

# Carotenoides en agroalimentación y salud

Antonio J. Meléndez-Martínez  
Coordinador



## Carotenoides en agroalimentación y salud

Primera edición: noviembre de 2017

### Comité Editorial

Dra. Lourdes Gómez Gómez

Facultad de Farmacia/Instituto Botánico  
Universidad de Castilla-La Mancha, sede de Albacete

Dr. Dámaso Hornero Méndez

Instituto de la Grasa  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio J. Meléndez-Martínez

Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla

Dra. Begoña Olmedilla Alonso

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y  
Nutrición

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio Pérez Gálvez

Instituto de la Grasa  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

**Coordinador general:** Antonio J. Meléndez-Martínez

D.R. © Aguilar-Espinosa, Margarita; Alcalde, María Jesús; Alonso, Gonzalo L.; Álvarez, Rocío; Angaman, Djédoux Maxime; Arhazem, Oussama; Ávalos, Javier; Bagur, María José; Benítez-González, Ana; Berman, Judit; Bonet, María Luisa; Boronat, Albert; Canas, Jose A.; Capell, Teresa; Cárdenas-Conejo, Yair; Carle, Reinhold; Cerda, Ariel; Chacón-Ordóñez, Tania; Christou, Paul; Cuéllar, Fabio A.; De Pourcq, Karel; Dias, Maria Da Graça; Esquivel, Patricia; Estévez-Santiago, Rocío; Farre, Gemma; Gallardo-Guerrero, Lourdes; Gámbaro, Adriana; Gandul-Rojas, Beatriz; García Romero, Josefa; García-Rodríguez, María del Valle; Garrido-Fernández, Juan; Garza-Caligaris, Luz Elena; Gavilán Bravo, Andrés; Ginés, Rafael; Godoy-Hernández, Gregorio; Gómez-Gómez, Lourdes; Hempel, Judith; Heredia, Francisco J.; Hernández-Gras, Francesc; Hornero Méndez, D.; Izquierdo, Marisol; Jarén-Galán, Manuel; Jiménez, Víctor M.; Lado, Joanna; Limón, M. Carmen; Lugo-Cervantes, Eugenia; Luque de Castro, Maria Dolores; Maldonado, Eliana M.; Mapelli-Brahm, Paula; Martínez Vázquez, Ana; Meléndez-Martínez, Antonio J.; Mellado-Ortega, Elena; Mercadante, Adriana Z.; Molina-Calle, María; Murillo, Enrique; Odorissi, Ana A.; Olmedilla-Alonso, Begoña; Ornelas-Paz, José de Jesús; Osorio, Coralia; Palou, Andreu; Pérez-Gálvez, Antonio; Ribot, Joan; Rivera-Madrid, Renata; Robaina, Lidia; Roca, María; Rodrigo, Maria Jesús; Rodríguez-Concepción, Manuel; Rubio-Moraga, Ángela; Ruiz-Sola, M. Águila; Saavedra, Gloria F.; Salinas, M. Rosario; Schweiggert, Ralf M.; Simpson, Kevin; Stange, Claudia; Stinco, Carla M.; Vargas-Murga, Liliana; Vicario, Isabel M.; Zacarías, Lorenzo; Zhu, Changfu; Zorrilla-Lopez, Uxue.

Las opiniones, conceptos, tablas, gráficas, ilustraciones y fotografías que aparecen en cada uno de los capítulos son responsabilidad exclusiva de los autores. Las figuras que aparecen reproducidas en diferentes capítulos se han usado con permiso de sus autores.

Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o método, sin autorización previa y por escrito de los titulares del copyright.

Producción: Editorial Terracota, SA de CV / México

Edición: Pilar Tapia

Realización: Jeanette Vázquez Gabriel

Fotografías: Autores y Freeimages

ISBN 978-84-15413-35-6

**Distribución:**

RED TEMÁTICA IBERCAROT

(referencia 112RT445) <http://carotenoides.us.es>

PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y  
TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO – CYTED



# ÍNDICE

<b>8</b>	<b>Prólogo</b> Antonio J. Meléndez-Martínez
<b>9</b>	<b>Preface</b> Delia B. Rodríguez-Amaya y George Britton
<b>12</b>	<b>1. Carotenoides: estructura, propiedades y funciones</b> Antonio J. Meléndez-Martínez
<b>32</b>	<b>2. Consideraciones generales para el análisis de los carotenoides</b> Antonio J. Meléndez-Martínez, Paula Mapelli-Brahm, Ana Benítez-González, Carla M. Stinco y Enrique Murillo
<b>51</b>	<b>3. Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución</b> Antonio Pérez-Gálvez, Ana Augusta O. Xavier, Manuel Jarén-Galán, Antonio J. Meléndez-Martínez, Ana Benítez-González, Carla M. Stinco y Juan Garrido-Fernández
<b>78</b>	<b>4. Identificación de carotenoides</b> Adriana Z. Mercadante
<b>95</b>	<b>5. Estrategias en metabolómica para el estudio de los carotenoides en plantas y su acción en el organismo humano</b> María Dolores Luque de Castro y María Molina-Calle

**118**

6. Aplicación de las medidas de espectrometría visible y de color al análisis de carotenoides en alimentos

Antonio J. Meléndez-Martínez, Isabel M. Vicario y Francisco J. Heredia

**141**

7. Análisis sensorial de color

Adriana Gámbaro

**153**

8. Estrategias computacionales para evaluar mecanismos de acción antirradical de carotenoides

Ana Martínez Vázquez

**167**

9. Biosíntesis de carotenoides: consideraciones generales

M. Águila Ruiz-Sola y Manuel Rodríguez-Concepción

**187**

10. Biosíntesis de carotenoides en zanahorias

Ariel Cerda, Kevin Simpson y Claudia Stange

**208**

11. Biosíntesis y acumulación de carotenoides en el fruto de tomate

Francesc Hernández-Gras, Karel de Pourcq, Djédoux Maxime Angaman y Albert Boronat

**223**

12. Carotenoides en frutos cítricos: diversidad y biosíntesis

Joanna Lado, Fabio A. Cuéllar, Lorenzo Zacarías y María Jesús Rodrigo

247

13. Biosíntesis de carotenoides en azafrán

Oussama Ahrazem, Ángela Rubio-Moraga y Lourdes Gómez-Gómez

260

14. Avances biotecnológicos para potenciar la producción de carotenoides de *Bixa orellana* (achiote) para su uso y aprovechamiento agroindustrial

Renata Rivera-Madrid, Gregorio Godoy-Hernández, Margarita Aguilar-Espinosa, Yair Cárdenas-Conejo, Luz Elena Garza-Caligaris y Eugenia Lugo-Cervantes

280

15. Biosíntesis de carotenoides en hongos

Javier Ávalos y M. Carmen Limón

312

16. Ingeniería genética de la ruta biosintética de los carotenoides

Judit Berman, Uxue Zorrilla-Lopez, Gemma Farré, Teresa Capell, Paul Christou y Changfu Zhu

341

17. Influencia de factores ambientales, agronómicos, genéticos y fisiológicos en el contenido de carotenoides en frutas y hortalizas

Gloria F. Saavedra y Eliana M. Maldonado

354

18. Tabla de contenido en carotenoides de alimentos iberoamericanos

M. Graça Dias, Begoña Olmedilla-Alonso, Dámaso Hornero-Méndez, Adriana Z Mercadante, Coralia Osorio, Liliana Vargas-Murga y Antonio J. Meléndez-Martínez

**430**

19. Estimación de la ingesta de carotenoides en la dieta

Begoña Olmedilla-Alonso y Rocío Estévez-Santiago

**444**

20. Metabolismo de carotenoides en el fruto del olivo y sus modificaciones en el procesado industrial

María Roca, Lourdes Gallardo-Guerrero y Beatriz Gandul-Rojas

**472**

21. Carotenoides en cereales

Elena Mellado-Ortega y Dámaso Hornero-Méndez

**501**

22. Carotenoides hidrofílicos del azafrán

María del Valle García-Rodríguez, María José Bagur, M. Rosario Salinas y Gonzalo L. Alonso

**522**

23. Carotenoides en piensos para acuicultura y calidad de peces de cultivo

Lidia Esther Robaina Robaina, Josefa García Romero, Rafael Ginés Ruiz y Marisol Izquierdo López

**537**

24. Carotenoides y ganadería

Rocío Álvarez y María Jesús Alcalde

**557**

25. Formas de deposición de carotenoides en alimentos vegetales y sus posibles implicaciones en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad

Patricia Esquivel, Víctor M. Jiménez, Tania Chacón-Ordóñez, Judith Hempel, Ralf M. Schweiggert y Reinhold Carle

**574**

26. Biodisponibilidad de carotenoides, factores que la determinan y métodos de estimación

Antonio J. Meléndez-Martínez, Antonio Pérez-Gálvez, María Roca, Rocío Estévez-Santiago, Begoña Olmedilla-Alonso, Adriana Z. Mercadante y José de Jesús Ornelas-Paz

**609**

27. El modelo de asimilación por difusión facilitada de carotenoides. Transportadores y metabolismo

Antonio Pérez-Gálvez y María Roca

**628**

28. Carotenoides y salud humana: potencial efecto anti-obesidad

M. Luisa Bonet, Joan Ribot, José A. Canas y Andreu Palou

**670**

29. Consideraciones para el uso de los carotenoides en los alimentos funcionales

Andrés Gavilán Bravo

**687**

30. Seguridad de los carotenoides: estudios toxicológicos, reacciones adversas e interacciones con fármacos

Liliana Vargas-Murga

**704**

Sobre los autores

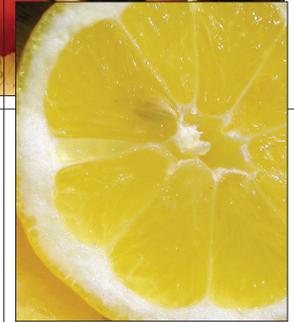
# PRÓLOGO

Antonio J. Meléndez-Martínez

Los carotenoides son compuestos especiales; si bien es común referirse a ellos como pigmentos, lo cierto es que son compuestos de gran versatilidad e importancia en la naturaleza. Más específicamente, son de gran interés en agroalimentación y salud. Así, por ejemplo, son pigmentos naturales y por lo tanto tienen un importante papel en la elección de alimentos por parte de los consumidores. Asimismo, algunos de ellos son precursores de la vitamina A. Sin embargo, que cada vez exista más interés en los carotenoides en este contexto se debe en gran parte a muchos estudios de distinta naturaleza que indican que pueden proporcionar beneficios para la salud. Su interés en alimentación funcional es por lo tanto indudable.

En este libro se refleja la experiencia en carotenoides de un gran número de profesionales de la región iberoamericana. En conjunto, se ofrece una visión general de la investigación sobre estos compuestos en agroalimentación y salud. Los autores son miembros de la red IBERCAROT (<http://carotenoides.us.es>), que tiene entre sus objetivos conformar una red estable y funcional de profesionales que aúnen esfuerzos en pos de identificar nuevas fuentes de carotenoides de interés nutricional, mejorar su producción y aumentar el valor de los productos que los contengan.

Me gustaría agradecer a todas y cada una de las personas que han contribuido de una u otra forma a que este libro sea una realidad. Todos esperamos que sea de ayuda para personas interesadas en los temas desarrollados. Gracias especialmente al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED, <http://www.cytcd.org/>) que, con su apoyo económico a la red IBERCAROT, ha hecho posible que varias decenas de equipos interactúen en torno a temas de interés común para contribuir al desarrollo a distintos niveles de la región iberoamericana.



# PREFACE

Delia B. Rodriguez-Amaya

Nature has endowed Ibero-American countries with a remarkable diversity of rich carotenoid sources. With this inspiring background, Ibero-American researchers have intensely investigated carotenoids for about five decades, contributing substantially to current knowledge on these fascinating compounds. Ibero-American research on carotenoids spans a wide range of topics, including development and validation of analytical methods, determination of the carotenoid composition of Ibero-American foods, genetic and environmental factors affecting composition, biosynthesis and its regulation, carotenogenesis during fruit ripening, effects of home and industrial processing, kinetics and mechanisms of degradation, factors influencing oxidation, antioxidant activity, development of carotenoid-rich food products, bioaccessibility and bioavailability, biotechnological production, microencapsulation and nanoencapsulation, carotenoids as food and feed colorants and precursors of aroma compounds, health-promoting effects.

Ibero-American researchers have come and gone, but strong carotenoid research has gone on. The new breed of Ibero-American carotenoid researchers, organized into a network under the leadership of Antonio J. Meléndez-Martínez, will surely keep and strengthen the tradition.



# PREFACE

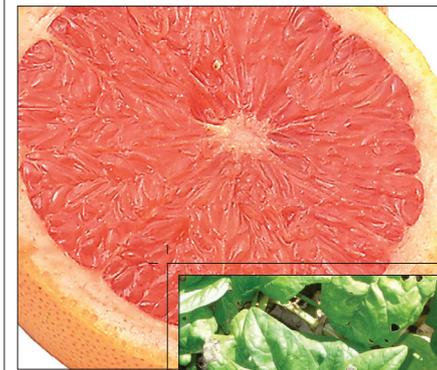
George Britton

Bright colour in foods is considered a sign of quality and freshness. Carotenoids are responsible for the prized bright colours of many fruit and vegetables, including such familiar examples as oranges and tomatoes. We also like to see bright, natural-looking colours in manufactured food, and this is achieved by adding pigments or coloured extracts during manufacture. With the current consumer demand for natural materials, carotenoids and carotenoid-rich extracts are produced on a vast scale as colorants.

Since their relationship to vitamin A was realised some 80 years ago, carotenoids have been recognised as nutritionally important substances. Other areas of interest have emerged in recent years. It is now clear that lutein and zeaxanthin are important in the macula lutea and in prevention of Age-related Macular Degeneration, and may have a role in brain development and maintenance of cognitive function. Carotenoids are included by many in the list of important natural antioxidants, and some, including b-carotene, lycopene, cryptoxanthin, are associated with reduced incidence of cancer, coronary heart disease and other degenerative conditions.

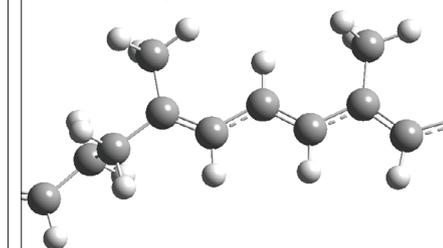
Many of the food sources of carotenoids that we now take for granted, notably tomato, pepper, maize, annatto, are native to South and Central America and there are many other native fruits that have not been fully investigated.

There is a tradition of carotenoid research in Spain, Portugal, and Latin America, though most researchers have worked largely independently and in isolation. The IBERCAROT network brings current researchers together to stimulate progress by promoting exchange of ideas, sharing of facilities, and



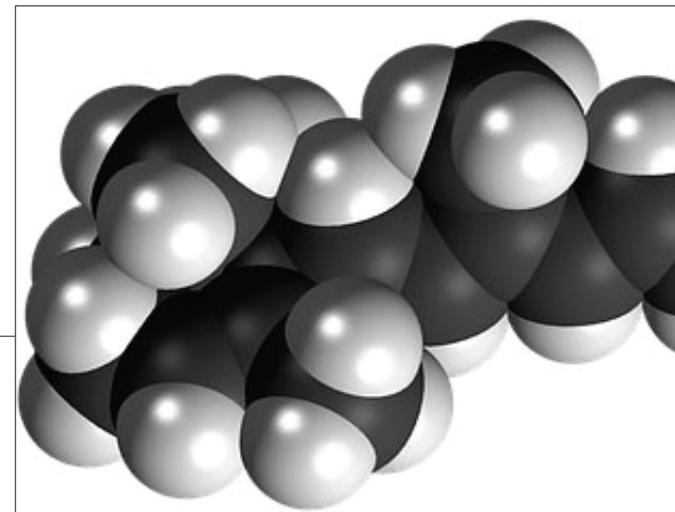
interactions between academic scientists and commercial organisations. The success of this is an excellent example of what can be achieved through vision, hard work and cooperation. It should serve as an inspiration to people in other regions of the world to build similar initiatives. IBERCAROT is an exciting development which I will follow with great interest over the coming years.

Although IBERCAROT has only been operating for a short time, this book is a testament to the breadth and high quality of research encompassed by the network and the benefits that can be gained by such an initiative.



# CAROTENOIDES: ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIONES

Antonio J. Meléndez-Martínez



### INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos especiales; si bien es común referirse a ellos como pigmentos, lo cierto es que son compuestos de gran versatilidad que, de hecho, no fueron inventados para proporcionar color. Es significativo que los carotenoides estén presentes en uno de los primeros habitantes de la Tierra, las cianobacterias (antiguamente conocidas como algas verde-azuladas), consideradas como el origen de los cloroplastos (Takaichi y Mochimaru, 2007). También hay carotenoides en plantas, algas, hongos, bacterias y animales. Son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, algunas bacterias no fotosintéticas y algunos hongos. Los animales, no pueden sintetizarlos *de novo* aunque sí pueden modificarlos estructuralmente (Fraser y Bramley, 2004). No obstante, recientemente se han descubierto algunas excepciones entre los artrópodos. Así, por ejemplo, hay pulgones cuyo genoma codifica enzimas funcionales para la biosíntesis de carotenoides. Se piensa que los genes carotenogénicos provienen de hongos a través de transferencia lateral (Moran y Jarvik, 2010). Hasta hoy se han descrito más de 700 carotenoides, que se pueden encontrar en animales (esponjas, medusas, peces, moluscos, insectos, reptiles, anfibios, mamíferos, aves, etc.), diversas estructuras de las plantas (tejidos fotosintéticos, pétalos,

anteras, estigmas, raíces, frutos, semillas, etc.), algas y hongos macroscópicos y una gran variedad de microorganismos (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2008; Goodwin, 1980a; 1980b) adaptados a distintas condiciones, incluyendo halotolerantes, termófilos y psicófilos, entre otros (Amaretti *et al.*, 2014; Ben Amotz, 1996; Duc *et al.*, 2006; Olmos-Soto y Ruiz, 2012; Tian y Hua, 2010).

Considerando lo expuesto, queda claro que los carotenoides han estado presentes desde muy temprano en la historia de la vida en la Tierra. También que son ubicuos en la naturaleza y se encuentran en organismos adaptados a ambientes tan distintos como las profundidades de los océanos, glaciares montañosos, aguas termales, ambientes hipersalinos, etc. En consecuencia, no parece descabellado pensar que a lo largo de la evolución distintos organismos los han utilizado para distintos fines.

## HISTORIA

Puede considerarse que el estudio de los carotenoides comenzó en el siglo XIX. El término carotenoide procede del nombre científico de la zanahoria (*Daucus carota* L.), que fue la fuente de la que Wackenroder (1831) los aisló. Poco después, también se puso de manifiesto su presencia en hojas otoñales (Berzelius, 1837) y se acuñó el término xantofila. Ya a principios del siglo XX, se consiguió separar los carotenoides de las clorofilas de hojas verdes en una columna de carbonato cálcico. Esto supuso el nacimiento de la cromatografía, término que hace referencia a la separación de bandas de distinta coloración. Tal hito se debió al botánico ruso Tswett (1906). Debido a su inestabilidad, la investigación en carotenoides adelantó lentamente en comparación con la de otros

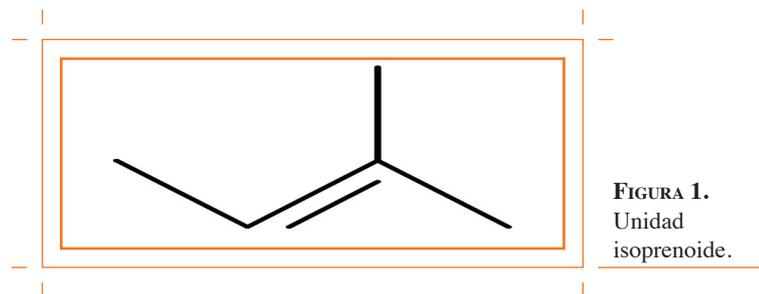
compuestos; no obstante, gracias a los estudios de científicos como Willstätter, Mieg, Zechmeister, Kuhn, Karrer y Jucker se avanzó mucho en su conocimiento, de forma que, entre otras cosas, se demostró que eran isoprenoides poliénicos con enlaces conjugados (Eugster, 1995).

Indudablemente, el descubrimiento por parte de Moore de que el  $\beta$ -caroteno podía convertirse en vitamina A *in vivo*, aumentó considerablemente el interés por estos compuestos (Moore, 1930). De hecho, el número de carotenoides descritos en décadas posteriores aumentó considerablemente, como puede comprobarse en los distintos libros monográficos publicados a lo largo del siglo XX (Goodwin, 1980a; 1980b; Isler, 1971; Karrer y Jucker, 1948; Pfander, 1987; Zechmeister, 1962). Ya en el siglo XXI, el *Handbook of Carotenoids* (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004) lista en torno a 700 carotenoides descritos, junto con información para su aislamiento e identificación.

## ESTRUCTURA QUÍMICA

### Generalidades y tipos de carotenoides

Típicamente, los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoideas (figura 1), aunque hay excepciones.



**FIGURA 1.**  
Unidad  
isoprenoidea.

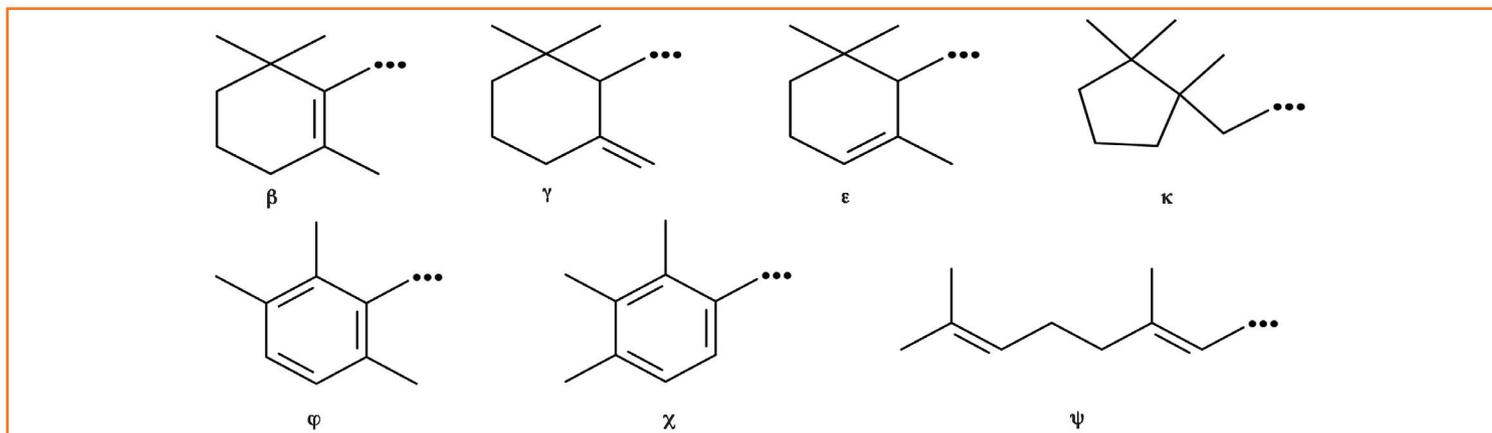


FIGURA 2. Grupos terminales presentes en las moléculas de carotenoides.

En la molécula de los carotenoides pueden existir anillos, de ahí que se puedan clasificar como cíclicos o acíclicos. Los distintos grupos terminales presentes en los carotenoides se representan en la figura 2.

En los carotenoides, la numeración de los átomos de carbono va de los extremos hacia el centro, contándose normalmente del 1 al 15 y del 1' al 15'. Los grupos metilo se cuentan del 16 al 20 y del 16' al 20' respectivamente, como se muestra en la figura 3.

