \frac{\text{conc. del carotenoide (} \mu\text{g / ml)} \times \text{ml. reconstituir} \times \text{fact. de corrección}}{\text{peso de la muestra} \times 100}$$

Los factores de corrección utilizados son diferentes para cada carotenoide, y diferentes para vegetales y frutas:

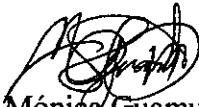
Carotenoide	Factor de corrección	
	Vegetales	Frutas
Luteína	0.94	1.40
$\beta$ -criptoxantina	1.15	1.32
Licopeno	1.17	1.20
$\alpha$ -caroteno	1.01	1.38
$\beta$ -caroteno	1.07	1.15



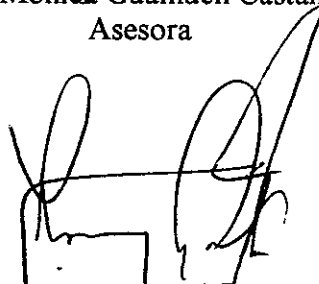
Edna Issela Ramos Barrios  
Autora



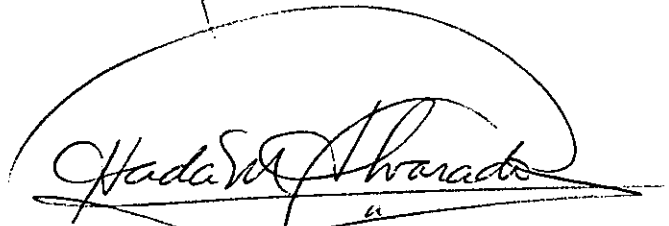
Dr. Omar Dary Mansilla  
Asesor



Licda. Mónica Guamuch Castañeda  
Asesora



Lic. Rony Estuardo Ayala Jiménez  
Director



Licda. Hada Marijeta Alvarado Beteta  
Decana