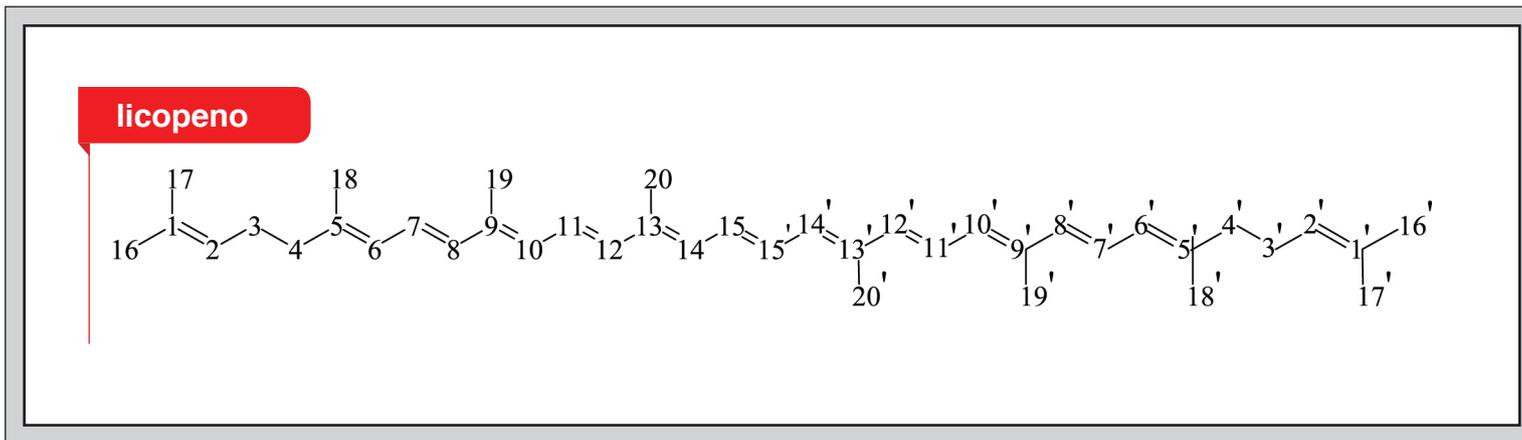


FIGURA 3A. Numeración de los átomos de carbono del licopeno.

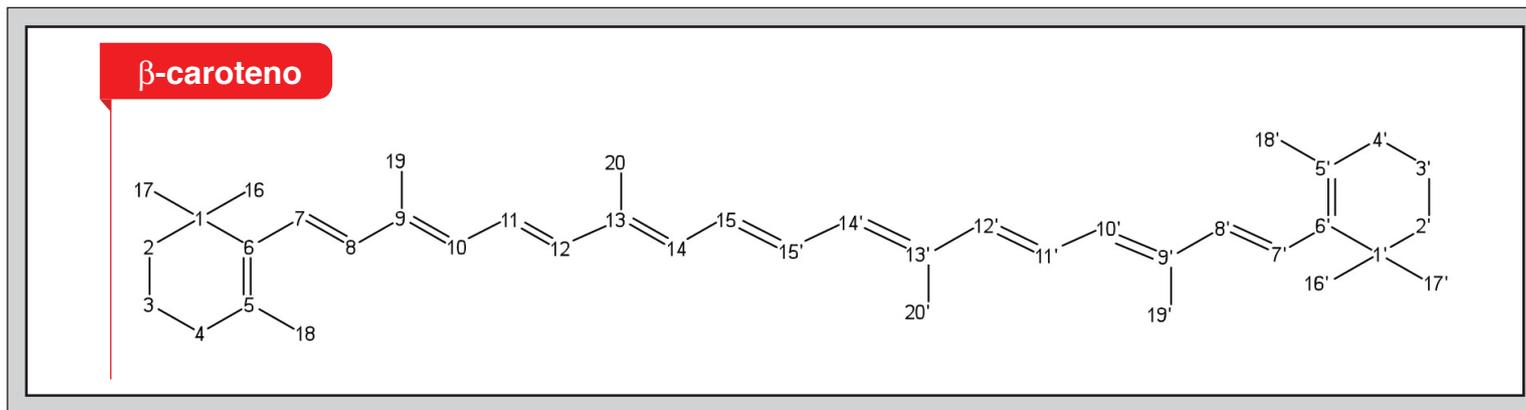


FIGURA 3B. Numeración de los átomos de carbono del β-caroteno.

La característica estructural más notoria en los carotenoides es el sistema de dobles enlaces conjugados (d.e.c.) (figura 4). Dicho sistema es, entre otras cosas, el principal responsable de su color, reactividad y forma así como de su papel en procesos de transferencia de energía (Britton, 1995a).

Considerando los elementos químicos presentes en ellos, los carotenoides pueden clasificarse en carotenos (hidrocarburos) y xantofilas, que contienen átomos de oxígeno además de carbono e hidrógeno. En el caso de los carotenoides típicos de la dieta, el oxígeno suele estar presente en las xantofilas en forma de grupo hidroxilo (luteína, zeaxantina), epóxido (violaxantina, neoxantina, anteraxantina) o carbonilo (cantaxantina, astaxantina). No obstante, en otras fuentes puede formar parte de grupos metoxilo, carboxilo, acetato, lactona o sulfato (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004).

Dentro de los carotenoides se pueden distinguir además otros grupos. Por ejemplo, los apocarotenoides (como la crocetina del azafrán, figura 4) poseen menos de 40 átomos de carbono, ya que en ellos faltan fragmentos en uno o ambos

extremos de la molécula. Otro ejemplo de carotenoides con menos de 40 carbonos son los norcarotenoides (como la peridina, pigmento típico de microalgas dinoflageladas, figura 4). En los norcarotenoides faltan uno, dos o tres átomos de carbono del esqueleto hidrocarbonado central. Asimismo, también hay carotenoides con 45 o 50 átomos de carbono; estos carotenoides se pueden encontrar en algunas bacterias y contienen una o dos unidades isoprenoides más en comparación con los carotenoides típicos. Un ejemplo es la decaprenoxantina (figura 4). Los secocarotenoides (como la semi-β-carotenona) son carotenoides en los que se ha roto un enlace entre carbonos adyacentes (excepto los carbonos 1 y 6 de anillos). Un ejemplo, es la semi-β-carotenona (figura 4). Por otra parte, en la mayoría de los carotenoides, los carbonos 15 y 15' están unidos mediante un doble enlace. No obstante, en los retrocarotenoides la posición de los dobles enlaces a lo largo de la cadena poliénica está desplazada. Así, en los retrocarotenoides dichos carbonos están unidos por un enlace simple. Un ejemplo de este grupo es la rodoxantina (figura 4) (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004).

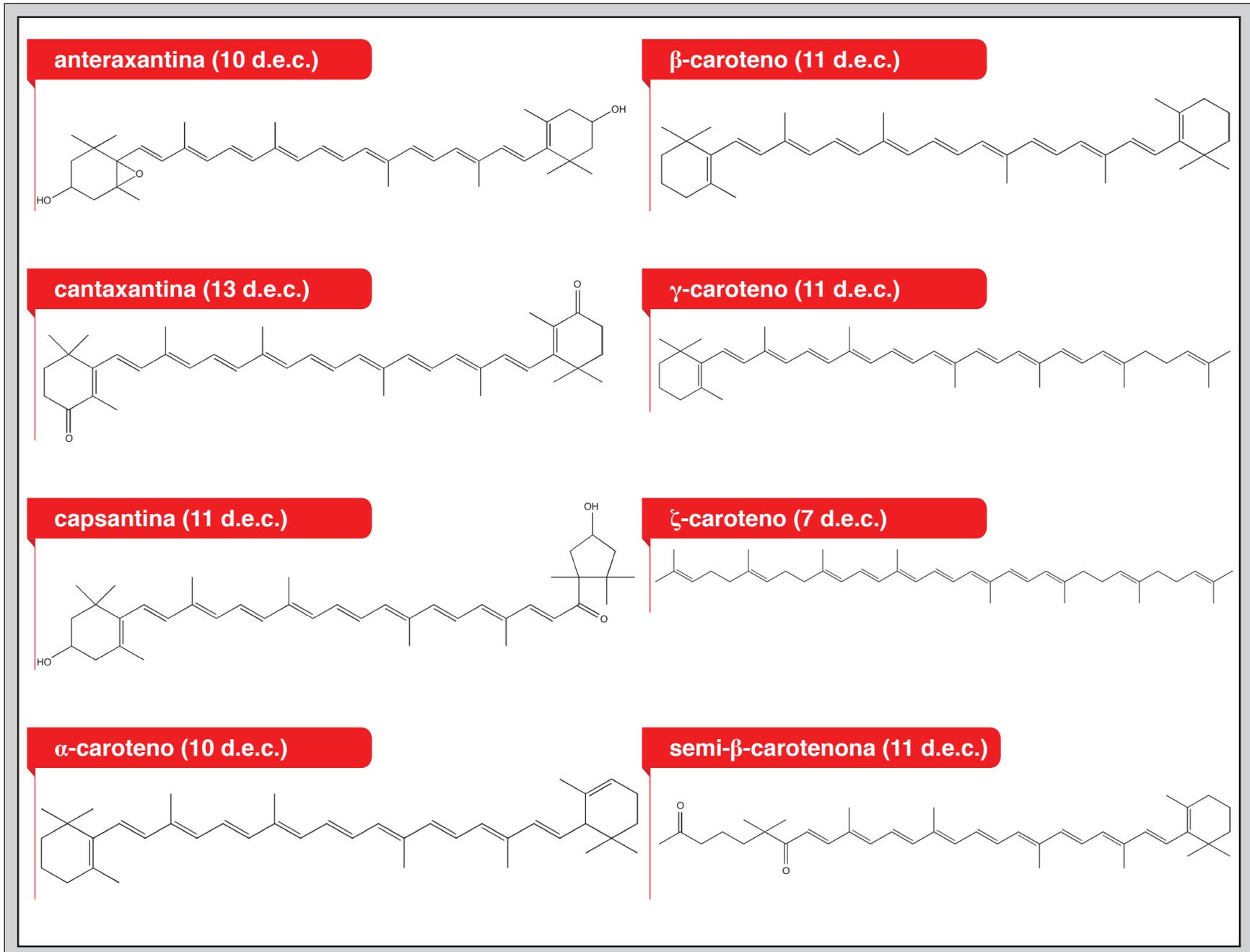


FIGURA 4. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

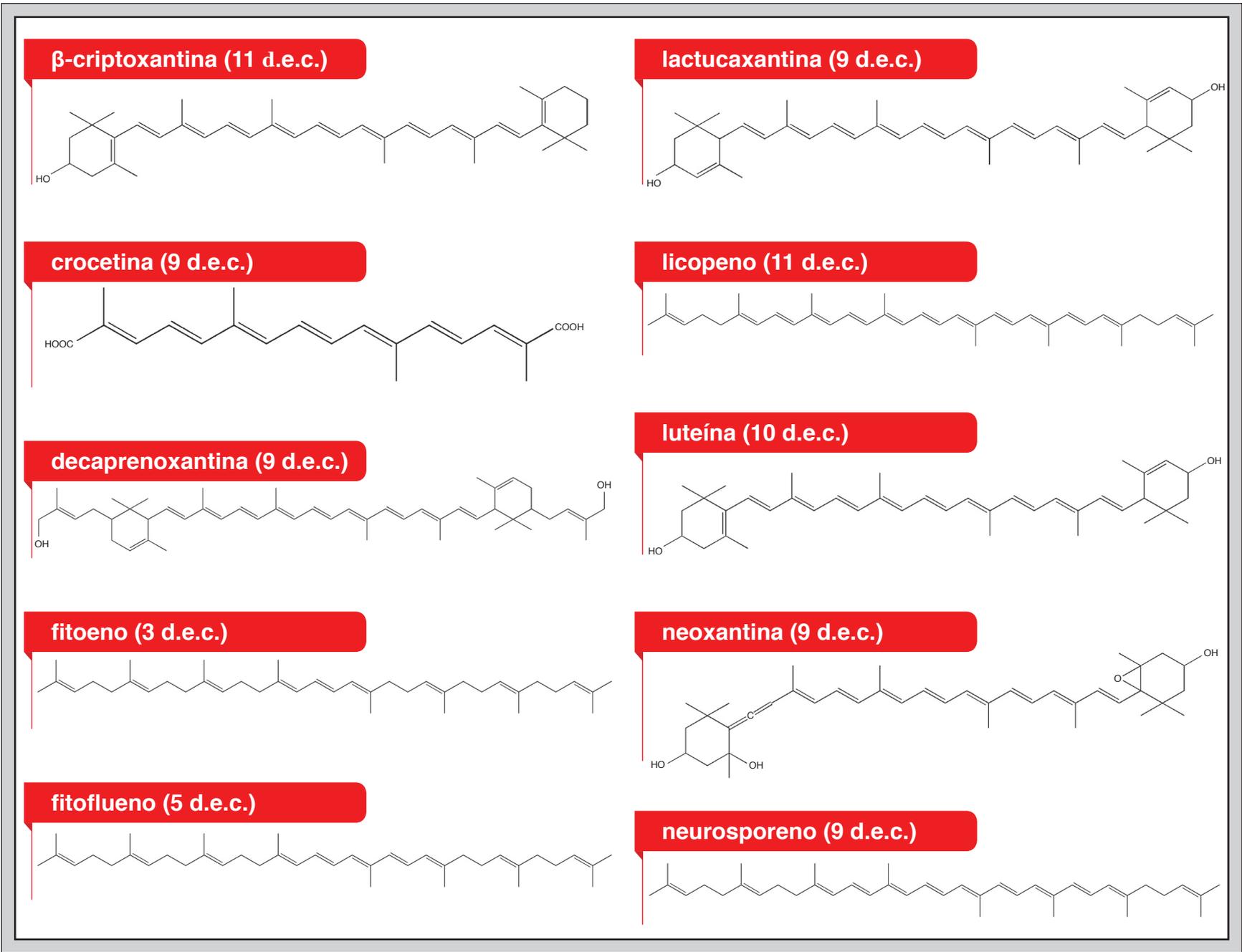


FIGURA 4. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

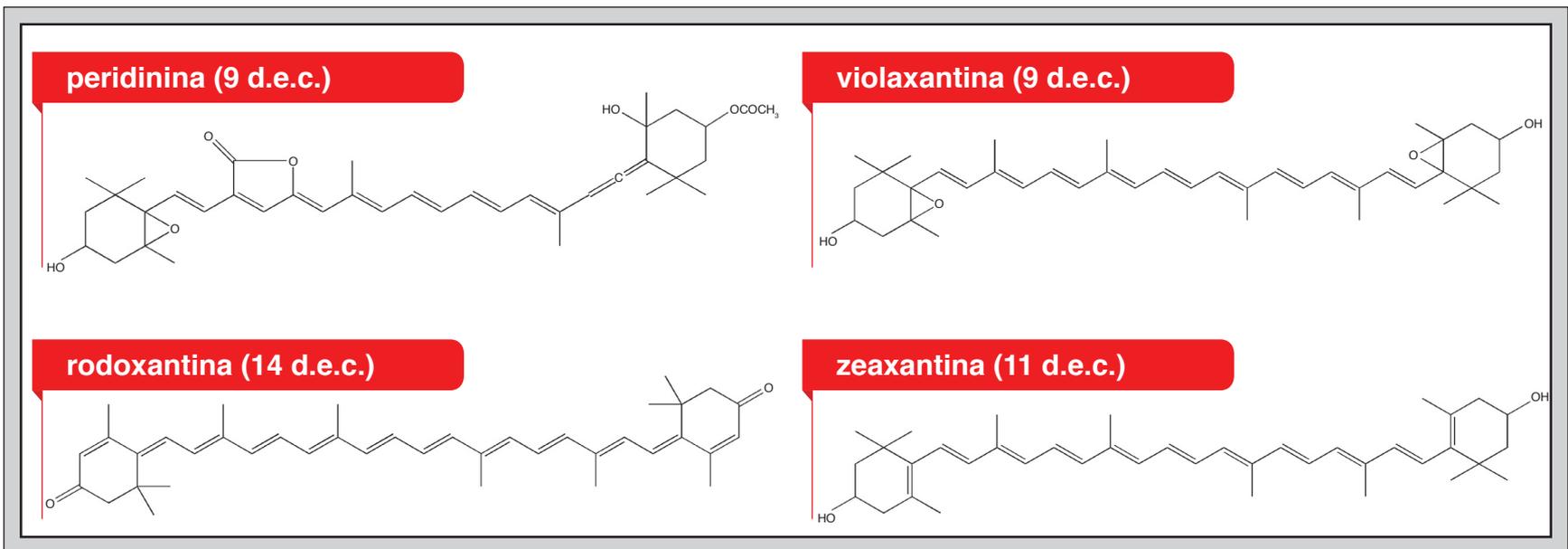


FIGURA 4. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

### Ésteres, glucósidos y carotenoproteínas

Las xantofilas pueden estar presentes en las fuentes en las que se encuentran libres o esterificadas. Así, en pimientos, patatas o papas, mango, cítricos y otras fuentes las xantofilas se pueden encontrar esterificadas con ácidos grasos (Breithaupt y Bamedi, 2002; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2000; Murillo *et al.*, 2013; Philip, Chen y Nelson, 1988; Pott, Breithaupt y Carle, 2003;). Asimismo, existen carotenoides asociados con azúcares en otras fuentes; así, la crocetina (figura 4) puede encontrarse asociada con azúcares en estigmas de azafrán y frutos de gardenia (Van Calsteren *et al.*, 1997; Pfister *et al.*, 1996).

Por otra parte, los carotenoides pueden encontrarse también formando complejos hidrosolubles de gran estabilidad con

proteínas (carotenoproteínas), lipoproteínas o glucoproteínas. Estos complejos pueden encontrarse en invertebrados (Bhosale y Bernstein, 2007; Cheesman, Lee y Zagalsky, 1967; Goodwin, 1980b).

### Isómeros espaciales

Pueden existir asimismo distintos isómeros geométricos (*cis/trans* o, más correctamente, *Z/E*) de carotenoides. No todos los isómeros *cis* que podrían preverse teóricamente existen, ya que, debido sobre todo a impedimentos estéricos, sólo algunos son estables (Britton, 1995a; Weedon y Moss, 1995). Normalmente los carotenoides naturales se encuentran en su mayoría como isómeros *todo-trans* (*todo-E*), que suelen ser más estables. No obstante, varios estudios indican que algunos isómeros *cis* podrían ser más estables que los correspondientes

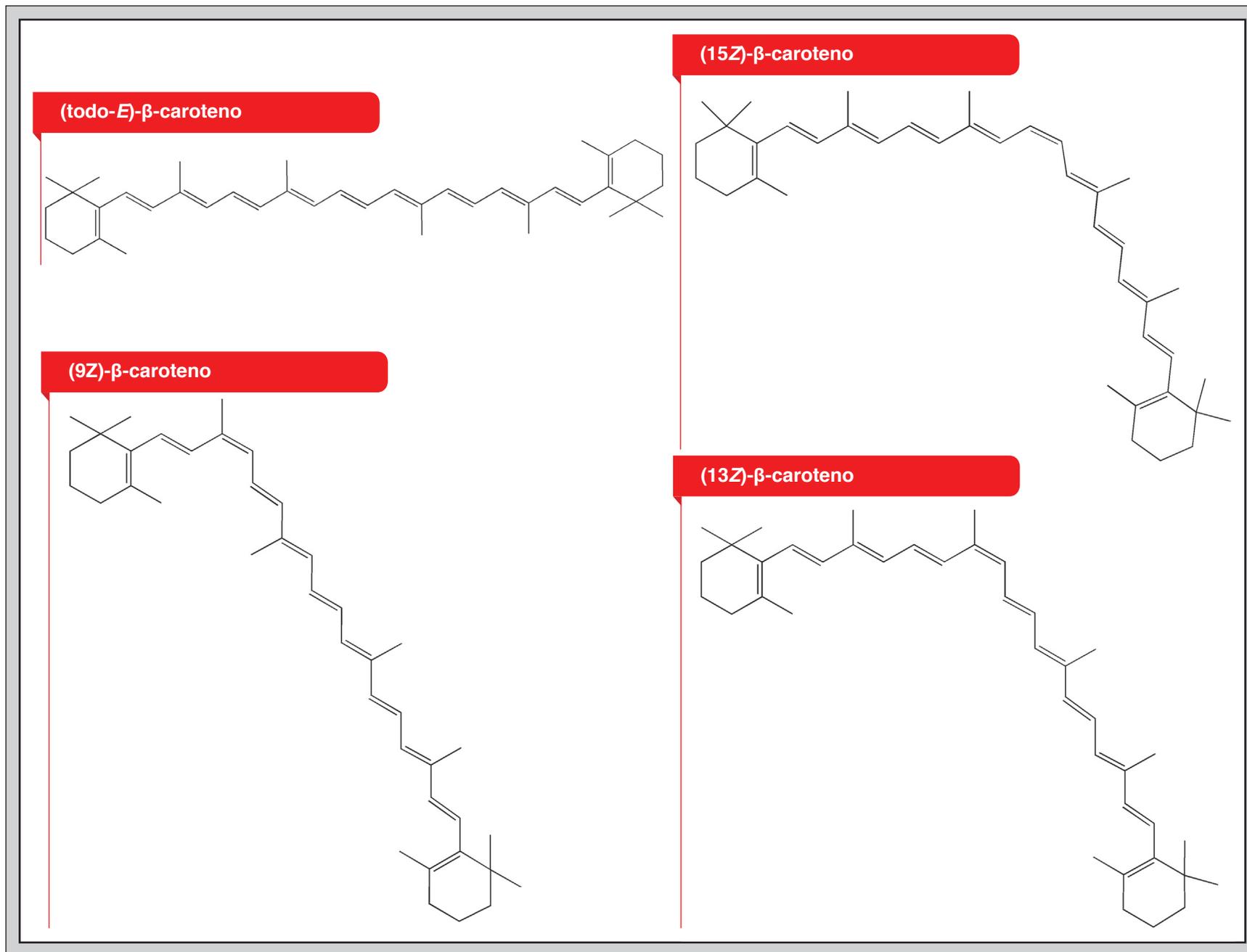


FIGURA 5. Estructuras químicas de algunos isómeros geométricos del β-caroteno.

todo-*E* en algunos carotenos acíclicos, como licopeno, fitoeno y fitoflueno (Chasse *et al.*, 2001; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014). En cualquier caso, es común encontrar cantidades importantes de isómeros *cis* (isómeros *Z*) en fuentes naturales. Algunos ejemplos son el fitoeno, presente fundamentalmente como (15*Z*)-fitoeno en organismos carotenogénicos (Than *et al.*, 1972), la (9'*Z*)-neoxantina (presente en tejidos fotosintéticos de todas las plantas y muchas algas) (Strand *et al.*, 2000) y algunos isómeros de los epoxicarotenoides violaxantina y anteraxantina (presentes en naranjas) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007a). En relación con la presencia de isómeros *Z* en alimentos u otras fuentes es siempre importante tener en cuenta que, en algunos casos, pueden ser artefactos analíticos o haberse formado como consecuencia de tratamientos tecnológicos o culinarios (Rodríguez-Amaya, 1997; Schieber y Carle, 2005).

Como se puede observar en la figura 5, los distintos isómeros geométricos de un mismo carotenoide tienen formas y tamaños muy diferentes. La diferenciación entre distintos isómeros geométricos de carotenoides es importante porque existen evidencias de que en algunos casos podría haber diferencias en relación con su biodisponibilidad, reactividad, especificidad por enzimas, etc. (Böhm *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006; Parry, Babiano, y Horgan, 1990; Stahl *et al.*, 1992).

Por otra parte, muchos carotenoides naturales poseen centros quirales, por lo que pueden existir diversos isómeros ópticos de cada uno de ellos. Un ejemplo típico es la zeaxantina (figura 6) (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004).

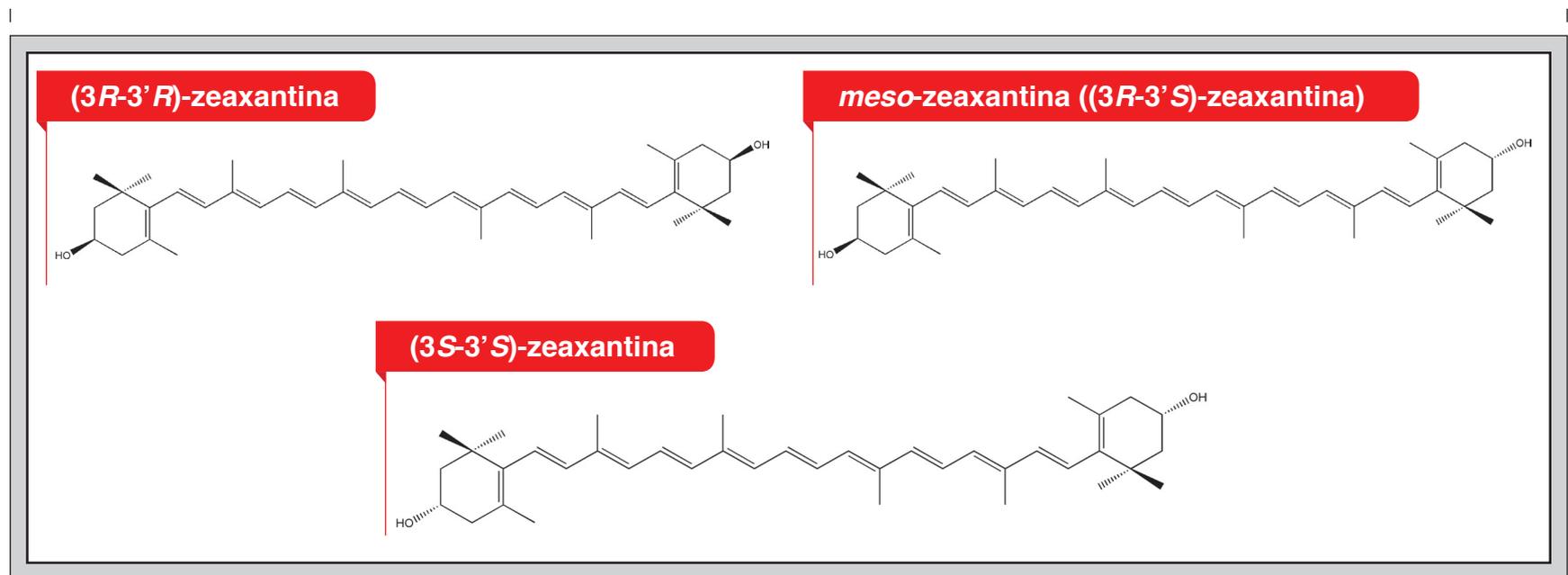


FIGURA 6. Estructuras químicas de isómeros ópticos de la zeaxantina.

## Nomenclatura

Además de la nomenclatura tradicional de los carotenoides, que suele hacer referencia a la fuente de la que se aislaron por primera vez, también se puede usar una nomenclatura semi-sistemática, que tiene la ventaja de que proporciona información estructural. En esta nomenclatura se consideran las dos mitades de la molécula del compuesto, y éste se nombra como derivado del caroteno correspondiente. Para ello se hace referencia a los grupos terminales de éste mediante letras griegas. Asimismo se usan números, prefijos y sufijos para indicar la presencia de sustituyentes, cambios en el nivel de hidrogenación, centros quirales, etc. (Weedon y Moss, 1995). Algunos ejemplos de nombres semi-sistemáticos de carotenoides se muestran en la tabla 1. Sus estructuras están representadas en la figura 4.

**TABLA 1.** Nombres comunes y semi-sistemáticos de diversos carotenoides

Nombre tradicional	Nombre semi-sistemático
$\beta$ -Caroteno	$\beta,\beta$ -caroteno
Fitoeno	7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- $\psi$ , $\psi$ -caroteno
$\beta$ -Criptoxantina	$\beta,\beta$ -caroten-3-ol
Neoxantina	5',6'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'- tetrahidro- $\beta,\beta$ -caroteno-3,5,3'-triole
Capsantina	3,3'-dihidroxi- $\beta,\kappa$ -caroten-6'-ona
Crocetina	8,8'-diapocaroteno-8,8'-ácido dioico

**Fuente:** Adaptado de Rodríguez-Amaya (2001).

## PROPIEDADES

### Solubilidad

Las gran mayoría de los carotenoides son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, como acetona, metanol, hexano y éter dietílico, entre muchos otros. Por otra parte, los carotenoides ácidos pueden formar sales solubles en agua por tratamiento con una base. La esterificación de xantófilas va a modificar sus características, de forma que la asociación con ácidos grasos aumentará su lipofilicidad. Por el contrario, si las xantófilas se encuentran asociadas con azúcares, aumentará su hidrofiliidad. Asimismo, las carotenoproteínas son solubles en agua y muy estables. Debido a su carácter hidrofóbico, los carotenoides *in vivo* se suelen localizar normalmente en ambientes lipófilos, como por ejemplo en membranas (Britton, 1983; 1992; Britton, 1995 ab; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995 ).

### Absorción de luz

Debido a la presencia del cromóforo de dobles enlaces conjugados, los carotenoides (con pocas excepciones) absorben luz UV-visible. Normalmente aparecen tres máximos de absorción. Las longitudes de onda a las que aparecen ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) dependen del número de dobles enlaces conjugados y del disolvente empleado para medir el espectro (Britton, 1995b). Con independencia del disolvente usado, los valores de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  aumentan a medida que lo hace la longitud del cromóforo, como se puede observar en el cuadro 2. Además, se observa que el efecto de este incremento se reduce al aumentar la extensión del cromóforo. Los dobles enlaces no conjugados no afectan significativamente al espectro.

**TABLA 2.** Efecto de la longitud del cromóforo en los máximos de absorción de carotenoides acíclicos

Carotenoide	Número de d.e.c. (d.e.c. en anillos)	$\lambda_{\text{máx}}$ en éter de petróleo (nm)
Fitoeno	3	276, 286, 297
Fitoflueno	5	331, 348, 367
ξ-Caroteno	7	378, 400, 425
Neurosporeno	9	414, 439, 467
Licopeno	11	444, 470, 502
γ-Caroteno	11 (1)	437, 462, 494
β-Caroteno	11 (2)	425, 449, 476

**Fuente:** Adaptado de Rodríguez-Amaya (2001).

La extensión del sistema de d.e.c. a un anillo, como ocurre por ejemplo en los anillos β, extiende el cromóforo. En este caso, el anillo no es coplanar con la cadena poliénica lineal central y las  $\lambda_{\text{máx}}$  aparecen a longitudes de onda menores en comparación con los carotenoides no cíclicos con el mismo número de dobles enlaces conjugados. Esto se observa claramente al comparar las  $\lambda_{\text{máx}}$  de licopeno (11 d.e.c., carotenoide acíclico), γ-caroteno (11 d.e.c., uno de ellos en el anillo terminal) y β-caroteno (11 d.e.c., dos en los anillos terminales) (cuadro 2). Es evidente que los grupos carbonílicos conjugados con el sistema de d.e.c. también aumentan la longitud del cromóforo. En general, la presencia de un grupo carbonílico conjugado en un anillo desplaza unos 10 nm a longitudes de onda aproximadamente superiores los máximos de absorción. Si, en cambio, dicho grupo se encuentra en la cadena poliénica central, el desplazamiento es de unos 30 nm a longitudes de

ondas superiores (Britton y Young, 1993; Rodríguez-Amaya, 2001).

Sobre el efecto del entorno molecular en la localización de la longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) es bien conocido que la energía de transición electrónica responsable de la banda de absorción principal del espectro depende del índice de refracción del disolvente, de forma que al aumentar éste, se producen desplazamientos del máximo a longitudes de onda más altas (cambios batocrómicos). Por lo tanto, los máximos de absorción de cualquier carotenoide en disolventes como hexano, éter de petróleo, etanol, éter dietílico y acetonitrilo son prácticamente idénticos, aunque se observan desplazamientos batocrómicos en los espectros realizados en disolventes como acetona (2-6 nm), cloroformo, cloruro de metileno (10-20 nm), piridina, benceno, tolueno (18-24 nm) y disulfuro de carbono (30-40 nm), entre otros. Aunque la gran mayoría de los carotenoides no son solubles en agua, este disolvente puede tener un efecto importante en los espectros de los carotenoides disueltos en disolventes miscibles con agua. Más concretamente, para algunos carotenoides, cuando el contenido de agua está dentro del intervalo entre 30-50%, se han descrito importantes disminuciones en la absorbancia al  $\lambda_{\text{máx}}$  y la aparición de un nuevo e intenso máximo de absorción en la región del UV cercano. Estos efectos se han atribuido a las interacciones entre cromóforos debidas a la agregación de las moléculas de carotenoides causadas por la presencia de altas cantidades de agua. Por otro lado, los carotenoides se encuentran *in vivo* en un entorno lipídico o proteico. Así, presentan máximos de absorción a longitudes de onda alrededor de 10 nm más altas que la  $\lambda_{\text{máx}}$  en hexano. Por otra parte, cuando los carotenoides están formando complejos con proteínas, se observan importantes desplazamientos batocrómicos. Como ejemplo, el carotenoide rojo astaxantina

presenta un máximo en acetona a 480 nm, mientras que la carotenoproteína  $\alpha$ -crustacianina, que contiene astaxantina, lo hace a 630 nm y es azulada (Britton 1983, Britton y Young 1993; Britton, 1995 ab; Britton 1992; Hoischen *et al.*, 1998).

La forma general del espectro de absorción de los carotenoides y la nitidez de las bandas de absorción (lo que comúnmente se denomina estructura fina) dependen fundamentalmente del grado de planaridad del sistema de d.e.c. La estructura fina suele expresarse como %III/II (figura 7).

En los carotenoides acíclicos (como el  $\zeta$ -caroteno) o cíclicos en los que el sistema de d.e.c. no se extiende a los anillos (como la auroxantina) el cromóforo puede adoptar una conformación casi completamente planar y en sus espectros aparecen máximos y mínimos de absorción perfectamente definidos, es decir muestran una elevada estructura fina. Cuando el sistema de d.e.c. se extiende a los anillos se producen

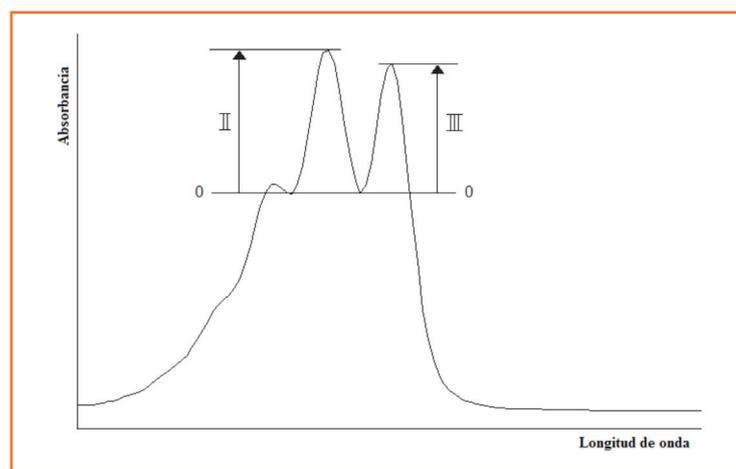
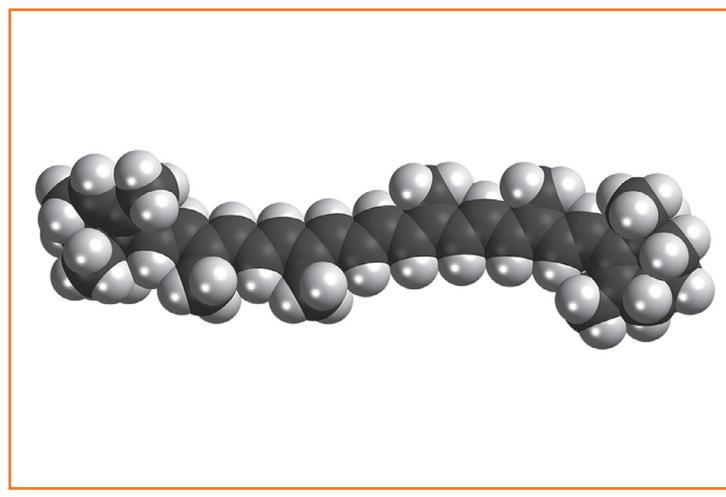
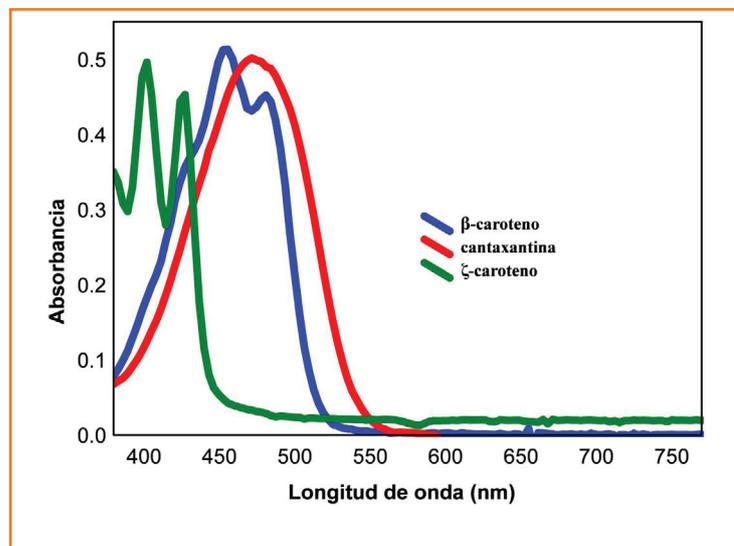


FIGURA 7. Representación de la estructura fina espectral.



impedimentos estéricos, como consecuencia de los cuales los dobles enlaces presentes en los anillos no son coplanares con los de la cadena poliénica central. Esto se manifiesta en el espectro en una pérdida de estructura fina. Como ejemplo, en carotenoides con dos anillos  $\beta$  (como  $\beta$ -caroteno), en los que hay un doble enlace conjugado en cada anillo, la primera de las bandas de absorción es más bien una inflexión. Por otra parte, cuando existen grupos funcionales carbonílicos conjugados se produce una pronunciada pérdida de estructura fina. De hecho, en algunos casos, el espectro de estos compuestos (como cantaxantina) se asemeja a una curva simétrica (Britton, 1995b; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001). Así, la estructura fina disminuye de la siguiente forma:  $\zeta$ -caroteno >  $\beta$ -caroteno > cantaxantina, como puede observarse en la figura 8.

El espectro de absorción de isómeros Z presenta algunas diferencias con respecto al de los correspondientes isómeros todo-E. Por ejemplo, las  $\lambda_{\text{máx}}$  aparecen a longitudes de onda



**FIGURA 8.** Espectros visibles de los carotenoides ζ-caroteno, β-caroteno y cantaxantina en acetona.

2-6 nm menores en el caso de isómeros mono-Z e incluso aproximadamente 10 nm menores en el caso de di-Z. Por otra parte, la nitidez de las bandas de absorción disminuye (menor estructura fina) y aparece una nueva en la región ultravioleta, aproximadamente a 142 nm por debajo de la correspondiente al tercer máximo de absorción en la región visible en hexano. Cuanto más cercano esté el doble enlace Z al centro de la molécula, mayor es la intensidad de esta banda (Britton, 1995 ab; Zechmeister, 1962) (figura 9).

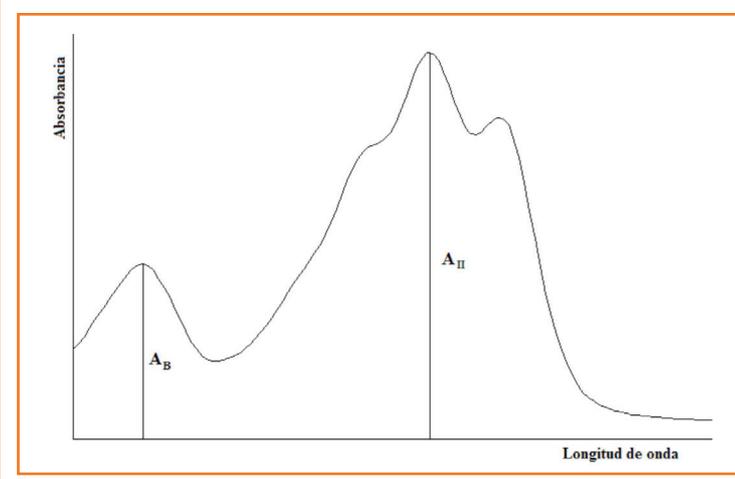
Los carotenoides en disolución, obedecen la ley de Lambert-Beer, de ahí que se puedan cuantificar espectrofotométricamente. Para ello, se relaciona la absorbancia de dicha disolución con una determinada  $\lambda$  con un valor estándar, ya sea el coeficiente de absorción específico ( $A_{1cm}^{1\%}$ ) o el coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ). En relación con

esto se recomienda que las medidas de absorbancia estén dentro del intervalo 0.2-0.8.

$A_{1cm}^{1\%}$  se define como la absorbancia teórica de una disolución de concentración 1% (p/v) en una cubeta de 1 cm de paso de luz, mientras que  $\epsilon$  se define como la absorbancia teórica de una disolución de concentración 1 molar. Ambos coeficientes están relacionados de acuerdo con la siguiente fórmula (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004):

$$\epsilon = (A_{1cm}^{1\%} \times \text{peso molecular})/10 \quad [1]$$

En relación con esto, es importante reparar en el hecho de que, teóricamente, el  $\epsilon$  es característico del cromóforo e independiente del peso molecular del carotenoide. En este sentido, podría considerarse el mismo para distintos carotenoides con idéntico cromóforo, como por ejemplo



**FIGURA 9.** Representación de la intensidad de la banda *cis* del espectro con respecto a la de la banda principal de absorción.

$\beta$ -caroteno y zeaxantina. En el caso del coeficiente de absorción específico, los valores estarían relacionados por sus pesos moleculares (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004):

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} (\text{zeaxantina}) = A_{1\text{cm}}^{1\%} (\beta\text{-caroteno}) \times (536/568) \quad [2]$$

Los valores de los coeficientes de absorción, generalmente  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ , de distintos carotenoides en varios disolventes y las longitudes de onda a las que deben realizarse las medidas de absorbancia se pueden encontrar tabulados en la literatura especializada (Britton, 1995b; Davies, 1976; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001). Debido a que la determinación experimental de dichos valores lleva asociadas ciertas dificultades, no es extraño encontrar algunas discrepancias en las tablas, siendo ésta una fuente importante de errores de cuantificación. Por otra parte, cuando no se ha determinado el  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  para el carotenoide de interés, o bien se quiere determinar el contenido total de carotenoides de un extracto, se suele usar un valor genérico de 2500 (Britton y Young, 1993).

Los coeficientes de absorción de los isómeros *Z* son claramente menores que los de sus isómeros *todo-E*. No obstante, pocos se han calculado experimentalmente (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004).

En definitiva, para calcular la concentración de un determinado carotenoide se puede aplicar la siguiente fórmula (Rodríguez-Amaya, 2001):

$$x = (A \times y \times 10^6) / A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \quad [3]$$

donde *x* es el peso del carotenoide en  $\mu\text{g}$ , *A* la absorbancia medida experimentalmente de la disolución en el disolvente

y a la longitud de onda usados, y el volumen de la disolución en mL y  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  el coeficiente de absorción específico en el disolvente y a la longitud de onda usados para la medida.

## Color

Los carotenoides absorben generalmente luz azul y violeta (aprox. 400-500 nm), de forma que exhiben coloraciones amarillentas, anaranjadas o rojizas. La relación existente entre la estructura química de los carotenoides típicos de la dieta y su color, medido objetivamente y expresado de acuerdo con los parámetros del espacio de color CIELAB, es bien conocida (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007b). Es importante tener en cuenta que el color depende de otros factores además de la estructura química, como por ejemplo la concentración, la agregación de moléculas o la interacción con otras moléculas.

Análiticamente, el color de los carotenoides es de gran ayuda. Así, un cambio de color durante la manipulación de muestras puede indicar que se han producido transformaciones. Asimismo, el color permite monitorear su separación mediante técnicas cromatográficas clásicas, como cromatografía en capa fina o en columna. Por otra parte, la medida instrumental del color se ha propuesto como una herramienta analítica interesante para la rápida cuantificación de carotenoides en diversas fuentes, además de para, obviamente, evaluar objetivamente dicho atributo, que está muy relacionado con la aceptabilidad de los productos (Arias *et al.*, 2000; Humphries, Graham y Mares 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2011; Moyano *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2005; Stinco *et al.*, 2013). Entre las ventajas que ofrecen las medidas instrumentales de color se encuentran la rapidez, la facilidad, la nula o escasa preparación de la muestra necesaria en muchos casos, la versatilidad, la portabilidad y la posibilidad de automatización, entre otras.

Estas medidas son, por lo tanto, interesantes para el control de calidad de los carotenoides en la industria o en el campo (Moyano, Heredia y Meléndez-Martínez, 2010).

## FUNCIONES

Tradicionalmente la importancia atribuida a los carotenoides, al menos en el campo de la alimentación y la nutrición, radicó sobre todo en su papel como colorantes naturales y al hecho de que algunos de ellos pueden convertirse en vitamina A. Sin embargo, son compuestos muy versátiles y de gran importancia en la naturaleza. De hecho, no fueron inventados para dar color, ya que durante una gran parte de la historia de la vida en la Tierra dicha propiedad no podía ser percibida, dado que la visión en color apareció mucho más tarde que los carotenoides y otros pigmentos. Es interesante reparar en el hecho de que, como ya se ha comentado, los carotenoides están presentes en las cianobacterias, uno de los primeros habitantes de la Tierra y en diferentes tejidos de multitud de organismos adaptados a muy distintas condiciones. Si además consideramos que existen más de 700 carotenoides naturales descritos parece sensato pensar que las estructuras y acciones biológicas de los carotenoides han evolucionado a lo largo de la historia de la vida en nuestro planeta.

### Funciones, acciones y asociaciones

De acuerdo con Bendich y Olson (1989) las acciones biológicas de los carotenoides podrían dividirse en funciones, acciones y asociaciones. No obstante, la división en muchos casos es difícil de establecer. Las funciones serían acciones esenciales debidas a ellos, de forma que su ausencia iría acompañada de una disminución de la capacidad fisiológica

del organismo o incluso de su muerte. Por otra parte, las acciones serían respuestas fisiológicas o farmacológicas no esenciales (y que podrían ser beneficiosas o no) debidas a la administración de carotenoides. Por último, las asociaciones serían relaciones entre carotenoides y eventos fisiológicos o médicos con o sin relación causal.

### Funciones de carotenoides intactos y de compuestos derivados

En un reciente libro dedicado a las funciones de los carotenoides (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2008) Britton (2008a) destaca, en relación con la importancia de los carotenoides en la naturaleza, una serie de procesos como: recolección de luz, fotoprotección, visión, protección frente a oxidantes, modulación de las propiedades de las membranas, comunicación entre individuos de la misma especie o de especies diferentes mediante el color y fertilidad y reproducción.

Por otra parte, los carotenoides pueden metabolizarse y originar otros compuestos con importantes acciones biológicas. Ejemplos típicos son retinoides con actividad vitamínica A (como retinol, retinal o ácido retinoico) o compuestos norisoprenoides, los cuales pueden tener gran potencia aromática (como  $\beta$ -damascenona, safranal o  $\beta$ -ionona, entre otros). Otros serían los ácidos trispórico (que estimula la producción de carotenoides en ciertos hongos) y abscísico (hormona de las plantas involucrada en muchos procesos) (Britton, 2008b). Asimismo, hay cada vez más interés en el estudio de metabolitos de carotenoides distintos de retinoides, los cuales podrían ser bioactivos en humanos (Amengual *et al.*, 2011; Lian y Wang, 2008; Linnewiel *et al.*, 2009).

Si bien queda clara la versatilidad de acciones de los carotenoides, no cabe duda de que existen muchas otras por descubrir. A modo de ejemplo, ahora hay mucho interés en las de las estrigolactonas, fitohormonas con importantes acciones biológicas, las cuales derivan de carotenoides (Alder *et al.*, 2012; Ruyter-Spira *et al.*, 2013). Asimismo, se han obtenido claras evidencias de que el licopeno puede proteger de daños causados por el frío en cítricos (Lado *et al.*, 2015).

## Carotenoides en nutrición y salud

Por último, cabe destacar el interés de los carotenoides en nutrición y salud, independientemente de su papel como precursores de vitamina A. En este sentido, los carotenoides (o sus derivados) suscitan un gran interés en relación con su posible papel beneficioso al disminuir el riesgo de padecer enfermedades diversas, como distintos tipos de cáncer, trastornos oculares, enfermedades cardiovasculares, de la piel u óseas, entre otras (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2009; Krinsky, Mayne y Sies, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; Yamaguchi, 2008). Si bien las acciones biológicas de los carotenoides en humanos suelen atribuirse con frecuencia a su papel como antioxidantes, lo cierto es que la demostración de su actividad antioxidante *in vivo* es harto complicada. En

cualquier caso hay que tener en cuenta que dichas acciones podrían deberse también a su actividad prooxidante, a la modulación de rutas de señalización intracelular, a la modulación de las propiedades de las membranas o incluso a su posible papel en el sistema inmune (Hughes 2001; Palozza 2004; 1998; Sharoni *et al.*, 2012; Gruszecki y Strzalka 2005; Mein, Lian y Wang, 2008; Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2009).

La demostración fehaciente del papel de los carotenoides en beneficios para la salud es muy complicada por una serie de razones, como la complejidad del organismo humano, la gran cantidad de compuestos ingeridos en la dieta junto a los carotenoides, las dificultades inherentes a los estudios de intervención o las limitaciones de los distintos tipos de estudios utilizados para evaluar su acciones biológicas, entre otros. En cualquier caso su estructura química, su presencia constante en la dieta desde que la especie humana existe, la presencia consistente de algunos de ellos en plasma y tejidos y estudios epidemiológicos que relacionan dietas ricas en carotenoides con un menor riesgo de padecer algunas enfermedades invitan a pensar que los carotenoides son compuestos importantes en nutrición y salud y, por lo tanto, en el contexto de la alimentación funcional.

## REFERENCIAS

- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., Al Babili, S. 2012. *Science* 335: 1348-1351.
- Amaretti, A., Simone, M., Quartieri, A., Masino, F., Raimondi, S., Leonardi, A., Rossi, M. 2014. *Chemical Engineering Transactions* 38: 217-222.
- Amengual, J., Lobo, G.P., Golczak, M., Li, H., Klimova, T., Hoppel, C.L., Wyss, A., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2011. *FASEB Journal* 25: 948-959.
- Arias, R., Lee, T.C., Logendra, L., Janes, H. 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1697-1702.
- Ben Amotz, A. 1996. *Journal of Phycology* 32: 272-275.
- Bendich, A. y Olson, J.A. 1989. *FASEB Journal* 3: 1927-1932.
- Berzelius, J.J. 1837. *Ann der Pharm* 21: 257-262.
- Bhosale, P. y Bernstein, P.S. 2007. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 458: 121-127.
- Bohm, V., Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 221-226.
- Breithaupt, D.E. y Bamedi, A. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7175-7181.
- Britton, G. 1983. *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Britton, G. 1995a. *FASEB Journal* 9: 1551-1558.
- Britton, G. 1995b. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy*, pp. 13-62. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. 2008a. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 4: Natural Functions*, pp. 189-212. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. 2008b. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 4: Natural Functions*, pp. 309-324. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 2004. *Carotenoids. Handbook*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 2009. *Carotenoids. Volume 5: Nutrition y Health*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. 1992. En G.A.F. Hendry y J.D. Houghton (eds.). *Natural Food Colorants*, pp. 141-82. Glasgow y Londres: Blackie.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2008. *Carotenoids. Volume 4: Natural Functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. y Young, A. 1993. En A. Young y G. Britton (eds.). *Carotenoids in Photosynthesis*, pp. 409-458. Londres: Chapman & Hall.

## REFERENCIAS

- Chasse, G.A., Mak, M.L., Deretey, E., Farkas, I., Torday, L.L., Papp, J.G., Sarma, D.S.R. *et al.*, 2001. *Journal of Molecular Structure: Theochem* 571: 27-37.
- Cheesman, D.F., Lee, W.L., y Zagalsky, P.F. 1967. *Biological Reviews* 42: 131-160.
- Davies, B.H. 1976. En T.W. Goodwin (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, pp. 38-165. Londres: Academic Press.
- Duc, Le H., Fraser, P.D., Tam, N.K.M., Cutting, S.M. 2006. *FEMS Microbiology Letters* 255 (2): 215-224.
- Eugster, C.H. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis*, pp. 1-12. Basilea: Birkhäuser.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Goodwin, T.W. 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids. Volume I. Plants*. Londres: Chapman & Hall.
- Goodwin, T. 1980a. *The Biochemistry of the Carotenoids. Volume II. Animals*. Londres: Chapman & Hall.
- Gruszecki, W.I. y Strzalka, K. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 108-115.
- Hoischen, D., Colmenares, L.U., Liu, J., Simmons, C.J., Britton, G., Liu, R.S.H. 1998. *Bioorganic Chemistry* 26: 365-374.
- Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1617-1622.
- Hu, K-Q., Liu, C., Ernst, H., Krinsky, N.I., Russell, R.M., Wang, X.D. 2006. *Journal of Biological Chemistry* 281: 19327-19338.
- Hughes, D.A. 2001. *Nutrition* 17: 823-827.
- Humphries, J.M., Graham, R.D., Mares, J. 2004. *Journal of Cereal Science* 40: 151-159.
- Isler, O. 1971. *Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- Karrer, P. y Jucker, E. 1948. *Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- Krinsky, N.I., Mayne, S.T., Sies, H. 2004. *Carotenoids in Health and Disease*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. 2005. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
- Lado, J., Rodrigo, M.J., Cronje, P. y Zacarías, L. 2015. *Postharvest Biology y Technology* 100: 176-186.
- Lian, F. y Wang, X.D. 2008. *International Journal of Cancer* 123: 1262-1268.
- Linnewiel, K., Ernst, H., Caris-Veyrat, C., Ben Dor, A., Kampf, A., Salman, H., Danilenko, M., Levy, J. y Sharoni, Y. 2009. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 659-667.

## REFERENCIAS

- Mein, J.R., Lian, F. y Wang, X.D. 2008. *Nutrition Reviews* 66: 667-683.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9369-9373.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Food Chemistry* 104: 169-175.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007a. *Food Chemistry* 101: 1145-1150.
- Meléndez-Martínez, A.J., Gomez-Robledo, L., Melgosa, M., Vicario, I.M. y Heredia, J.J.. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 837-844.
- Meléndez-Martínez, A.J., Paulino, M., Stinco, C.M., Mapelli-Brahm, P. y Wang, X.D. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 12399-12406.
- Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de los Alimentos*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Moore, T. 1930. *Biochemical Journal* 24: 692-702.
- Moran, N.A. y Jarvik, T. 2010. *Science* 328: 624-627.
- Moyano, M.J., Heredia, F.J. y Meléndez-Martínez, A.J. 2010. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 278-291.
- Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2008. *Food Research International* 41: 513-521.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A.J. y Mondello, L. 2013. *Food Chemistry*, 140: 825-836.
- Olmos-Soto, J. y Acosta Ruiz, M. 2012. En J.L. Barredo (ed.). *Methods in Molecular Biology*, pp. 1-12. Totowa: Humana Press.
- Palozza, P. 1998. *Nutrition Reviews* 56: 257-265.
- Palozza, P. 2004. *Current Pharmacogenomics* 2: 35-45.
- Parry, A.D., Babiano, M.J. y Horgan, R. 1990. *Planta* 182: 118-128.
- Pfander, H. 1987. *Key to Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- Pfister, S., Meyer, P., Steck, A. y Pfander, H. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2612-2615.
- Philip, T., Chen, T.S. y Nelson, D.B. 1988. *Journal of Chromatography* 442: 249-265.
- Pott, I., Breithaupt, D.E. y Carle, R. 2003. *Phytochemistry* 64: 825-829.
- Rodriguez-Amaya, D.B. 1997. *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods*. Washington, D.C.: OMNI/USAID.

## REFERENCIAS

- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.
- Ruiz, D., Egea, J. Tomás-Barberán, F.A., y Gil, M.I. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6368-6374.
- Ruyter-Spira, C., Al Babili, S., Van der Krol, S., y Bouwmeester, H. 2013. *Trends in Plant Science* 18: 72-83.
- Schieber, A. y Carle, R. 2005. *Trends in Food Science & Technology* 16: 416-422.
- Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 1A: Isolation y Analysis*, pp. 81-108. Basilea: Birkhäuser.
- Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M. y Levy, J. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 259-269.
- Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A.R. y Sies, H. 1992. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294: 173-177.
- Stinco, C.M., Rodríguez-Pulido, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Gordillo, B., Vicario, I.M., y Meléndez-Martínez, A.J. 2013. *Food Research International* 50: 111-120.
- Strand, A., Kvernberg, K., Karlsen, A.M. y Liaaen-Jensen, S. 2000. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 443-455.
- Takaichi, S. y Mochimaru, M. 2007. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2607-2619.
- Than, A., Bramley, P.M., Davies, B.H., y Rees, A.F. 1972. *Phytochemistry* 11: 3187-3192.
- Tian, B. y Hua, Y. 2010. *Trends in Microbiology* 18: 512-520.
- Tswett, M. 1906. *Ber Deutsch Botan Ges* 24: 384-393.
- Van Calsteren, M.R., Bissonnette, M.C., Ichi, T., Leblanc, J.C.Y., Perreault, D. y Roewer, I. 1997. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1055-1061.
- Wackenroder, H.W.F. 1831. *Geigers Magazin der Pharmazie* 33: 144-172.
- Weedon, B.C.L. y Moss, G.P. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis*, pp. 27-70. Basilea: Birkhäuser.
- Yamaguchi, M. 2008. *Journal of Health Science* 54: 356-369.
- Zechmeister, L. 1962. *Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A y Arylpolyenes*. Vienna: Springer Verlag.

## CAPÍTULO 2

# CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE LOS CAROTENOIDES

Antonio J. Meléndez-Martínez, Paula Mapelli-Brahm,  
Ana Benítez-González, Carla M. Stinco, Enrique Murillo



### INTRODUCCIÓN

El sistema de dobles enlaces conjugados de los carotenoides es el principal responsable de la inestabilidad de estos compuestos y de la mayoría de sus propiedades (Britton, 1995). Es necesario tomar una serie de precauciones para minimizar transformaciones no deseadas (como isomerizaciones y degradaciones) de los mismos durante su manejo en el laboratorio, ya que éstas conducirían a resultados erróneos. A continuación se compila, resume y organiza información proporcionada en diversos textos (Britton, 1991; Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2007; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mercadante, 2007; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995), la cual es importante considerar para el trabajo con carotenoides en el laboratorio. Más información práctica sobre cómo evitar errores analíticos comunes puede encontrarse en una guía de referencia (Rodríguez-Amaya, 2001).

## PRECAUCIONES GENERALES DURANTE EL ANÁLISIS. FACTORES A CONSIDERAR

Algunas de las principales recomendaciones a tener en cuenta para evitar la transformación no deseada de carotenoides durante su manejo son (Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995): 1) llevar a cabo el análisis en el menor tiempo posible e idealmente de forma continua, evitando interrupciones; 2) evitar la exposición directa de las muestras a la luz; para eso se puede mantener el área de trabajo a oscuras o con luz tenue, cubrir las muestras o usar recipientes opacos; 3) evitar calentamientos excesivos; se recomienda, en la medida de lo posible, el uso de disolventes de bajo punto de ebullición y evaporar a temperaturas por debajo de 40 °C; 4) utilizar disolventes de gran pureza, con especial atención a la ausencia de peróxidos y de ácidos; 5) para minimizar oxidaciones se debe desplazar, siempre que sea posible, el oxígeno de los recipientes que contengan carotenoides; esto puede hacerse sustituyendo el aire por nitrógeno o argón o mediante la aplicación de vacío, y 6) si los extractos no se van a analizar inmediatamente, éstos deben guardarse en el congelador, a una temperatura de -20 °C o preferiblemente inferior, al abrigo de la luz y en ausencia de oxígeno.

Es clave asimismo tener en cuenta que los carotenoides son especialmente inestables una vez que se extraen de la matriz donde se encuentran. Por otra parte, para prevenir posibles interferencias en espectrometría de masas (MS), y también en resonancia magnética nuclear (NMR), se desaconseja el uso de materiales plásticos, papel de filtro y homogeneizadores tipo turrax en las etapas pre-cromatográficas.

Se detalla a continuación cómo afectan diversos factores y sustancias químicas a los carotenoides, así como precauciones generales para evitar transformaciones indeseadas (Britton,

1991; Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

### Oxidación

El oxígeno, sobre todo en combinación con la luz y el calor, es un factor muy destructivo. Incluso en muestras congeladas la presencia de trazas de oxígeno y otros agentes oxidantes pueden causar la degradación de los carotenoides. Por eso es importante trabajar de la forma más rápida y continua posible, para que los extractos estén expuestos al aire el menor tiempo posible. Por otra parte, mantener los disolventes de extracción en frío puede ser una manera eficaz de reducir pérdidas por oxidación. Si los extractos no van a analizarse de inmediato, deben almacenarse en recipientes bien cerrados y el oxígeno debe ser desplazado con atmósferas de argón o nitrógeno. Otra estrategia para reducir pérdidas por oxidación consiste en el uso de antioxidantes, como butilhidroxitolueno (BHT) o pirogalol. Éstos pueden añadirse durante la desintegración de la muestra que contiene los carotenoides, en los disolventes de extracción, durante la saponificación e incluso en los componentes de la fase móvil cromatográfica.

### Luz

Además de acelerar las reacciones de oxidación, la luz puede favorecer la isomerización geométrica (*cis-trans*) de los carotenoides e incluso su fotodestrucción. El área de trabajo debe estar protegida de la luz directa del sol, de forma que la iluminación debe ser tenue. Los recipientes que contengan carotenoides se deben proteger de la luz cubriéndolos de manera apropiada, por ejemplo con papel oscuro o de aluminio o bien emplear dispositivos adecuados.

La rápida manipulación de las muestras y la protección contra la luz son especialmente importantes en los extractos que contengan clorofilas (por ejemplo, extractos de tejidos fotosintéticos). Las clorofilas son fotosensibilizadores y pueden acelerar las transformaciones de los carotenoides presentes originalmente en la matriz. Para proteger los carotenoides de la luz de las lámparas fluorescentes se pueden usar fundas de policarbonato. Estos protectores absorben la radiación de longitudes de onda de 375 a 390 nm e incluso más cortas. En cualquier caso, no deben excluirse las precauciones indicadas anteriormente.

## Calor

Los carotenoides son compuestos termolábiles; el calor favorece su oxidación y las isomerizaciones *cis-trans*. Asimismo, a temperaturas muy elevadas, los carotenoides pueden fragmentarse. Se aconseja trabajar en ambientes frescos y sólo calentar la muestra cuando sea imprescindible.

En países muy calurosos es recomendable trabajar en las zonas más frescas del laboratorio y, en su caso, usar el aire acondicionado o un ventilador para mantener la temperatura ambiente en torno a los 25 °C. Para concentrar extractos de carotenoides en rotavapores u otros aparatos la temperatura debe mantenerse siempre por debajo de 40 °C.

## Ácidos

Los ácidos pueden favorecer la descomposición, deshidratación e isomerización de los carotenoides. Para evitar estas transformaciones se recomienda evitar el trabajo con ácidos fuertes cerca de las áreas donde se manipulen los carotenoides. Además, los disolventes a usar no deben contener ácidos. Las trazas de HCl en el cloroformo son difíciles de eliminar por lo que es recomendable sustituir este disolvente en la medida de lo posible por diclorometano (DCM).

Debe tenerse especial cuidado con los carotenoides

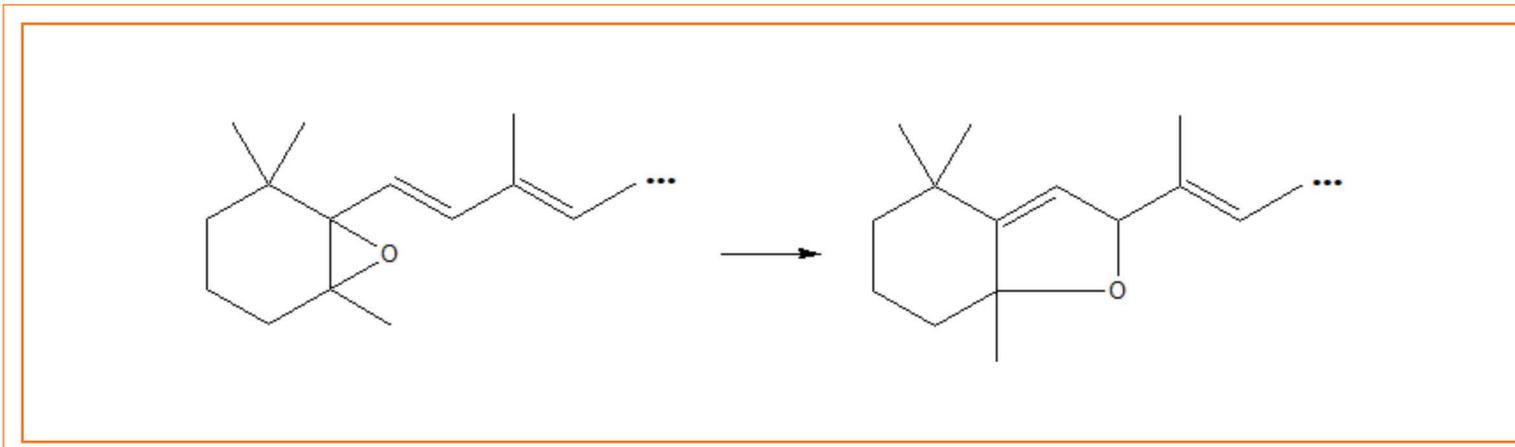


FIGURA 1. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

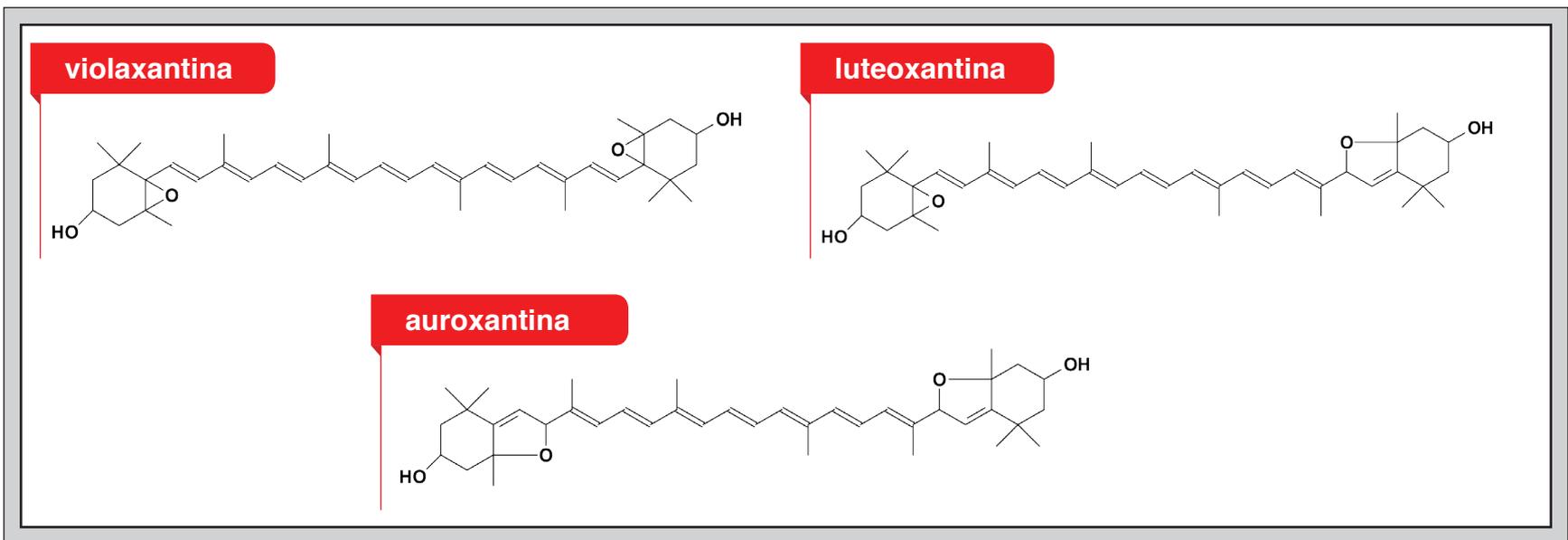


FIGURA 2. Estructuras químicas de la violaxantina (carotenoide con grupos 5,6-epóxidos) y sus derivados con grupos 5,8-furanoides (luteoxantina y auroxantina).

5,6-epóxidos (como violaxantina y neoxantina, presentes en tejidos fotosintéticos), ya que se isomerizan a sus isómeros 5,8-furanoides (luteoxantina y auroxantina en el caso de violaxantina y neocromo en el caso de neoxantina) incluso en presencia de trazas de ácidos (figuras 1 y 2).

Cuando se rompe la integridad celular de alimentos que contienen carotenoides 5,6-epóxido (por ejemplo, durante homogenizaciones, exprimidos o extracciones) debe procederse al análisis rápido de la muestra para evitar el contacto de dichos carotenoides con los ácidos liberados por el propio alimento. Además, durante la extracción, se pueden añadir bases débiles como  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$  o  $\text{CaCO}_3$  (1 g/10 g muestra) para neutralizar los ácidos. La formación de carotenoides 5,8-furanoides a partir de 5,6-epóxidos se

produce incluso en muestras congeladas, como por ejemplo en el caso de los zumos o jugos de naranja (Meléndez-Martínez *et al.*, 2008).

## Bases

Es importante tener en cuenta que, a pesar de que muchos carotenoides son bastante estables en medio básico (Kimura, Rodríguez-Amaya y Godoy, 1990; Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988), la saponificación puede generar artefactos y promover la degradación de algunos carotenoides (Deli, Matus y Szabolcs, 1992; Ittah, Kanner y Granit, 1993; Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998; Müller, 1997; Oliver, Palou y Pons, 1998). Los carotenoides con grupos hidroxilos alílicos y grupos carbonilos, como la astaxantina, son muy propensos

a la oxidación en presencia de álcali y aire. Schiedt, Bischof y Glinz (1993) desarrollaron un método para llevar a cabo la saponificación de muestras con estos carotenoides evitando transformaciones indeseadas de los mismos. Por otra parte, los carotenoides carbonílicos pueden sufrir condensación aldólica en medio básico en presencia de acetona (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2007; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995) por lo que se debe proceder a la eliminación completa de la acetona antes de llevar a cabo la saponificación si la muestra contiene estos carotenoides.

## MUESTREO

Información detallada sobre cómo realizar un buen muestreo de alimentos puede encontrarse en otros textos (Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004). Es muy importante anotar, siempre que sea posible, toda la información de interés de la muestra, como datos sobre variedades, estado de maduración, estación, origen geográfico, parte analizada, métodos de procesado industrial, métodos de procesado en el laboratorio, método de cocinado, marca o lote (Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004). Una metodología general es la descrita por Mercadante, que aconseja la toma al azar de unos 2 kg de producto fresco o 3-5 envases de producto procesado del mismo lote (Mercadante, 2007).

Una vez que la muestra se encuentra en el laboratorio, las partes no comestibles suelen eliminarse, a no ser que su análisis sea interesante para comparaciones u otros propósitos. La muestra que generalmente llega al laboratorio es muy grande, por lo que debe ser reducida en tamaño y homogeneizada con cuidado de mantener siempre la representatividad. Alimentos vegetales pequeños pueden homogeneizarse fácilmente al licuarlos, mientras que los

de mayor tamaño deben cortarse en cuartos longitudinales siguiendo sus ejes de simetría. Posteriormente se seleccionan, mezclan y homogeneizan los trozos opuestos. Los vegetales foliáceos normalmente deben ser troceados de forma previa a su homogeneización (Mercadante y Rodríguez-Amaya, 1991). En el caso de que la muestra se vaya a estudiar tanto en crudo como una vez sometida a algún proceso de cocinado, debe dividirse en dos fracciones homogéneas para que las partes estudiada en ambos casos sean representativas y comparables (Granado *et al.*, 1992). En el caso de muestras comerciales que hayan sido sometidas a procesado, se pueden tomar muestras al azar de un mismo lote, que luego se mezclan y homogeneizan antes del análisis (Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya *et al.*, 2008).

En el caso de que las muestras de laboratorio no se vayan a extraer de inmediato es necesario almacenarlas tomando una serie de precauciones. Se recomienda liofilizar y luego almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o incluso mejor a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es importante tomar en cuenta que en el caso de tener que almacenar las muestras, siempre que sea posible, su homogeneización debe posponerse hasta que termine el periodo de almacenamiento para evitar transformaciones no deseadas. El proceso de rotura de los tejidos puede liberar enzimas (como las lipoxigenasas y peroxidasas, que favorecen la oxidación) y ácidos presentes en las muestras. Asimismo, durante el descongelado pueden producirse reacciones de degradación. Para reducir las se recomienda llevar a cabo la descongelación a temperaturas de refrigeración (Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

## PASOS PRECROMATOGRÁFICOS

### Extracción

Uno de los mayores problemas asociados con el proceso de extracción en el análisis cuantitativo de carotenoides es que no siempre es fácil conseguir su extracción completa. Por otra parte, debido a la gran diversidad de polaridades que presentan los carotenoides, no existe un método estándar para la extracción de los mismos (Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001).

### Precauciones generales durante la extracción

Muchos protocolos de extracción de carotenoides constan con frecuencia de tres pasos. El primero suele ser la trituración o rotura de las muestras; con eso se desintegran los tejidos de las mismas y se facilita la liberación de los carotenoides durante la extracción. El segundo, la homogeneización en presencia del disolvente de extracción, que se puede llevar a cabo de distintas formas; por ejemplo, se pueden usar homogeneizadores, agitadores mecánicos o mortero y pistilo. En el caso de que se usen molinos para obtener tamaños de partícula muy pequeños (que facilitan la extracción), debe controlarse que la temperatura no aumente mucho. Por último, se lleva a cabo la extracción. En muchos casos los procesos de rotura de los tejidos, homogeneización y extracción suelen hacerse de forma simultánea.

Durante la extracción se plantea una situación de compromiso, ya que el proceso debe realizarse en el menor tiempo posible para evitar transformaciones indeseadas pero, a la vez, el disolvente y los carotenoides deben estar en contacto el tiempo suficiente para asegurar la completa extracción de éstos. Para optimizar el tiempo de extracción es importante determinar en

qué momento se ha alcanzado la extracción completa de todos los carotenoides de interés de la muestra. Para ello, en ensayos previos se pueden analizar por separado las fracciones obtenidas durante las distintas tandas de extracción, para determinar en cuál de ellas se ha dejado de extraer carotenoides. Las hojas y otras matrices de difícil penetración suelen requerir maceraciones durante 15 minutos como mínimo para suavizar las paredes celulares. Para favorecer la rotura de los tejidos de estas matrices se puede añadir celita. En el caso de frutas o verduras blandas y sin hojas se pueden usar homogeneizadores, que permiten la disgregación y mezcla de manera rápida y eficiente (Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995). Para mejorar la extracción de algunas muestras, como alimentos extruidos o aceites, se puede llevar a cabo una digestión enzimática previa (Lietz y Henry, 1997; Ríos y Mercadante, 2004; Biehler *et al.*, 2012).

Para prevenir las oxidaciones, especialmente cuando no se pueda trabajar bajo atmósfera inerte o cuando el análisis se alarga, se suelen añadir al medio de extracción antioxidantes como pirogalol, ascorbato de sodio, BHT o palmitato de ascorbilo (Müller, 1997; Oliver y Palou, 2000; Tee y Lim, 1991). Además, se pueden añadir bases débiles como carbonato de calcio, carbonato de magnesio o bicarbonato de sodio (1 g/10 g de muestra) al medio de extracción para neutralizar los ácidos liberados (Hart y Scott, 1995), como ya se ha comentado.

Otra medida preventiva para evitar la degradación de los carotenoides es trabajar en frío, añadiendo hielo seco o trabajando con disolventes enfriados previamente.

Los esteroides que suelen extraerse junto con los carotenoides pueden eliminarse al mantener el extracto disuelto en éter de

petróleo (PE) a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y bajo atmosfera inerte durante la noche. Cuando han precipitado pueden eliminarse por centrifugación o filtración (Britton y Young, 1993).

### Elección de los disolventes de extracción

Para tratar de conseguir la extracción completa de los carotenoides y evitar transformaciones no deseadas de los mismos es indispensable elegir correctamente el disolvente a usar durante la extracción. En la tabla 1 se muestran algunas propiedades y características de disolventes comúnmente usados en la extracción de carotenoides.

Para la extracción de carotenoides de muestras que contienen mucha agua, es decir, la situación en la mayoría de los alimentos, se deben usar en primer lugar disolventes orgánicos miscibles en agua como el THF, la acetona, el metanol o el etanol para asegurar la penetración del disolvente en la muestra. Las muestras secas o liofilizadas pueden extraerse con disolventes inmiscibles en agua, pero suele ser más eficiente la rehidratación previa (con tiempos de rehidratación variables) y luego continuar la extracción con disolventes miscibles en agua (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001). Los disolventes desnaturalizan las proteínas, liberando los carotenoides que puedan encontrarse ligados a ellas. Los carotenoides se transfieren después a disolventes orgánicos más apolares (hexano, éter de petróleo o éter dietílico). La transferencia se facilita por la adición de agua o solución acuosa de NaCl (6-10%). Es importante evitar la formación de emulsiones, lo que afectaría negativamente la extracción de los carotenoides; para ello, es recomendable que la proporción agua-disolvente polar-disolvente más apolar, sea aproximadamente 1:1:1. Por último, el disolvente polar pasa a la fase acuosa y los carotenoides pasan al disolvente más apolar. Al final se concentra el

extracto de carotenoides. Un aspecto a tener en cuenta para elegir el disolvente final al que transferimos los carotenoides es su densidad relativa al agua, ya que dependiendo de la metodología de extracción elegida (por ejemplo, la clásica o microextracciones) podría convenir que el extracto de carotenoides quedara por encima o por debajo de la fase acuosa (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014).

Los carotenoides presentan polaridades muy diversas, por lo que no todos serán igual de solubles en un disolvente determinado. En general los carotenos como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno, son más solubles en disolventes poco polares o no polares como el hexano o el éter de petróleo (EP). Las xantofilas lo son en disolventes más polares como el etanol, el metanol y la acetona. Para conseguir una buena extracción de todos los carotenoides presentes en una muestra está muy extendido el uso de mezclas de disolventes. Por ejemplo, el hexano y el EP suelen mezclarse con metanol, etanol o acetona. El diclorometano (DCM) es un excelente disolvente de carotenoides que también puede usarse en estas combinaciones. Así, mezclas comunes son EP:acetona, hexano:acetona, hexano:etanol, hexano:acetona:etanol, DCM:metanol, tetrahidrofurano (THF):metanol. Antes de usar una determinada mezcla hay que asegurarse de que los disolventes sean miscibles entre sí y compatibles con el posterior sistema de análisis, generalmente cromatográfico (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya, 2001).

Existen ciertos carotenoides hidrofílicos, como la crocetina, que se encuentra en los estigmas de *Crocus sativus* y en los frutos de *Gardenia jasminoides*. Para su extracción se requiere el uso de disolventes o mezclas tales como agua, metanol, etanol, etanol:agua (1:1) o metanol:acetona (Pfister *et al.*, 1996).

**TABLA 1.** Propiedades de disolventes comunes usados en la extracción de carotenoides

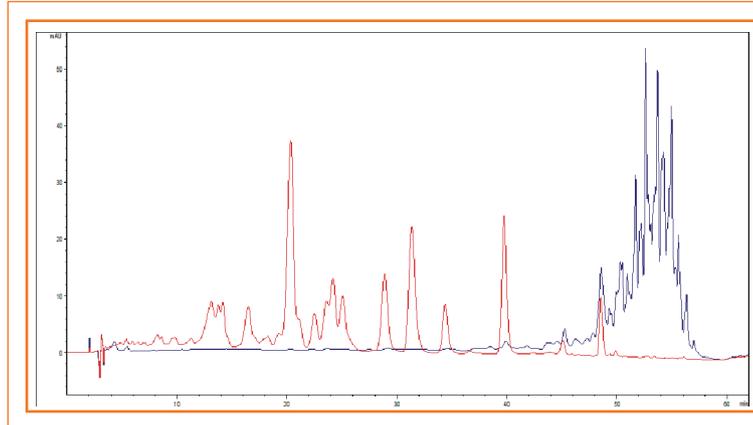
Disolvente	Polaridad	PE (°C)	Ventajas	Desventajas
AC	Polar	56	Penetra bien en matrices alimentarias. Facilita partición a un disolvente apolar. Barato. Disuelve muy bien carotenos y xantofilas.	
THF	Polaridad media	66	Disuelve muy bien carotenos y xantofilas.	Acumula peróxidos.
ED	Poco polar	35	Disuelve muy bien carotenos y xantofilas.	Acumula peróxidos. Riesgo de incendio.
DCM	Polar	40	Fácil evaporación.	Riesgo de incendio.
HX	No polar	69	Buen disolvente para carotenos.	Neurotóxico. No muy apropiado para alimentos ricos en xantofilas (hojas).
BC	No polar	80		Cancerígeno.
ME	Polar	65	Penetra muy bien en las matrices alimentarias.	
ET	Polar	79	Penetra muy bien en las matrices alimentarias. Poco riesgo para la salud.	
AE	Polaridad media	77		
CL	Poco polar	61	Disuelve muy bien el licopeno.	Posibles trazas de ácidos y etanol. Neurotóxico.
EP	No polar	35-60	Buen disolvente para carotenos. Equivalente al hexano.	
TL	No polar	111		

**Fuentes:** Britton (1991), Craft y Soares (1992), Royal Society of Chemistry (2014). AC: acetona; THF: tetrahidrofurano; ED: éter dietílico; DCM: diclorometano; HX: hexano; BC: benceno; ME: metanol; ET: etanol; AE: acetato de etilo; CL: cloroformo; EP: éter de petróleo; TL: tolueno

Ciertos disolventes pueden acumular trazas de peróxidos, como el éter dietílico (ED) y el THF, y ácidos que promueven la degradación de los carotenoides, por eso se recomienda el uso de disolventes de alta pureza o la purificación de aquellos de menor calidad. Para eliminar las trazas de peróxido se puede llevar a cabo la destilación del disolvente sobre polvo de hierro reducido o hidruro de calcio. También es importante tener en cuenta que, aunque algunos disolventes se suministran con BHT como estabilizante, tienen un tiempo límite para usarse (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

La elección de disolventes de puntos de ebullición bajos es una buena opción para acelerar la concentración de los extractos y evitar calentamientos excesivos. Disolventes de bajo punto de ebullición son, por ejemplo, el DCM (40 °C aproximadamente) o el ED (35 °C aproximadamente). Entre las fracciones de EP se elegirán aquellas con menores puntos de ebullición (35-60 °C). Para la evaporación de los últimos restos de disolvente o extractos de pequeño volumen se puede usar una corriente de gas inerte (nitrógeno o argón) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Rodríguez-Amaya, 2001; Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

Otro aspecto a considerar es la toxicidad del disolvente. Siempre que sea posible se escogerán los menos nocivos para la salud. Así, hexano, benceno y cloroformo pueden ser sustituidos por EP, tolueno y DCM respectivamente (Britton y Young, 1993; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Rodríguez-Amaya, 2001). Independientemente del disolvente elegido, todas las operaciones de extracción deben llevarse a cabo en una campana de extracción con las medidas de seguridad adecuadas.



**FIGURA 3.** Cromatogramas a 450 nm correspondientes a un extracto de jugo de naranja antes (azul) y después de saponificar (rojo).

### Saponificación

Muchos alimentos, sobre todo las frutas, contienen xantofilas esterificadas con ácidos grasos. Cada una podría estar esterificada con uno o más ácidos grasos de forma que el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de esta mezcla de compuestos no siempre es fácil de interpretar, al aparecer muchos picos cromatográficos escasamente resueltos (figura 3). En la figura 3, correspondiente a cromatogramas de extractos de jugo de naranja se observa que, en el caso del extracto no saponificado, aparecen muchos picos que eluyen muy tarde y están poco separados. La inmensa mayoría de dichos picos corresponden a distintos ésteres de las xantofilas presentes en el producto. Al saponificar, el cromatograma se simplifica mucho, aunque se pierde una información muy valiosa del estado nativo de los carotenoides en la muestra. Así, antes de saponificar, los  $n$  ésteres de una misma xantofila darían lugar a  $n$  picos cromatográficos, mientras que tras la saponificación sólo darían lugar a uno.

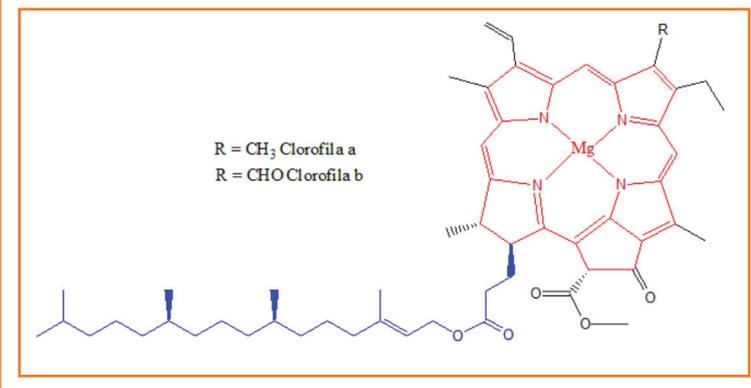


FIGURA 4. Estructuras de las clorofilas a y b.

Por otra parte los lípidos presentes en algunas muestras pueden modificar los tiempos de retención de los carotenoides y acortar la vida útil de la columna cromatográfica. Estos inconvenientes pueden resolverse si se lleva a cabo una saponificación previa para hidrolizar los ésteres o eliminar los lípidos y clorofilas (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001). Las clorofilas presentes en vegetales y frutas se extraen junto con los carotenoides, por su similar solubilidad en los disolventes de extracción. En la estructura de las clorofilas (figura 4) se encuentra esterificado el fitol, un alcohol de 20 carbonos que las hace solubles en disolventes no polares. Cuando se elimina el grupo fitol, por ejemplo por hidrólisis alcalina, las clorofilas se hacen más hidrofílicas y pasan a la fase acuosa, separándose de los carotenoides (Mínguez-Mosquera, 1997).

Las soluciones de hidróxido de sodio o de potasio (típicamente al 5-10%) en metanol o etanol son las más utilizadas para saponificar. Cuando los carotenoides son poco solubles en alcohol o el extracto es alto en grasa, es recomendable utilizar un co-disolvente, como éter dietílico, diclorometano o THF.

Sin embargo la saponificación (hidrólisis alcalina) también presenta ciertos inconvenientes. Así, la reacción aumenta el tiempo total de análisis y aumenta la posibilidad de que se produzcan artefactos y degradaciones. Por lo tanto, debe incluirse en el análisis sólo cuando sea esencial. Por ejemplo, no es necesaria en muestras como tomates, zanahorias u hojas verdes, ya que los carotenoides en ellas están esencialmente libres, es decir, no esterificados (Mercadante y Rodríguez-Amaya, 1989; Rodríguez-Amaya y Tavares, 1992). En el caso de los tejidos fotosintéticos, las clorofilas que se extraen con los carotenoides pueden separarse fácilmente por cromatografía líquida. Aunque los carotenoides provitamínicos (provitamina A) son bastante estables a la saponificación, los niveles de otros, como luteína, violaxantina o neoxantina, pueden reducirse considerablemente durante la reacción de saponificación y en los lavados posteriores (Khachik, Beecher y Whitaker, 1986; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001; Rodríguez-Amaya *et al.*, 1988). Asimismo, como ya se ha comentado, otros carotenoides pueden modificarse estructuralmente.

Un aspecto muy importante desde un punto de vista analítico, y al que a menudo se le presta poca atención, es la recuperación de carotenoides después de la saponificación. Esta etapa es crucial, de hecho parte de las pérdidas atribuidas a la saponificación podrían deberse a una incorrecta recuperación de carotenoides tras la reacción. En esta etapa es recomendable seleccionar el disolvente no polar con más afinidad por los carotenoides que resultan de la saponificación y evitar la formación de emulsiones, difíciles de romper. Cuando la muestra contiene principalmente carotenos, se logran buenas recuperaciones al añadir hexano o éter de petróleo, o bien una mezcla éter dietílico:hexano (1:1). Sin embargo, cuando el extracto contiene niveles altos de carotenoides con

dos o más grupos hidroxilos, es recomendable extraer con éter dietílico. La fase acuosa se debe re-extraer hasta que resulte incolora, a menos que el color se deba a pigmentos no lipídicos (generalmente compuestos fenólicos). En general una extracción adicional debe ser suficiente. La formación de emulsiones se puede evitar eliminando el NaOH o KOH de la saponificación por lavados con disoluciones acuosas de NaCl al 5-8% evitando en todo momento la agitación vigorosa.

Cuanto mayores sean la concentración de la solución alcalina, la temperatura usada y el tiempo de saponificación, mayor será la degradación de los carotenoides (Ittah, Kanner y Granit, 1993; Kimura, Rodríguez-Amaya y Godoy, 1990; Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998; Oliver, Palou y Pons, 1998). Como se puede deducir de lo ya expuesto, se pueden reducir pérdidas por oxidación al usar antioxidantes y una atmósfera inerte durante la reacción. Asimismo es importante ajustar bien la concentración alcalina y el tiempo de reacción para asegurar una saponificación satisfactoria de la muestra de interés.

Por otra parte, en el caso de muestras con alta cantidad de lípidos, como aceites, éstos pueden eliminarse sin riesgo de degradación de los carotenoides usando lipasas no específicas (Lietz y Henry, 1997). En los casos en los que no se vaya a saponificar la muestra y se lleve a cabo un análisis por espectrometría de masas (MS) podría optarse por purificar previamente el extracto para eliminar ácidos grasos y otros lípidos, que pueden producir ruido de fondo. Esto puede hacerse mediante cromatografía en capa fina en sílica gel (Breithaupt, Wirt y Bamedi, 2002). Si se requieren extractos más puros pueden usarse suspensiones de enzimas lipolíticas (Mercadante, 2007).

En cualquier caso, cada vez es más común el análisis de

extractos de carotenoides esterificados, para lo que existen muchas metodologías descritas para distintas fuentes (Breithaupt y Schwack, 2000; Breithaupt, Wirt y Bamedi, 2002; Delgado-Pelayo y Hornero-Méndez, 2012; Giuffrida *et al.*, 2006; Murillo *et al.*, 2013).

## Ejemplo de metodología clásica de extracción y saponificación

A continuación se detalla la metodología seguida en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Panamá, que se basa esencialmente en la recomendada en textos clásicos (Rodríguez-Amaya, 2001), con ligeras modificaciones.

En este laboratorio se analizan los carotenoides de productos vegetales frescos. En este sentido es importante tener en cuenta que, en algunos casos, los carotenoides de muestras mantenidas aun a  $-20^{\circ}\text{C}$  pueden sufrir modificaciones, probablemente por la actividad de enzimas como lipooxigenasas o peroxidases que actúan a bajas actividades de agua. Esto es muy evidente en alimentos como el pibá (*Bactris gasipaes*). Además, hay que considerar que como consecuencia de la descongelación se producen pérdidas de compartimentación celular, con lo que los carotenoides entran en contacto con ácidos o enzimas que los pueden modificar.

Una pregunta común de las personas que se inician en el estudio de los carotenoides es ¿qué cantidad de muestra debo utilizar? La cantidad depende del contenido de carotenoides del alimento y del uso futuro del extracto. Las muestras de productos con alto contenido de carotenoides pueden ser más pequeñas que las de bajo contenido. Por ejemplo, para

la identificación y cuantificación de los carotenoides del plátano (*Musa paradisiaca*), que posee un bajo contenido de carotenoides (del orden de 10 µg/g), utilizamos 5 g. En el caso del mamey (*Pouteria sapota*), con un alto contenido de carotenoides (120 µg/g), utilizamos entre 1 y 2 g.

Por otra parte, para preparar extractos para aislar carotenoides puros e identificarlos por pruebas cualitativas, espectro UV-visible y espectrometría molecular (EM), utilizamos entre 20 y 150 g. De nuevo, la cantidad de muestra depende del contenido de carotenoides. Cuando se pretende aislar carotenoides para determinar su estructura por RMN, se suelen necesitar entre 1 y 2 mg del carotenoide de interés. En estos casos, si se trata de un carotenoide minoritario se podría requerir preparar extractos de varios kilos de muestra.

De manera general, se parte de unos 100 g del alimento, el cual se corta en trozos muy pequeños. Entre 5 y 10 g representativos de la muestra original se mezclan con 1 g de bicarbonato de sodio (para neutralizar ácidos) en un mortero de porcelana. Se adicionan 25 mL de acetona, se mezcla triturando para extraer los pigmentos y se filtra al vacío. El residuo se extrae con acetona varias veces, hasta no obtener más color. En general son necesarias de tres a cuatro extracciones. Cuando los alimentos poseen alto contenido de azúcar, se recomienda realizar una primera extracción con metanol o etanol y luego continuar con las extracciones con acetona.

El extracto resultante de mezclar los filtrados de acetona se concentra al vacío hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 25 mL. El concentrado se pasa a un embudo de separación y se añade un volumen de éter dietílico:hexano (1:1) seguido del mismo volumen de disolución acuosa de

NaCl al 5%. A continuación todo se mezcla suavemente por inversión (no por agitación vigorosa) para evitar la formación de una emulsión. La mezcla se deja reposar hasta la clara separación de dos fases. Los carotenoides se encuentran en la fase orgánica superior. Si la fase inferior tiene una coloración amarilla, se re-extrae con un volumen de éter dietílico y se combinan finalmente las fases orgánicas coloreadas. Para eliminar trazas de agua, se añaden 5 g de sulfato de sodio anhidro, se agita y se deja reposar una hora, luego se filtra o decanta. Los carotenoides retenidos en el sulfato de sodio se recuperan adicionando pequeñas cantidades de éter dietílico.

En caso de que sea necesaria la saponificación, el disolvente del extracto orgánico se evapora a temperaturas no mayores de 40 °C. El extracto seco se disuelve en 20 mL de éter dietílico y 20 mL de KOH o NaOH en metanol al 5%. La disolución alcalina se puede preparar por dilución 1:9 de una disolución acuosa de KOH o NaOH al 50%. La reacción se mantiene típicamente durante dos horas al abrigo de la luz, si bien se recomienda ajustar los tiempos de la reacción dependiendo de la muestra. Posteriormente la mezcla se pasa a un embudo de separación y, dependiendo de la polaridad de los carotenoides, se añaden 20 mL de éter dietílico:éter de petróleo (1:1) o de éter dietílico (si el contenido en xantofilas es alto) y 20 mL de metanol, se mezcla y se adicionan 40 mL de disolución acuosa de NaCl al 5%. Todo se mezcla suavemente por inversión y se deja reposar hasta la separación clara de dos fases. Los carotenoides se encontrarán en la fase superior. La fase inferior se descarta si es totalmente incolora, de lo contrario debería hacerse una extracción para recuperar carotenoides que pudieran quedar en ella. La fase superior se lava varias veces con NaCl al 5% hasta eliminar todo el KOH residual. Para confirmar este extremo se puede utilizar papel tornasol. El agua que pudiera quedar en el extracto orgánico

se elimina como se indicó para la extracción, usando sulfato de sodio.

## Ejemplo de metodología de microextracción y saponificación

A continuación se detalla una metodología comúnmente utilizada en el Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos de la Universidad de Sevilla (Stinco *et al.*, 2014). Más información sobre métodos de microextracción puede encontrarse en otros textos (Fraser *et al.*, 2000; Meléndez-Martínez, Fraser y Bramley 2010; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014). Estos métodos de microextracción se pueden realizar en tubos eppendorf de 1.5 o 2 mL, por lo que se pueden extraer varias muestras a la vez. No obstante, para ciertas aplicaciones podrían también escalarse, de forma que se puedan realizar en otros recipientes de mayor volumen, como tubos de 15 mL.

Se debe partir de una cantidad de materia fresca que sea representativa de la muestra a estudiar. La muestra de laboratorio se prepara siguiendo los procedimientos ya recomendados. Por último se liofiliza. Se recomienda homogeneizar el material liofilizado antes de realizar la extracción, para minimizar pérdidas por pérdida de compartimentación celular y otras causas relacionadas con la homogeneización. Ésta debe realizarse de forma correcta ya que es importante mantener la representatividad. Cuanto menor sea el tamaño de partícula alcanzado, más homogéneo será el material y más fácil será la extracción. La cantidad de muestra a usar puede oscilar ampliamente, por ejemplo de 5 a 100 mg, ya que dependerá de la coloración de la fuente. Por ejemplo 5 o 10 mg son suficientes para muestras como tomates o zanahorias, entre otras.

Para extraer se pesan aproximadamente 10 mg de material liofilizado en forma de polvo en un tubo eppendorf. A continuación se añade 1 mL de agua para rehidratar la muestra y se agita en vortex durante 30-60 segundos. La muestra se deja rehidratar varios minutos. Finalmente el eppendorf se centrifuga durante tres minutos a  $18.000 \times g$  y se retira el agua. A continuación se añade 1 mL de la mezcla de extracción (hexano/acetona, 1:1 v/v) a la muestra rehidratada y se agita en vortex durante 30-60 segundos. Para facilitar la extracción se puede optar por introducir los eppendorfs con las diferentes muestras que se estén extrayendo en un baño de ultrasonidos durante varios minutos. Es importante comprobar de antemano que durante dicho tiempo la temperatura del extracto no supere  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y que no se producen degradaciones por otros motivos. A continuación se centrifuga a  $18.000 \times g$  durante tres minutos y se recupera la fase coloreada, que se transfiere a un nuevo eppendorf rotulado convenientemente para identificar la muestra en cuestión. Después se lleva a cabo una nueva extracción, añadiendo en este caso  $500\text{ }\mu\text{L}$  de la mezcla de extracción (hexano/acetona, 1:1 v/v). Tras agitar, sonicar y centrifugar, se retira la fase coloreada y se mezcla con la que se obtuvo tras la primera extracción. Las extracciones se repiten hasta que no se extraiga más color. Dos o tres extracciones deben ser suficientes. Las fracciones coloreadas reunidas se concentran hasta sequedad. Si el extracto no se va a analizar por HPLC inmediatamente debe conservarse seco y en atmósfera inerte a una temperatura de al menos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para el análisis por HPLC, el extracto se re-disuelve en 50 o  $100\text{ }\mu\text{L}$  de un disolvente apropiado (como acetona, acetato de etilo o fase móvil). Este extracto se centrifuga a alta velocidad (por ejemplo  $18.000 \times g$  durante dos minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para precipitar el material que pudiera estar en suspensión y que podría bloquear los capilares del aparato cromatográfico. El sobrenadante se recupera con cuidado.

Alternativamente, el extracto re-disuelto puede filtrarse, por ejemplo con filtros de jeringa de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Debido a los pequeños volúmenes que se manejan es necesario usar insertos de vidrio adecuados para el vial de HPLC apropiado para nuestro aparato cromatográfico. Asimismo es muy importante evitar evaporaciones, ya que la muestra podría concentrarse y se producirían importantes errores de cuantificación. El extracto re-disuelto se introduce en un inserto y un volumen apropiado se inyecta en el equipo de cromatografía. Los volúmenes usados para re-disolver el extracto seco y para inyectar deben determinarse de forma que sea posible detectar los compuestos de interés. En la figura 5 se muestran un vial con una muestra liofilizada y pulverizada de un vegetal foliáceo, un extracto seco de carotenoides y clorofilas del mismo, así como un vial y un inserto para inyección en el equipo cromatográfico.

En el caso de que sea necesario saponificar, se puede proceder de la siguiente forma. El extracto coloreado seco resultante de las sucesivas extracciones se re-disuelve en 500  $\mu\text{L}$  de diclorometano. A continuación se añade potasa al 5-30% en metanol, desplazando el aire del vial con una atmósfera inerte. La reacción se mantiene a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Es conveniente hacer pruebas previamente para determinar el tiempo necesario para conseguir la hidrólisis de los ésteres de carotenoides. Es asimismo importante asegurarse de que durante la saponificación no se produzca la separación de las fases. A continuación se añade una disolución acuosa de NaCl al 5% y se mezcla todo cuidadosamente invirtiendo el vial dos o tres veces. No se recomienda agitar en vórtex ni agitar vigorosamente, puesto que podría formarse una emulsión y podrían perderse carotenoides en lavados posteriores. La mezcla se centrifuga (18.000 x g durante dos minutos a 4 °C) y la fase acuosa se



**FIGURA 5.** Muestra liofilizada de vegetal foliáceo, extracto seco sin saponificar y vial e inserto usados para la inyección en el equipo cromatográfico.

elimina. Los lavados con la disolución de NaCl se repiten hasta eliminar toda la potasa, de forma que finalmente los lavados sean neutros. Para determinar el número de lavados necesarios puede usarse papel indicador. Por último, la fase coloreada se concentra a sequedad y se procede para su almacenamiento o para su análisis cromatográfico como se indicó antes.

La precisión del método propuesto se evaluó determinando su repetibilidad (en el mismo día) y su reproducibilidad (en distintos días). Para ello se consideró la desviación estándar relativa (DER). En el caso de la repetibilidad y reproducibilidad de la metodología, los valores de DER cuando no se saponificó fueron inferiores a 7.2% y 12%, respectivamente. Los máximos valores de DER para las medidas de precisión cuando las muestras se saponificaron estuvieron en torno a 25%. Por otra parte, la exactitud se evaluó añadiendo cantidades conocidas de estándares a la muestra a extraer y calculando la cantidad recuperada finalmente. La información obtenida debe interpretarse con cautela, ya que la extracción de los

carotenoides añadidos no puede equipararse exactamente con los presentes en la matriz del alimento. En el caso de muestras sin saponificar las recuperaciones oscilaron entre aproximadamente 95 y 108%. Cuando se saponificó, se obtuvieron porcentajes de recuperación sensiblemente menores, en torno a 80% (Stinco *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio ilustran lo ya comentado acerca de los problemas asociados con la saponificación de muestras, proceso que puede afectar negativamente la cuantificación de algunos carotenoides. En este sentido, se recomienda interpretar los datos cuantitativos sobre carotenoides en muestras saponificadas con cautela y considerar que, en la mayoría de los casos, pueden ser considerablemente menores a los reales.

Los métodos de microextracción permiten ahorrar mucho tiempo y disolventes con respecto a las extracciones clásicas. Por el contrario, requieren equipamiento adicional (por ejemplo microcentrífugas). Además, dado que se manejan pequeñas cantidades de muestra es esencial asegurar su representatividad.

## ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y CUANTIFICACIÓN

Aunque las cromatografías en columna abierta y en capa fina se usan poco en análisis de rutina, pueden ser interesantes para el aislamiento de carotenoides o estudios preliminares del perfil de carotenoides de muestras desconocidas. Las fases estacionarias pueden dar origen a transformaciones no deseadas de los mismos, por lo que, en el caso de que se tengan que usar estas técnicas, se recomienda leer textos clásicos sobre ellas (Bernhard, 1995; Schiedt, 1995).

Existen múltiples causas de error durante el análisis mediante HPLC (Rodríguez-Amaya, 2001). Así, es importante asegurarse de que los disolventes de inyección elegidos disuelvan bien la muestra y además sean compatibles con los de la fase móvil. Todos los disolventes usados deben estar libres de peróxidos y ácidos. Si se usa cloroformo hay que tener en cuenta que en algunos casos se estabiliza con etanol al 1 % lo que podría afectar la separación cromatográfica. Por otra parte, se ha descrito que ciertos disolventes, como el DCM, cloroformo, THF, benceno o tolueno podrían generar picos divididos (Khachik *et al.*, 1988; Rodríguez-Amaya, 2001). La acetona se considera en general un buen disolvente de inyección (Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Lietz y Henry, 1997).

Para la correcta cuantificación de los compuestos de interés por HPLC ha de ajustarse bien la concentración del extracto y el volumen de inyección. Si se analizan muestras muy concentradas los picos de interés pueden verse solapados o la señal puede estar fuera del rango lineal del detector. Asimismo, si la muestra está muy diluida puede ocurrir que algunos carotenoides de interés no se detecten. En los últimos años cada vez es más habitual el uso de inyectoros automáticos que permiten realizar análisis en secuencia. Es importante considerar que si los extractos de las muestras se mantienen durante mucho tiempo en la bandeja del inyector automático y no se controla correctamente la temperatura de la misma, podrían producirse pérdidas del disolvente por evaporación. Como resultado los extractos podrían concentrarse, lo que afectaría negativamente la exactitud del análisis.

También es importante asegurar que la recuperación de los carotenoides a partir de la columna sea lo más completa posible. Para mejorar la recuperación se suelen añadir a la fase móvil pequeñas cantidades (0.05% - 0.1%) de trietilamina

(TEA) o acetato de amonio (AA) (Emenhiser *et al.*, 1996; Hart y Scott, 1995; Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2007). La trietilamina debe excluirse en HPLC-MS, porque puede producir exceso de ruido.

El uso de metales, incluso acero inoxidable, en las fritas de precolumnas y columnas analíticas puede degradar los carotenoides, por lo que se recomienda el uso de materiales como teflón o titanio para las fritas y poliéster éter cetona (PEEK) como material para las conexiones con la columna (Craft y Soares, 1992; Hart y Scott, 1995).

Más información básica a tener en cuenta durante el análisis por HPLC de carotenoides puede encontrarse en textos clásicos (Pfander y Riesen, 1995; Rodríguez-Amaya, 2001).

## ALMACENAMIENTO DE EXTRACTOS DE CAROTENOIDES

Conviene recordar que los carotenoides, una vez extraídos de la matriz, son especialmente inestables. En el caso de que los

extractos no se vayan a analizar de inmediato, es conveniente minimizar pérdidas durante su almacenamiento. En este sentido, las muestras deben almacenarse al abrigo de la luz al menos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aunque sería mejor hacerlo a temperaturas inferiores. Evidentemente, debe desplazarse el aire con gases inertes, como nitrógeno o argón. Asimismo se pueden añadir antioxidantes. Suele recomendarse que los extractos se almacenen secos. Si esto no es posible deben almacenarse disueltos en disolventes como hexano o EP y evitarse otros como ciclohexano, DCM, acetona o ED. Para la re-disolución se puede sumergir convenientemente el recipiente en un baño de ultrasonidos durante unos segundos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014). La estabilidad de varios carotenoides en distintas fuentes alimentarias durante su almacenamiento a  $-20$  y  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  ha sido evaluada hace poco en un excelente trabajo (Dias, Camões y Oliveira, 2014).

Por otra parte, debe evitarse guardar en el frigorífico carotenoides en disolventes volátiles inflamables como el ED. En cualquier caso se recomienda usar frigoríficos o congeladores a prueba de explosiones.

## REFERENCIAS

- Bernhard, K. 1995. "Chromatography: Part II. Column chromatography". En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids*. 1A: 117-130. Basilea: Birkhäuser.
- Biehler, E., Alkerwi, A., Hoffmann, L., Krause, E., Guillaume, M., Lair, M.L. y Bohn, T. 2012. *Journal of Food Composition and Analysis* 25: 56-65.
- Breithaupt, D.E. y Schwack, W. 2000. *European Food Research and Technology* 211: 52-55.
- Breithaupt, D.E., Wirt, U. y Bamedi, A. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 66-70.
- Britton, G. 1991. Carotenoids. En P.M. Dey y J.B. Harborne (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press: 473-518.
- Britton, G. 1995. *The FASEB Journal* 9: 1551-1558.
- Britton, G. y Young, A.J. 1993. "Methods for the isolation and analysis of carotenoids". En G. Britton, y A.J. Young (eds.). *Carotenoids in Photosynthesis*. Londres: Chapman & Hall 10: 409-457.
- Craft, N. E. y Soares, J. H. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 431-434.
- Delgado-Pelayo, R. y Hornero-Méndez, D. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8225-8232.
- Deli, J., Matus, Z. y Szabolcs, J. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2072-2076.
- Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C. y Oliveira, L. 2014. *Food Chemistry*, 156: 37-41.
- Emenhiser, C., Simunovic, N., Sander, L.C. y Schwartz, S.J. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3887-3893.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E.S., Holloway, D.E. y Bramley, P. 2000. *Plant Journal* 24: 551-558.
- Giuffrida, D., La Torre, L., Manuela, S., Pellicanò, T.M. y Dugo, G. 2006. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 319-323.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. y Rojas-Hidalgo, E. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2135-2140.
- Hart, D.J. y Scott, K.J. 1995. *Food Chemistry* 54: 101-111.
- Ittah, Y., Kanner, J. y Granit, R. 1993. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 899-901.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Vanderslice, J.T. y Furrow, G. 1988. *Analytical Chemistry* 60: 807-811.
- Khachik, F., Beecher, G.R. y Whitaker, N.F. 1986. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 603-616.
- Kimura, M. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1999. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49: 58S-66S.

## REFERENCIAS

- Kimura, M., Rodríguez-Amaya, D.B. y Godoy, H.T. 1990. *Food Chemistry* 35: 187-195.
- Lietz, G. y Henry, C.J.K. 1997. *Food Chemistry* 60: 109-117.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109: 546-553.
- Meléndez-Martínez, A.J., Stinco, C., Mapelli-Brahm, P. y Vicario, I. 2014. "Analysis of Carotenoids and Tocopherols in Plant Matrices and Assessment of Their In Vitro Antioxidant Capacity". En M. Rodríguez-Concepción (ed.). *Plant Isoprenoids*. Nueva York: Springer. 1153: 77-97.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 638-649.
- Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2010. *Phytochemistry* 71: 1104-1114.
- Mercadante, A.Z. 2007. Analysis of Carotenoids. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. C. 447-478. Boca Raton, Londres y Nueva York: CRC Press.
- Mercadante, A.Z. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1989. *Chromatographia* 28: 249-252.
- Mercadante, A.Z. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1991. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1094-1097.
- Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y carotenoides en Tecnología de los Alimentos*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Pérez-Gálvez, A. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 566-569.
- Müller, H. 1997. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 204: 88-94.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A. J. y Mondello, L. 2013. *Food Chemistry* 140: 825-836.
- Oliver, J., Palou, A. y Pons, A. 1988. *Journal of Chromatography A* 829: 393-399.
- Oliver, J. y Palou, A. 2000. *Journal of Chromatography A* 881: 543-555.
- Pfander, H. y Riesen, R. 1995. "Chromatography: Part IV. High-Performance Liquid Chromatography". En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser 1A: 145-190
- Pfister, S., Meyer, P., Steck, A. y Pfander, H. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2612-2615.
- Ríos, A.O. y Mercadante, A.Z. 2004. *Food Additives & Contaminants*. 21: 125-133.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.

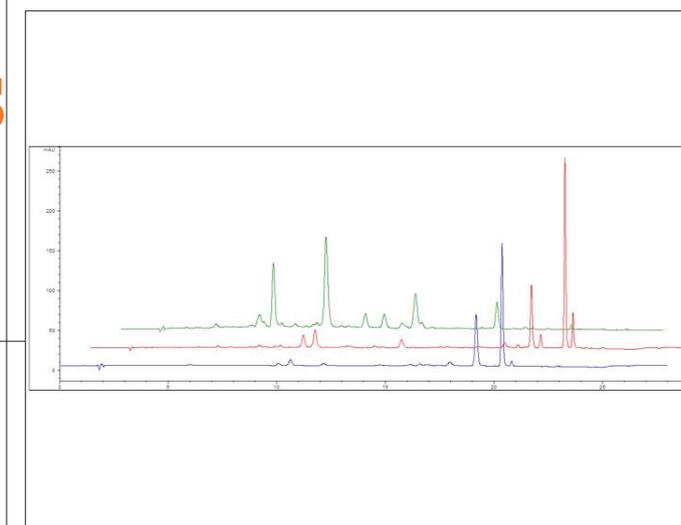
## REFERENCIAS

- Rodríguez-Amaya, D.B. y Kimura, M. 2004. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. Tropical Agriculture. Washington, D.C. y Cali: IFPRI y CIAT.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Kimura, M., Godoy, H.T. y Amaya-Farfan, J. 2008. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 445-463.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Kimura, M., Godoy, H.T. y Arima, H.K. 1988. *Journal of Chromatographic Science* 26: 624-629.
- Rodríguez-Amaya, D.B. y Tavares, C.A. 1992. *Food Chemistry* 45: 297-302.
- Royal Society of Chemistry. 2014. Chemspider. Disponible en: <http://www.chemspider.com/> [consulta: 26 de diciembre de 2014].
- Schiedt, K. 1995. "Chromatography: Part III. Thin-layer chromatography". En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids* 1A: pp. 131-144. Basilea: Birkhäuser.
- Schiedt, K., Bischof, S. y Glinz, E. 1993. *Methods in Enzymology* 214: 148-168.
- Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. "Isolation and Analysis". En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids*. 1A: pp. 81-108. Basilea: Birkhäuser.
- Stinco, C.M., Benítez-González, A.M., Hernanz, D., Vicario, I.M. y Meléndez-Martínez, A.J. 2014. *Journal of Chromatography A* 1370: 162-170.
- Tee, E.S. y Lim, C.L. 1991. *Food Chemistry* 41: 147-193.

## CAPÍTULO 3

# ANÁLISIS DE CAROTENOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Antonio Pérez-Gálvez, Ana Augusta O. Xavier, Manuel Jarén-Galán,  
Antonio J. Meléndez-Martínez, Ana Benítez-González, Carla M. Stinco,  
Juan Garrido-Fernández



### INTRODUCCIÓN

#### Aspectos generales de la cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que utiliza los principios básicos de la cromatografía líquida —separación basada en la interacción del analito entre una fase líquida móvil y una fase estacionaria— y emplea instrumentos avanzados: inyector, bomba, columna y detector. En este tipo de cromatografía, el líquido que compone la fase móvil se bombea mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Así, un equipo de HPLC consiste en bomba mecánica, controlador y detector, equipos entre los que se intercala la columna cromatográfica en la que se realiza la separación y el conjunto está controlado por un software de gestión del sistema cromatográfico, adquisición de datos y posterior análisis de los mismos (Weston y Brown, 1997).

Antes de la aparición de la cromatografía líquida de alta resolución, a mediados de la década de 1970, la separación de los pigmentos carotenoides se realizaba por cromatografía en columna abierta (OCC) y por cromatografía en capa fina (TLC). Una de las primeras memorias sobre la aplicación de separación por HPLC a los pigmentos carotenoides data de 1971 y la realizaron Wheaton y Stewart, separando carotenos y xantofilas de extractos cítricos mediante el uso de cromatografía de flujo continuo en una columna de fase normal compuesta por óxido de magnesio. Unos años más tarde, Fiksdahl, Mortensen y Liaaen-Jensen (1978) estudiaron las aplicaciones y limitaciones de HPLC acoplada a espectrometría de UV-visible en la separación de carotenoides, xantofilas, isómeros *cis-trans*, y diastereoisómeros, empleando columnas rellenas de sílice y usando diferentes gradientes de acetona, hexano y metanol como fase móvil.

En la actualidad la técnica de HPLC es el método de elección más popular para la separación, análisis y cuantificación de carotenoides al presentar muchas ventajas en comparación con otras técnicas cromatográficas, sobre todo en términos de resolución, separación, tiempo necesario de análisis y la cantidad requerida de muestra (Mínguez-Mosquera, 1997). Así, el tiempo de análisis necesario, incluyendo la preparación de la muestra y la propia separación, permite la evaluación de un gran número de muestras y replicados en un tiempo corto. El acoplamiento de equipos de HPLC con diferentes tipos de detectores facilita la tarea de identificación de estos compuestos; la detección se hace mediante espectrometría UV-visible (longitud de onda y sistemas de matriz de diodos individuales) o espectrometría de masas, que son los sistemas empleados hoy (Schoefs, 2004).

## Características físicas y químicas de los carotenoides y su relación con la cromatografía líquida de alta resolución

Los carotenoides tienen como estructura básica un esqueleto tetraterpeno con 40 átomos de carbono, que consta de ocho unidades de isopreno enlazadas en un patrón de cabeza a cola con una simetría invertida en el centro de la molécula (Britton, 1995). Esta estructura puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación y oxidación, dando lugar a estructuras diferenciadas que comprenden más de 700 carotenoides, cifra de los compuestos que han sido identificados hasta el momento en la naturaleza (Davies, 1976). Su característica estructural principal es el sistema de dobles enlaces conjugados, donde los electrones están deslocalizados eficientemente. Este cromóforo es responsable de la capacidad de los carotenoides para absorber luz en la región visible, por lo que la detección mediante espectrometría de UV-visible de diodos en línea es particularmente adecuada. Además, el cromóforo de los carotenoides hace que los isómeros *todo-trans* sean moléculas rígidas y lineales, lo que deriva en una propiedad importante para el resultado de las interacciones con las fases estacionarias en HPLC (Khachik, 2009).

Además del comportamiento cromatográfico de los carotenoides en relación con el número de dobles enlaces conjugados en el cromóforo, se deben considerar la naturaleza de los grupos terminales y el tamaño de la moléculas (Davies, 1976). La influencia de los dobles enlaces se ilustra bien por adsorción mediante afinidad de los carotenoides acíclicos con fase normal, eluyendo en la siguiente secuencia: fitoeno, fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, licopeno y neurosporeno (Davies, 1976; Rodríguez-Amaya, 2001; figura 1). La ciclación, en general,

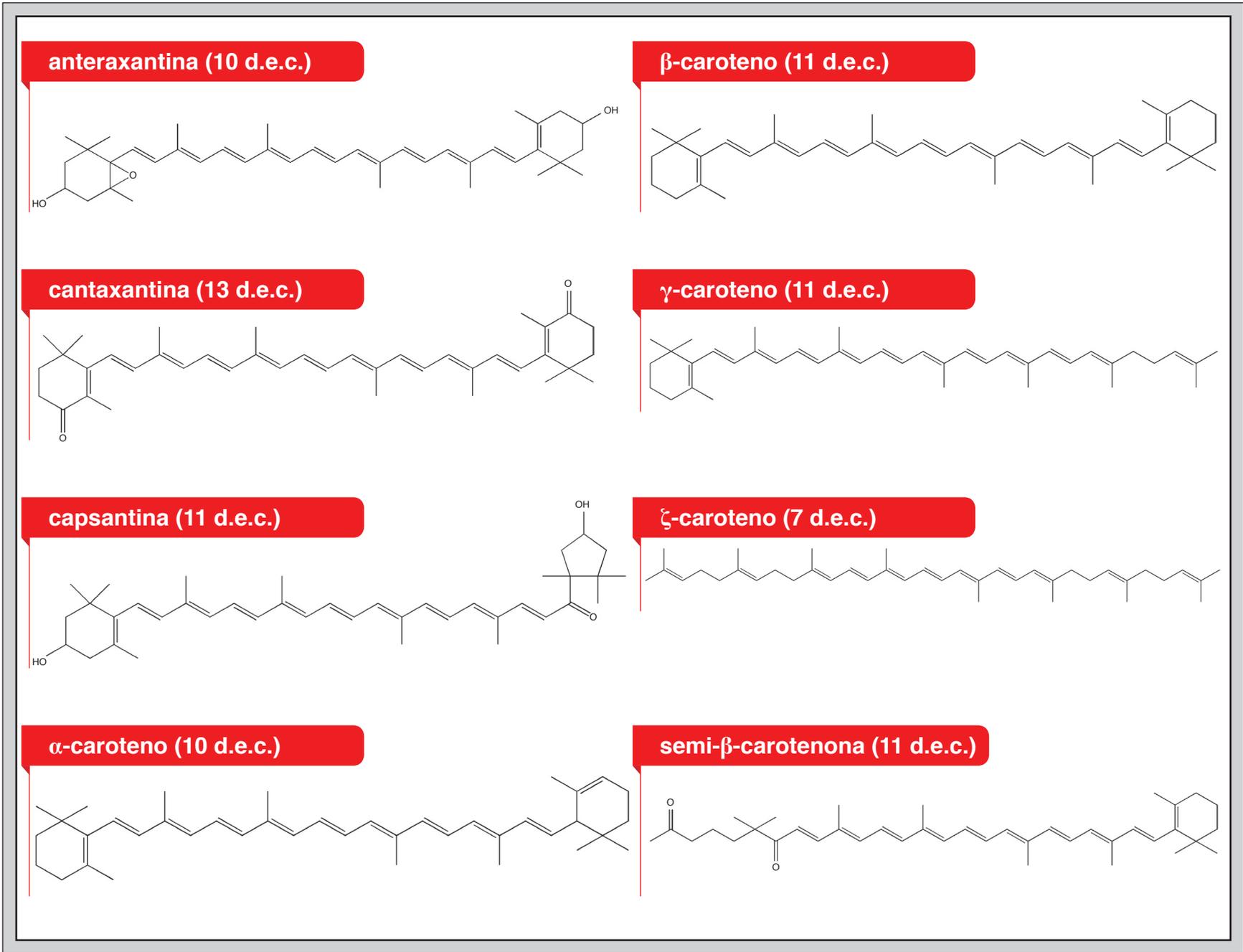


FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

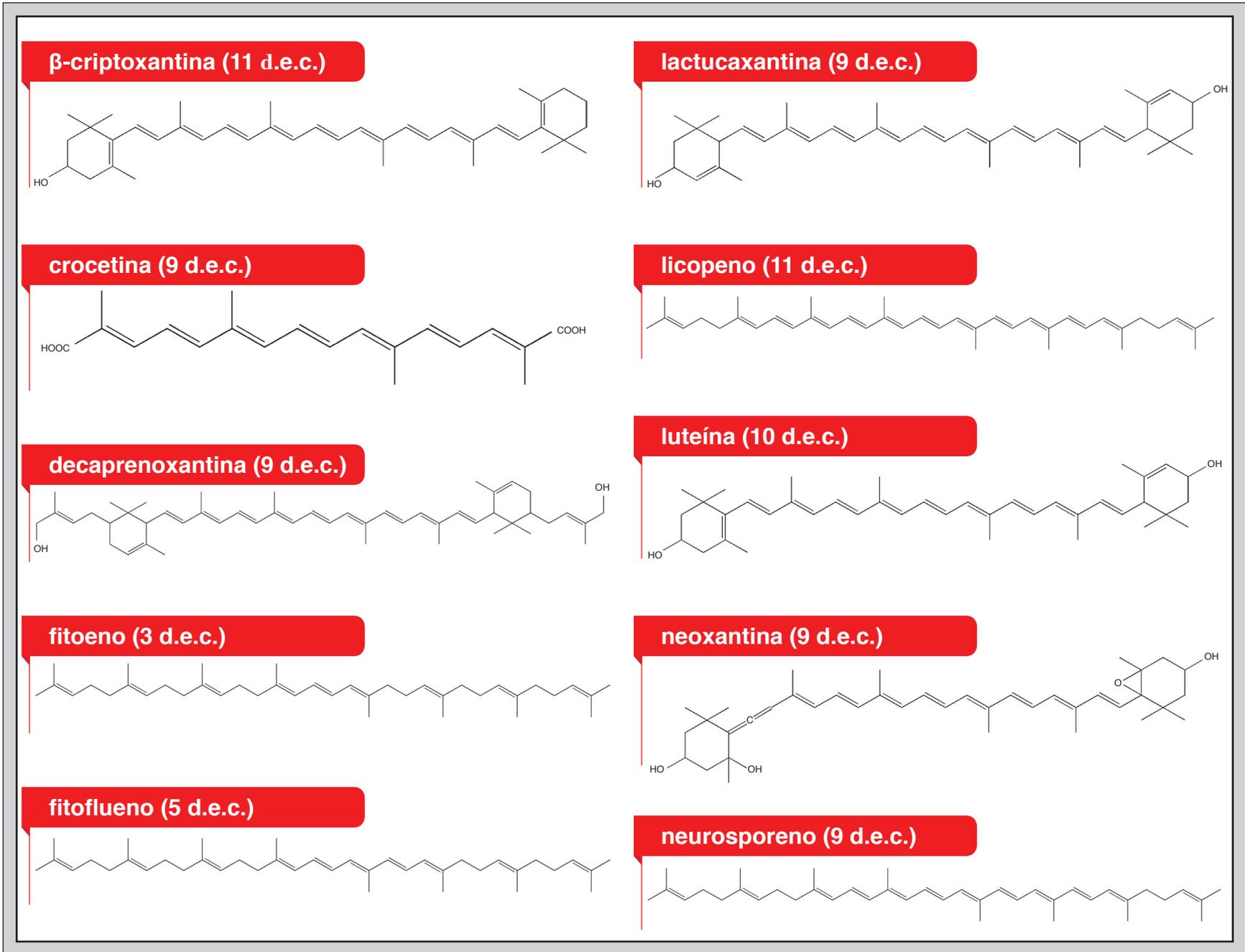


FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

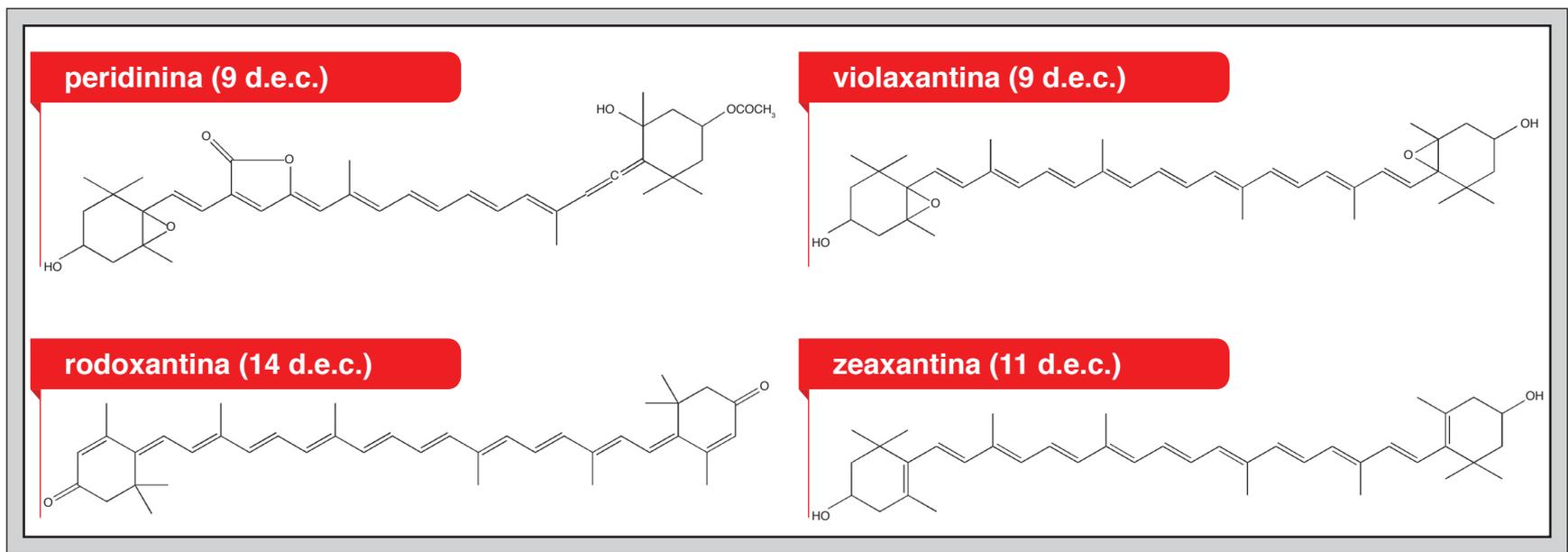


FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos carotenoides.

reduce la afinidad de adsorción y, por lo tanto,  $\beta$ -caroteno (con dos anillos tipo  $\beta$ ) se absorbe más débilmente que  $\gamma$ -caroteno (un anillo  $\beta$ ). Por otro lado, la presencia de grupos oxigenados aumenta la polaridad y por lo tanto la adsorción de los carotenoides, y la magnitud de este incremento depende del tipo, número y ubicación de esos grupos (Rodríguez-Amaya, 2001). En fase reversa, el orden de elución es prácticamente el orden inverso que se observa en fase normal de elución. Las xantofilas, al ser más polares eluyen antes que los carotenos, con las xantofilas di-hidroxiladas (tales como luteína y zeaxantina), eluyendo primero, seguidas por las mono-hidroxiladas. Los carotenos, a su vez, no siguen un orden de elución estándar, y su comportamiento cromatográfico depende del tipo de fase estacionaria (monómero o polímero) utilizada y la composición de la fase móvil (Rodríguez-Amaya, 2001).

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

### Procedimientos analíticos generales

La alta susceptibilidad a la degradación y la isomerización inherente a la estructura química de los carotenoides requiere precauciones especiales durante su análisis con el fin de evitar los efectos deletéreos del oxígeno, la temperatura, la luz y los ácidos. Aunque no existe un protocolo normalizado para la preparación de muestras para el análisis de los carotenoides, ya que el perfil y la concentración de estos pigmentos varía ampliamente de acuerdo con la matriz que los contiene, sí se puede indicar un procedimiento típico a seguir en la preparación de la muestra para su análisis por HPLC: muestreo y preparación de la muestra, extracción, partición por disolventes compatibles con cromatografía, en algunos

casos saponificación y lavado, concentración y la evaporación del disolvente (Mercadante, 2008; Rodríguez-Amaya, 2001) hasta obtener un extracto seco listo para su dilución y análisis. En el capítulo 2 se ofrece información detallada de las consideraciones generales para el análisis de carotenoides.

### Saponificación de muestras con alto contenido graso o con ésteres de carotenoides

La etapa de hidrólisis alcalina, también conocida como saponificación, se aplica para la eliminación de los lípidos en las muestras con alto contenido graso y la hidrólisis de los ésteres de carotenoides presentes habitualmente en tejidos de origen vegetal (Mercadante, 2008; Rodríguez-Amaya, 2010). Como ya se ha indicado en el capítulo 2, se trata de una etapa con ventajas e inconvenientes, por lo que siempre debe considerarse si es realmente necesaria.

### Derivación de grupos funcionales

Mientras que la espectrometría de UV-visible revela la naturaleza del cromóforo de los carotenoides y el comportamiento cromatográfico proporciona cierta información sobre su polaridad relativa, hay algunas pruebas químicas bastante simples que proporcionan información acerca de la naturaleza, la estructura y la posición de algunos grupos funcionales (Davies, 1976). Las pruebas más utilizadas se discuten brevemente a continuación, sobre la base de procedimientos descritos por Eugster (1995) y Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez (2002).

a) Grupo 5,6-epóxido: reordenamiento furanoide  
La prueba se basa en la modificación de aquella transformación en el cromóforo resultante de la presencia de un grupo 5,6-epóxido a 5,8-epóxido en medio ácido (figura 2), lo que resulta en un desplazamiento hipsocrómico del espectro

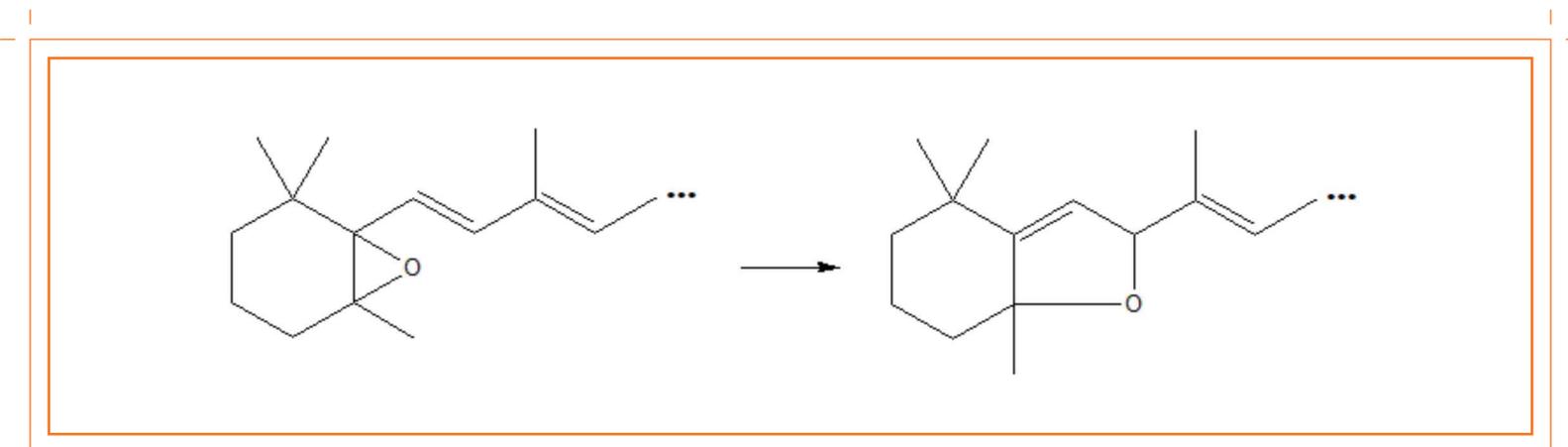


FIGURA 2. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

de absorción entre 15 y 20 nm. La reacción puede llevarse a cabo directamente en la cubeta del espectrofotómetro mediante la adición de varias gotas de HCl 0.1 N y medir los cambios en el espectro de absorción UV-visible, *in situ*, o bien mediante TLC tras pulverizar la banda cromatográfica de interés con HCl una vez completada la separación cromatográfica. En este caso, la aparición de un color azul característico identifica la presencia del grupo 5,6-epóxido: los diepóxidos se revelan mediante un color azul oscuro y los monoepóxidos con un color verde azulado. La prueba también puede realizarse inyectando en el sistema de HPLC un extracto antes y después de acidificar con el HCl diluido.

*b) Carbonilo: reducción de aldehídos y cetonas*

Los reactivos  $\text{LiAlH}_4$  o  $\text{NaBH}_4$  se utilizan en general como agentes de reducción de grupos carbonilo para formar los correspondientes alcoholes. Los aldehídos se reducen a alcoholes primarios y las cetonas a alcoholes secundarios. La prueba se realiza mediante la adición de  $\text{NaBH}_4$  a la solución carotenoide, que se mantiene en condiciones de refrigeración y en la oscuridad durante tres horas. Si hay algún grupo carbonilo conjugado con cadena polienoica, se observará tanto un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción y un aumento considerable en la estructura fina del espectro UV-visible.

*c) Ensayo de acetilación de grupos hidroxilo*

La prueba se basa en la conversión de alcoholes a ésteres, que son menos polares, pero que tienen el mismo espectro de absorción UV-visible. La reacción se produce mediante la adición de anhídrido acético en piridina a la solución carotenoide. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante 12 horas y la reacción se detiene mediante la adición de agua. El seguimiento de esta reacción se lleva a cabo por TLC o

HPLC, y el número de productos formados sugiere el número de grupos hidroxilo que han sido acetilados. La aparición de un derivado monoacetilado indica la presencia de un solo grupo hidroxilo. En el caso de tener dos grupos hidroxilo en la estructura original, se pueden observar uno (monoacetilado) o dos (diacetilado) derivados como productos de reacción, dependiendo de si la posición de los grupos hidroxilo es simétrica o no.

*d) Ensayo de grupo hidroxilo alílico*

La presencia del grupo funcional se detecta a través de una reacción de deshidratación que introduce un doble enlace adicional en el cromóforo del carotenoide. Este aumento de los dobles enlaces del cromóforo produce un desplazamiento batocrómico (a mayor longitud de onda) de 10 a 16 nm que se puede observar en el espectro UV-visible. La reacción consiste en la adición de HCl diluido a una solución del carotenoide en cloroformo.

## ELEMENTOS CRÍTICOS EN HPLC PARA LA SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES

### Eluyentes en la fase móvil

Las propiedades más importantes que se deben observar e influyen en la elección de la fase móvil son la viscosidad y la polaridad que, si es posible, debe ser baja. La fase móvil debe ser compatible con el método de detección, en especial para los carotenoides que absorben en la zona del UV, y que la mezcla óptima de elución sea completamente clara e incolora (Pfander, 1995). También es necesario que los carotenoides sean completamente solubles en la fase móvil utilizada para la separación cromatográfica. Los carotenoides en general son

moléculas altamente hidrófobas y solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, como acetona, éter dietílico, cloroformo, acetato de etilo y presentan ninguna o muy baja solubilidad en agua (Rodríguez-Amaya, 2001).

Hay dos tipos de fases estacionarias para la separación de los carotenoides mediante HPLC: fase normal y fase reversa (véase abajo). En fase normal, la fase estacionaria es de naturaleza polar por lo que requiere una fase móvil no polar o de baja polaridad. El hexano es el disolvente más ampliamente utilizado en este caso, junto con pequeñas cantidades de otros disolventes más polares tales como metanol y propanol; el uso de agua no se recomienda porque es un disolvente altamente polar.

La cromatografía líquida de fase reversa utiliza como fase estacionaria un material de naturaleza apolar y como fase móvil disolventes polares, como mezclas de metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano y agua, aunque se prefieren los sistemas no acuosos para la separación cromatográfica de los carotenos (Pfander y Riesen, 1995; Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002).

### Separación por cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal combina una fase estacionaria polar con la fase móvil de carácter no polar. Los materiales más comunes para el relleno de la columna son sílice y nitrilo usando fases o grupos amino (Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002). La presencia de grupos polares es el factor determinante en las interacciones entre los carotenoides y los grupos complejados con la sílice. Los carotenos tienen baja afinidad por la sílice, eluyendo

al comienzo de la cromatografía y por lo tanto la resolución y selectividad para esta familia de carotenoides no es la adecuada. En el caso de las xantofilas, su interacción con los grupos polares de la fase estacionaria es tal que el aumento en el número de grupos funcionales de aquellas incrementa la afinidad por adsorción. Por lo tanto, la elución de xantofilas en fase normal sigue el siguiente orden: monohidroxiladas, dihidroxiladas y trihidroxiladas. El efecto de los grupos funcionales polares se modula por las interacciones y otras características, como su posición, la ciclación y el tipo de anillo ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\epsilon$ ), el nivel de saturación y la forma del isómero geométrico *cis* o *trans* (Khachik, 2009).

Panfili, Fratianni e Irano (2004) determinaron la composición de carotenoides en cereales y sus subproductos mediante HPLC en fase normal, empleando una columna de sílice Phenomenex Kromasil (250 mm I.D. x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) y una fase móvil de n-hexano e isopropanol (5%) con un flujo de 1.5 mL/min. La columna es capaz de resolver los picos de  $\beta$ -criptoxantina, luteína y zeaxantina, pero no tenía suficiente selectividad para separar  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. El uso de una columna de sílice, Spherisorb (250 mm I.D. x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) y un gradiente de éter de petróleo y acetona como fase móvil (Almela *et al.*, 1991) separa el contenido carotenoide en extractos saponificados obtenidos de diferentes cultivares de pimiento. Una columna de sílice con hexano y grupo nitrilo, con diclorometano y metanol (75:25:0.3) que contiene 0.1% de N, N-diisopropiletilamina como fase móvil se utilizó para la separación de luteína, zeaxantina y sus isómeros geométricos y sus productos metabólicos en frutas, verduras y productos de cereales. El orden de elución fue: 13,13'-di-*cis*-luteína, todo-*trans* luteína, zeaxantina todo-*trans*, 9-*cis*-luteína, 9'-*cis*-luteína, epóxido de luteína, 13-*cis* + 13'-*cis*-luteína, 9-*cis*-zeaxantina, 13-*cis*-violaxantina (Humphries y Khachik, 2003). Estos autores

también encontraron dificultades en la separación de los carotenos debido a la baja selectividad de la columna. Por otra parte, Schmitz, Emenhiser y Schwartz (1995) fueron capaces de separar fitoflueno,  $\zeta$ -,  $\gamma$ -,  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno utilizando una columna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  como fase estacionaria.

## Separación por cromatografía de fase reversa

A diferencia de la fase normal, la cromatografía de fase reversa utiliza fases estacionarias no polares, como octilsilano ( $\text{C}_8$ ), octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) y algunos polímeros (poliestireno, divinilbenceno y polimetacrilato). El mecanismo de separación cromatográfica se basa en el grado de hidrofobicidad de los carotenoides siendo los carotenoides polares (xantofilas) los que muestran menor retención y posteriormente eluyen los carotenos y los ésteres de xantofilas. Una de las ventajas de la fase reversa a la fase normal es la posibilidad del uso de agua en la composición de la fase móvil (Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002).

Las características y algunos ejemplos de análisis de carotenoides en fase reversa ( $\text{C}_{18}$  y  $\text{C}_{30}$ ) están en el apartado “Ejemplos de aplicaciones” de este capítulo.

### Columnas $\text{C}_{18}$

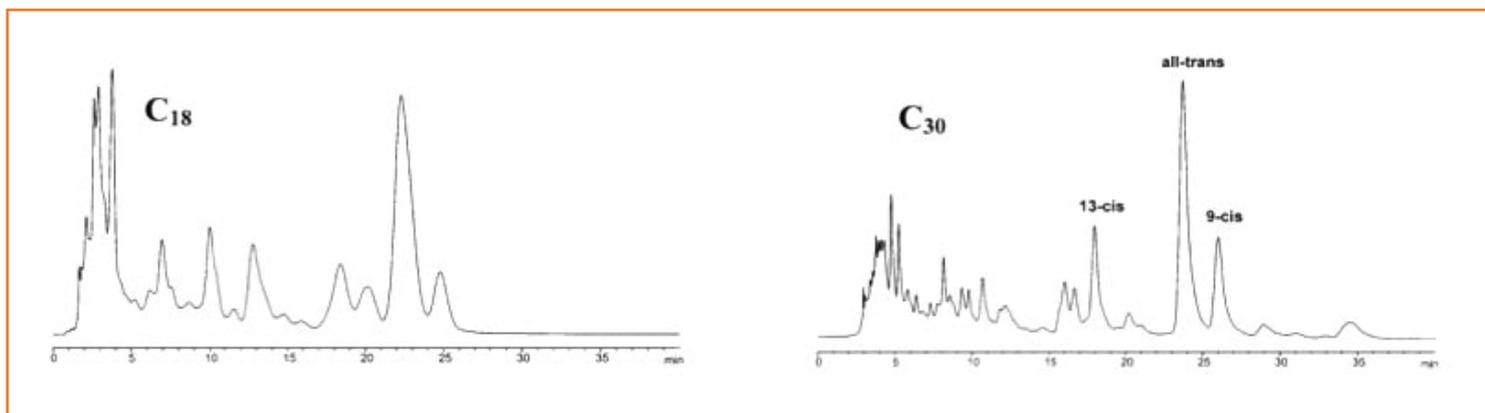
La cromatografía en columna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  se utiliza con frecuencia en la separación de los carotenoides, debido a su carácter hidrófobo. En esta columna, los grupos silanol de sílice están unidos a cadenas de alquilo de 18 átomos de carbono. En función de la disposición de las cadenas de alquilo en la sílice se consideran dos tipos de columnas: columnas monoméricas, donde las cadenas de alquilo son paralelas una respecto de la siguiente y las poliméricas, en las que el polímero orgánico cubre la estructura de sílice de manera

entrelazada. Las columnas de conformación monomérica tienen mayor reproducibilidad, mientras que las columnas poliméricas presentan mayor selectividad, principalmente en la separación de xantofilas (Epler *et al.*, 1992).

Las columnas  $\text{C}_{18}$  también se pueden clasificar de acuerdo con el porcentaje de grupos silanol recubiertos: ODS-1 tiene 5% de recubrimiento; ODS-2 con 10% de superposición y ODS-3 con 15% de recubrimiento. Considerando que los restantes grupos silanol libres pueden afectar la separación y disminuir la reproducibilidad de la columna, la sustitución se realiza a menudo con grupos de menor longitud de cadena de carbonos. Sin embargo la presencia de grupos no protegidos terminalmente puede ser beneficiosa en la separación de xantofilas (Gilmore y Yamamoto, 1991; Khachik, 2009).

### Columnas $\text{C}_{30}$

La introducción de las columnas  $\text{C}_{30}$  (Sander *et al.*, 1994) significó un avance considerable en la capacidad de resolución cromatográfica para la separación de carotenoides. Este tipo de fase estacionaria tiene una mayor selectividad para la separación de carotenoides y sus isómeros geométricos en comparación con las columnas  $\text{C}_{18}$  (Albert, 1998; Figura 3). El aumento de la selectividad es debido al tamaño de los grupos enlazados con la fase de sílice que aumenta la hidrofobicidad de la fase estacionaria, lo que permite una mayor interacción con los carotenoides (Sander *et al.*, 1994). La desventaja de la columna  $\text{C}_{30}$  en relación con la columna  $\text{C}_{18}$  es el tiempo de análisis, en general más largo. En algunos casos puede extenderse hasta 60-100 minutos (Khachik, 2009), si bien las nuevas columnas con menor longitud y tamaño de partícula permiten reducir considerablemente el tiempo de los análisis sin afectar negativamente la resolución de los picos.



**FIGURA 3.** Separación por HPLC de isómeros de  $\beta$ -caroteno a 21,8 °C utilizando una columna  $C_{18}$  como fase estacionaria y acetona/agua (83:17, v/v), flujo 1 mL/min y detección a 450 nm; una columna  $C_{30}$  como fase estacionaria y acetona/agua (93:7, v/v), flujo 1 mL/min.

La separación cromatográfica en las columnas  $C_{30}$  depende mucho de la temperatura, que modifica la organización de los grupos  $C_{30}$  presentes en la superficie de la sílice. A bajas temperaturas, las cadenas de alquilo están dispuestas preferentemente en la conformación *trans* (más ordenada y rígida), lo que proporciona mayor selectividad. Con el aumento de la temperatura, la interconversión se produce entre las conformaciones *trans* y *cis*, resultando en una pérdida de la resolución de los picos (Albert, 1998; Lee, Hamaguchi y Shigeto, 2008).

### Detectores UV-visible

Los detectores de espectrofotometría UV-visible son, sin duda, los más utilizados en el análisis por HPLC de carotenoides, debido sobre todo a las características de absorción de luz de estos pigmentos. Actualmente, el detector UV-visible más popular es el detector de diodos en línea (DAD), que puede

recoger datos de forma continua durante todo el análisis, facilitando así la determinación de la pureza y la identificación de compuestos desconocidos (Kopec *et al.*, 2012). En un detector DAD, la radiación pasa a través de la muestra en la celda de flujo, se dispersa por una rejilla y penetra en la matriz de diodos. Cada diodo mide un rango estrecho de longitudes de onda del espectro, por lo que es posible adquirir una amplia banda de datos espectroscópicos simultáneamente (Pfander y Riesen, 1995). Los detectores UV-visible son altamente sensibles, tienen una amplia gama lineal, presentan una buena estabilidad frente a los cambios de temperatura y admiten gradientes de elución de muy diferente composición (Pfander y Riesen, 1995). Más información sobre espectrofotometría UV-visible aplicada al análisis de carotenoides se proporciona en los capítulos 4 y 6.

### Electroquímico

Los detectores electroquímicos se utilizan entre la amplia gama de detectores acoplados a la técnica de HPLC después de

los detectores de UV-visible y de fluorescencia. Su principio de funcionamiento se basa en las propiedades de oxidación y reducción de analitos en un potencial fijo (Santos *et al.*, 2009). Este tipo de interacción permite eliminar compuestos no deseados a través de la oxidación selectiva de interferentes antes de la detección del compuesto de interés mediante la selección del potencial electroquímico adecuado. Esta característica confiere una alta sensibilidad y selectividad a los detectores electroquímicos, que son muy útiles en el análisis de compuestos orgánicos, como tocoferoles, carotenoides y retinoides en bajas concentraciones y hasta niveles de trazas, particularmente en muestras complejas (Ferruzzi *et al.*, 1998). El número de publicaciones sobre el análisis de carotenoides mediante detectores electroquímicos es escaso y en la mayoría de ellos este detector aparece acoplado a sistemas cromatográficos de fase reversa y para el análisis de carotenoides en alimentos, como aceites vegetales (Puspitasari-Nienaber, Ferruzzi y Schwartz, 2002), frutas y verduras (Brown *et al.*, 2004), o para muestras biológicas, como plasma humano y tejidos de las mucosas (Ferruzzi *et al.*, 2001), plasma humano (Finckh *et al.*, 1995; Ferruzzi *et al.*, 1998) y de otras especies (Hermans *et al.*, 2005).

### Espectrometría de lente térmica

La técnica de espectrometría de lente térmica (TLS) se basa en la absorbancia medida por el efecto de lente térmica indirecta (Luterotti, Sikovec y Bicanic, 2000). En la práctica, un haz de láser (fuente de luz) se concentra en la muestra y la energía absorbida por ella conduce a un aumento en la temperatura, lo que resulta en cambios en las propiedades físicas, como el índice de refracción, el parámetro que se mide en la técnica TLS (Franko, 2001). El calor liberado por la muestra es proporcional a la potencia de excitación láser,

lo que proporciona una alta sensibilidad a la técnica TLS en comparación con otras técnicas espectrofotométricas convencionales. Debido a su alta sensibilidad, los detectores de TLS se emplean en el análisis de muestras con concentraciones muy bajas de carotenoides. Algunos estudios que utilizan esta técnica de detección se han aplicado con muestras de plasma (Franko, Van Bovenkamp y Bicanic, 1998) y suplementos a base de aceites de pescado (Luterotti, Franko y Bicanic, 1999), hígado (Luterotti, Sikovec y Bicanic 2000) y aceites de verduras (Luterotti, Franko y Bicanic, 2002).

### Espectrometría de masas

Aunque el detector UV-visible es el de uso más común en HPLC para el análisis de carotenoides, muchos autores han optado por el uso de detectores de espectrometría de masas (MS) para la confirmación de la masa y, en algunos casos, de características estructurales de estos pigmentos (Breithaupt y Bamedi, 2002; De Rosso y Mercadante, 2007; Inbaraj *et al.*, 2008; Mandelli *et al.*, 2012; Rodrigues, Mariutti y Mercadante, 2013; Delgado-Pelayo, Gallardo-Guerrero y Hornero-Méndez, 2014). La MS tiene una mayor sensibilidad que la detección por UV-visible y proporciona información sobre la composición elemental y la masa del compuesto, junto con el patrón característico de fragmentación originado por su estructura. Además, la cantidad de muestra requerida para el análisis es inferior (Su, Rowley y Balazs, 2002). La detección mediante MS requiere la ionización de los analitos en la fuente de ionización, que después se separan en función de su masa en relación con la carga ( $m/z$ ) en el analizador de masas, para finalmente detectarse por niveles de abundancia en el detector (Mercadante, 2008).

## Crterios mnimos para la identificacin de carotenoides

Segn Schiedt y Liaaen-Jensen (1995), hay tres criterios mnimos que deben cumplirse para que la asignacin de un pico cromatogrfico a un pigmento carotenode sea razonable:

a) el espectro de absorcin del compuesto ( $\lambda_{\max}$  y su estructura fina en al menos dos disolventes) debe estar en conformidad con el cromforo sugerido; b) las propiedades cromatogrficas deben ser idnticas en dos sistemas diferentes, de preferencia TLC ( $R_f$ ) y HPLC ( $t_R$ ). Los datos deben complementarse con la co-cromatografa del pigmento de inters con su correspondiente estandar; c) el espectro de masas se debe obtener a fin de permitir al menos la identificacin del peso molecular.

Si alguno de estos criterios no se cumple, la identificacin debe considerarse como tentativa.

## Obtencin de patrones

Los patrones de carotenoides se aislan en general de fuentes naturales documentadas para cada carotenode individual, mediante un procedimiento de extraccin adecuado con disolventes orgnicos seguido de su cristalizacin para obtener altos niveles de pureza. Hay casos en los que es necesario el empleo de cromatografa (TLC y OCC) para purificar el patrón a obtener. Como fuentes naturales ms comnmente utilizadas se pueden citar: para la extraccin de violaxantina y luteína, hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*); patata o papa (*Solanum tuberosum*) para la obtencin de anteraxantina;  $\beta$ -criptoxantina se puede aislar del fruto de papaya (*Carica papaya*) o de la mandarina (*Citrus reticulata*); capsantina y capsorrubina

del pimiento rojo (*Capsicum annuum*);  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno de la zanahoria (*Daucus carota*); licopeno del tomate (*Solanum lycopersicum*) y bixina y norbixina de semillas de bija (*Bixa orellana*) (Mercadante, 2008). Para la extraccin y purificacin de stos y otros carotenoides se recomienda consultar los procedimientos descritos en Britton (1995) y Rodrguez-Amaya (2001). Algunos carotenoides se obtienen con frecuencia por sntesis parcial de carotenoides parecidos estructuralmente mediante reacciones de derivatizacin de grupos funcionales (seccin 2.1.2), como es el caso de auroxantina y luteoxantina, que se obtienen de violaxantina por acidificacin. Se pueden obtener distintos ismeros geomtricos por calentamiento de un carotenode determinado (Mnguez-Mosquera, Hornero-Mndez y Pérez-Gálvez, 2002).

## Crterios para la cuantificacin de carotenoides. Muestras con contenido carotenode certificado

La cuantificacin de carotenoides en los extractos de diversa procedencia se realiza mediante calibracin interna o externa. En ambos casos es necesario usar estndares de referencia y determinar la concentracin exacta que se utiliza para construir la recta de calibracin, tanto para cada pigmento de inters respecto del estandar utilizado de referencia interna, en el primer caso, como para cada pigmento que aparezca en el extracto cuando se utiliza el procedimiento de calibracin externa para la cuantificacin. Khachik *et al.* (1992) indican varios criterios para evaluar la validez del procedimiento de calibracin: coeficiente de correlacin de la recta o rectas de calibrado superior a 0.9, intercepcin de la recta lo ms prxima a cero y desviacin estandar relativa inferior a 5%. La recta de calibrado debe representar el margen de concentracin de los carotenoides en la muestra a analizar

y la obtención de los valores de área/respuesta se revisarán minuciosamente para evitar errores en la cuantificación procedentes de solapamiento de picos o por una escasa resolución de la señal en el detector. Cuando se escoge como procedimiento de cuantificación la calibración interna, se utiliza un estándar de referencia que no esté presente en el perfil carotenoide de la muestra (en el caso de que se utilice un pigmento carotenoide) determinando previamente sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas. Este compuesto se añade, de preferencia, al inicio del proceso de extracción de forma que experimentará pérdidas equivalentes al resto del perfil carotenoide de la muestra, por lo que este efecto del proceso se compensará ya que la cantidad de estándar interno que se añade será conocida y a ésta se referirán todos los cálculos de cuantificación posteriores. Los materiales de referencia certificados (CRM) son muestras que contienen una concentración certificada de una o varias sustancias. Estos materiales son proporcionados por organismos reconocidos y se utilizan para determinar la exactitud de un procedimiento de análisis cuantitativo durante su validación. El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) es el único organismo que proporciona CRM para la cuantificación de carotenoides, y en la actualidad cuenta con tres muestras CRM diferentes, de origen alimentario y biológico, que contienen estos pigmentos: puré de espinaca procesada (SRM 2385, NIST 2012a), metabolitos en el plasma humano (SRM 1950, NIST 2012b), y suero humano que contiene una mezcla de vitaminas liposolubles, carotenoides y colesterol (SEM 968e, NIST 2012b). El puré de espinacas procesado proporciona concentraciones certificadas de luteína y  $\beta$ -caroteno, con valores de incertidumbre de 20% y 15% para estos carotenoides, respectivamente. Con la muestra CRM de metabolitos en el plasma humano se proporcionan valores para un mayor número de carotenoides: luteína, zeaxantina,

$\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno. En este caso los valores de incertidumbre para los carotenoides van desde 5.2% de  $\beta$ -caroteno hasta 33% de luteína. El CRM de suero humano tiene las concentraciones de referencia de 8 de acuerdo con la densidad del suero de carotenoides (tres densidades diferentes): luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\alpha$ -caroteno. El alto costo de los CRM y los altos niveles de incertidumbre de los carotenoides en CRM disponibles son la razón del poco uso de este tipo de material en el análisis cuantitativo de carotenoides.

## EJEMPLOS DE APLICACIONES

### Métodos HPLC en frutas y verduras

La tabla 1 recoge algunos ejemplos de métodos de separación por HPLC de carotenoides presentes en frutas y verduras. El perfil de carotenoides de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.), una fruta típica de Brasil, lo determinaron De Rosso y Mercadante (2005) usando una columna  $C_{18}$  Nova-Pak. Fueron separados e identificados 14 carotenoides diferentes, incluyendo carotenos, xantofilas y sus derivados epoxi. Luteína, anteraxantina,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina se encontraron como los carotenoides más representativos en tres variedades de aceituna (Arbequina, Picual y Hojiblanca; Roca y Mínguez-Mosquera, 2003). La separación y la identificación de estos pigmentos también se realizó en un sistema de HPLC-DAD con  $C_{18}$ . Breithaupt y Bamedi (2002) emplearon columnas de fase reversa  $C_{18}$  y  $C_{30}$  en dos sistemas diferentes de elución para separar e identificar los ésteres de carotenoides de patata (*Solanum tuberosum* L.). Violaxantina, luteína y zeaxantina estaban presentes tanto en forma libre como en forma de ésteres de ácidos palmítico y mirístico, y además se identificó

**TABLA 1.** Ejemplos de metodologías para la separación por HPLC de carotenoides en frutas y verduras.

Características de la columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Carotenoides determinados	Método de detección	Referencia
C <sub>18</sub> Nova-pak 300 × 4,0 mm, 4 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyentes: acetonitrilo/acetato de etilo/agua. Gradiente: 88:2:10 para 85:15:0 en 15 min, manteniendo por 30 min. Flujo: 1 mL/min. Temperatura de la columna: 29 °C.	Acerola ( <i>Malpighia punicifolia</i> L.)	Neocromo+neoxantina, violaxantina, luteoxantina, luteína, zeaxantina, 5,6,5',6'-diepoxi-β-criptoxantina, 5,6-epoxi-β-criptoxantina, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, zeinoxantina, β-criptoxantina, 5,6,5',6'-diepoxi-β-caroteno, 5,8-epoxi-β-caroteno, α- e β-caroteno.	DAD	De Rosso y Mercadante (2005).
C <sub>18</sub> Spherisorb ODS-2 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: agua/reactivo ion par/metanol (1:1:8). Reactivo ion par: 0,05 mmol/L acetato tetrabutilamonio y 1 mol/L acetato de amonio en agua. Eluyente B: acetona/metanol (1:1). Gradiente: De 75% de A y 25% de B para 25% de A y 75% de B en 8 min, manteniendo por 2 min, 10% de A y 90% de B a los 18 min, 100% de B en 23 min, volviendo a 75% de A y 25% de B a los 30 min. Flujo 2 mL/min.	Aceitunas ( <i>Olea europea</i> L.) var. Hojiblanca, Arbequina e Picual	Luteína, anteraxantina, β-caroteno, neoxantina e violaxantina	DAD	Roca y Mínguez-Mosquera (2003).
C <sub>30</sub> YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: C <sub>18</sub> Nucleosil 10 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: gradiente. <b>SISTEMA I</b> Eluyente A: metanol/agua/trietilamina (90:10:0,1). Eluyente B: metanol/MTBE/agua/trietilamina (6:90:4:0,1). Gradiente: 99% de A de 0 a 8 min, 0% de A a los 45 min y 99% de A a los 50 min, manteniendo por 5 min. Flujo 1 mL/min Temperatura de la columna: 35 °C <b>SISTEMA II</b> Eluyente A: metanol/MTBE/agua/trietilamina (81:15:4:0,1) Eluyente B: metanol/MTBE/agua/trietilamina (6:90:4:0,1)	Patatas ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	Violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, todo <i>trans</i> -β-caroteno, violaxantina dimiristato, violaxantina miristato-palmitato, luteína dimiristato, zeaxantina dimiristato, luteína miristato-palmitato.	DAD-MS (APCI modo positivo, cuadrupolo)	Breithaupt y Bamedi (2002)

	<p>Gradiente: 99% de A en 0 min, 44% de A en 39 min, 0% de A en 45 min y 99% de A a los 50 min, manteniendo por 5 min.  Flujo 1 mL/min  Temperatura de la columna: 35 °C</p>				
<p>C<sub>30</sub>  YMC  250 × 4,6 mm,  5 µm  Pre-columna:  no se aplica</p>	<p>Modo de elución: gradiente.  Eluyentes: metanol/MTBE/agua (0,1% BHT y 0,05% TEA en los disolventes orgánicos)  Gradiente: 90:5:5 en 0 min, 95:5:0 en 12 min, 89:11:0 en 25 min, 75:25:0 en 40 min, 50:50:0 en 60 min, 90:5:5 en 62 min.  Flujo 1 mL/min.</p>	<p>Zumo de naranja concentrado</p>	<p>Luteoxantina, <i>cis</i>-auroxantina, auroxantina A, auroxantina B, anteraxantina, <i>cis</i>-luteoxantina, auroxantina C, <i>cis</i>-luteoxantina, mutatoxantina epímero A, luteína, mutatoxantina epímero B, zeaxantina, 9-<i>cis</i>-o 9'-<i>cis</i>-anteraxantina, 13-<i>cis</i>-o 13'-<i>cis</i>-β-criptoxantina, zeinoxantina, 9-<i>cis</i>-zeaxantina, β-criptoxantina, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, <i>cis</i>-ζ-caroteno, α-caroteno, β-caroteno, ζ-caroteno.</p>	<p>DAD</p>	<p>Meléndez-Martínez <i>et al.</i> (2008)</p>
<p>C<sub>30</sub>  YMC  250 × 4,6 mm,  5 µm  Pre-columna:  no se aplica</p>	<p>Modo de elución: gradiente.  Eluyente: metanol/MTBE/agua.  Gradiente: De 81:15:4 en 0 min hacia 6:90:4 en 90 min  Flujo 1 mL/min  Temperatura de la columna: 25 °C</p>	<p>Pimientas: ají (<i>Capsicum baccatum</i> L.) y rocoto (<i>C. pubescens</i> R. &amp; P.)</p>	<p>Violaxantina, neoxantina, <i>cis</i>-violaxantina, luteoxantina, 5,6-epoxi-capsantina, anteraxantina, <i>cis</i>-capsantina, capsorubina, mutatoxantina, luteína, capsantina, zeaxantina, α-criptoxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno.</p>	<p>DAD-MS (APCI modo positivo, cuadrupolo)</p>	<p>Rodríguez-Burruezo <i>et al.</i> (2010)</p>
<p>C<sub>30</sub>  YMC  250 × 4,6 mm,  5 µm  Pre-columna:  no se aplica.</p>	<p>Modo de elución: gradiente.  Eluyentes: metanol/éter terc-metilbutilico.  Gradiente: De 95:5 para 70:30 en 30 min, 50:50 por 20 min y manteniendo esa proporción durante 15 min. Flujo 0,9 mL/min. Temperatura de la columna: 29 °C.</p>	<p>Mana-cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i>)</p>	<p>9'-<i>cis</i>-neoxantina, todo-<i>trans</i>-violaxantina, todo-<i>trans</i>-luteoxantina, 9-<i>cis</i>-violaxantina, 9-<i>cis</i>-luteoxantina, todo-<i>trans</i>-luteína, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, todo-<i>trans</i>-zeinoxantina, todo-<i>trans</i>-β-criptoxantina, 15-<i>cis</i>-β-caroteno, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, todo-<i>trans</i>-α-caroteno, todo-<i>trans</i>-β-caroteno, 9-<i>cis</i>-β-caroteno.</p>	<p>DAD-MS (APCI modo positivo, <i>ion trap</i>)</p>	<p>Rodrigues <i>et al.</i> (2013)</p>

C <sub>30</sub> YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Pre-columna: no se aplica.	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: metanol/MTBE/agua (81:17:2). Eluyente B: metanol/MTBE/agua (10:88:2). Gradiente: 0% de B de 0 a 24 min, 100% de B a los 140 min, 0% de B a los 141 min. Flujo 0,8 mL/min.	Frutas tropicales: Corozo ( <i>Aiphane- saculeate</i> ), Sastra ( <i>Garcinia intermedia</i> ), Sapote ( <i>Quararibea cordata</i> ), Frutita ( <i>Allophylus- psilospermus</i> ), Maracuya chino ( <i>Cionosicyos- macranthus</i> ), y Mamey rojo ( <i>Pouteria- sapota</i> )	Luteína, zeaxantina, 13- <i>cis</i> - 13'- <i>cis</i> -β-criptoxantina, β-criptoxantina, 13- <i>cis</i> - β-caroteno, ζ-caroteno, α-caroteno, zeaxantina monocaprato, 13- <i>cis</i> - 13'- <i>cis</i> -β-criptoxantina monolaurato, β-caroteno, zeaxantina monolaurato, β- criptoxantina monocaprilato, β-criptoxantina monocaprato, zeaxantina monopalmitato, zeaxantina dicaprato, β-criptoxantina monolaurato, zeaxantina caprato- laurato, β-criptoxantina monomiristato, zeaxantina dilaurato, β-criptoxantina monopalmitato, zeaxantina laurato-miristato, zeaxantina caprato-palmitato, zeaxantina dimiristato, zeaxantina laurato-palmitato, zeaxantina miristato- palmitato, zeaxantina dipalmitato, licopeno	DAD-MS (APCI modo positivo y negativo, cuadrupolo)	Murillo <i>et al.</i> (2013)
--	--	--	--	--	------------------------------------

la presencia de anteraxantina y β-criptoxantina. Meléndez-Martínez *et al.* (2008) separaron, entre otros carotenoides, isómeros geométricos de auroxantina, luteoxantina, anteraxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, β-caroteno, ζ-caroteno mediante el empleo de elución en fase reversa C<sub>30</sub>. El perfil de carotenoides de frutos de *Capsicum* se evaluó mediante una columna C<sub>30</sub> (Rodríguez-Burruezo, González-Mas y Nuez, 2010) y se constató la presencia de los pigmentos característicos de este género, capsantina y capsorrubina.

Rodríguez, Mariutti y Mercadante (2013) determinaron un gran número de carotenoides de maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum*) como 9'-*cis*-neoxantina, violaxantina e isómeros, luteoxantina e isómeros, luteína, 5,8-epoxi-β-criptoxantina, zeinoxantina, β-criptoxantina, 15-*cis*-β-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno, α-caroteno, β-caroteno y 9-*cis*-β caroteno. En la contribución de Murillo *et al.* (2013) se identificaron y separaron con éxito más de 30 carotenoides en forma libre, mono- y diesterificada en frutas tropicales mediante HPLC-DAD-MS en fase reversa.

**TABLA 2.** Ejemplos de metodologías para la separación por HPLC de carotenoides en muestras de tejidos biológicos

Características de la columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Carotenoides determinados	Método de detección	Referencia
<p><b>SISTEMA 1</b></p> <p>Fase reversa</p> <p>C<sub>18</sub></p> <p>Microsorb</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>Spheri-5-C<sub>18</sub>,</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Fase normal</p> <p>Silica-based nitrile-bonded</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>nitrile-bonded</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p><b>SISTEMA 2</b></p> <p>Fase reversa</p> <p>C<sub>18</sub></p> <p>Microsorb</p> <p>250 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p> <p>Precolumna:</p> <p>Spheri-5-C<sub>18</sub>,</p> <p>30 × 4,6 mm,</p> <p>5 μm</p>	<p><b>SISTEMA 1</b></p> <p>Fase reversa</p> <p>Modo de elución: gradiente</p> <p>Eluyente: acetonitrilo/metanol/diclorometano/hexano.</p> <p>85:10:2,5,2,5 de 0 a 10 min, alcanzando la proporción 45:22,5:22,5:10 en los 40 min.</p> <p>Flujo 0,7 mL/min.</p> <p>Fase normal</p> <p>Modo de elución: isocrático.</p> <p>Eluyente: hexano/diclorometano/metanol/N,N'-diisopropiletilamina</p> <p>74,65:25:0,25:0,10</p> <p>Flujo 0,7 mL/min.</p> <p><b>SISTEMA 2</b></p> <p>Fase reversa</p> <p>Modo de elución: gradiente</p> <p>Eluyente A: acetonitrilo/acetato (9:1)</p> <p>Eluyente B: hexano/diclorometano/metanol/N,N'-diisopropiletilamina 95% de A y 5% de B en 0 min, mantenimiento hasta 10 min, gradiente linear alcanzando 45% de A y 55% de B en 30 min.</p> <p>Flujo 0,7 mL/min</p> <p>Temperatura de la columna 25 °C</p>	<p>Suero humano y leche materna</p>	<p>ε,ε-caroteno-3,3'-diona, 3'-hidroxi-ε,ε-caroten-3-ona, 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, 3-hidroxi-β-ε-caroten-3'-ona, <i>cis</i>-3-hidroxi-β-ε-caroten-3'-ona, lactucaxantina, 13-<i>cis</i>-13'-<i>cis</i>-3<i>R</i>, 3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, todo-<i>trans</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, todo-<i>trans</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>-zeaxantina, todo-<i>trans</i>-3'-epiluteína, 9-<i>cis</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 9'-<i>cis</i>-3<i>R</i>,3'<i>R</i>,6'<i>R</i>-luteína, 13-<i>cis</i>-luteína + 13'-<i>cis</i>-luteína, 9-<i>cis</i>-zeaxantina, 13-<i>cis</i>-zeaxantina, 15-<i>cis</i>-zeaxantina, 3<i>R</i>,6'<i>R</i>-3-hidroxi-3',4'-didehidro-β-γ-caroteno, 2',3'-anhidroluteína, α-criptoxantina, β-criptoxantina, <i>cis</i>-β-criptoxantina, licopeno, <i>cis</i>-licopeno, neurosporeno, γ-caroteno, ζ-caroteno, α-caroteno, todo-<i>trans</i>-β-caroteno, 9-<i>cis</i>-β-caroteno, 13-<i>cis</i>-β-caroteno, todo-<i>trans</i>-fitoflueno, <i>cis</i>-fitoflueno, fitoeno</p>	<p>DAD-MS (ECNI)</p>	<p>Khachik <i>et al.</i>, 1997</p>

Microsorb-MV silica based nitrile- bond 250 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: isocrático Eluyente: hexano/ diclorometano/metanol/ N,N'-diisopropiletilamina 80:19,4:0.5:0,1 Flujo 1 mL/min	Mácula humana y retina periférica	Luteína, zeaxantina	DAD	Yemelyanov <i>et al.</i> , 2001
C <sub>18</sub> Nucleosil 150 × 4,6 mm, 3 μm Precolumna: C <sub>18</sub> , Vydac 250 × 4,6 mm, 5 μm y C <sub>18</sub> , Hypersil 20 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: isocrático. Eluyente: acetonitrilo/metanol (50 mM acetato de amonio)/ agua/diclorometano 70:15:5:10 Flujo 2 mL/min	Plasma humano	Astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, equinona, todo- <i>trans</i> -licopeno, cis-licopeno, α-caroteno, todo- <i>trans</i> -β-caroteno, 9- <i>cis</i> -β- caroteno, 13- <i>cis</i> -β-caroteno	DAD	Lyan <i>et al.</i> , 2001
C <sub>30</sub> YMC 250 × 4,6 mm, 5 μm Precolumna: C <sub>30</sub> YMC, 10 × 4,6 mm Sumichiral OA-2000 YMC con grupo 3,5-dinitrobenzoil ligado 250 × 4,6 mm, 5 μm	Modo de elución: gradiente. Eluyente: MTBE/metanol/agua Gradiente: De 15:81:4 en 0 min hacia 74,9:21,1:4 en 70 min Flujo 1 mL/min Modo de elución: isocrático Eluyente: <i>n</i> -heptano/ diclorometano/2-propanol (70:25:5) Flujo 1 mL/min	Salmon salvaje ( <i>Oncor- hynchus</i> spp.) y salmon de piscifac- toría ( <i>Salmo salar</i> ), plasma humano	3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> -astaxantina, 3 <i>R</i> ,3' <i>S</i> - astaxantina, 3 <i>S</i> ,3' <i>S</i> -astaxantina	DAD	Rüfer <i>et al.</i> , 2008
C <sub>30</sub> YMC 150 × 4,6 mm, 3 μm	Modo de elución: gradiente Eluyente: metanol (0.1% acetato de amonio)/MTBE Gradiente: 100% de metanol en 0 min, 85% de metanol en 45 min, 40% de metanol en 55 min, 30% de metanol en 60 min, manteniendo por 5 min, luego volviendo a 100% de metanol en 70 min	Plasma humano, pulmón de hurones	<i>Cis</i> -fitoeno, 15- <i>cis</i> -fitoeno, todo- <i>trans</i> -fitoeno, fitoflueno e isómeros, todo- <i>trans</i> -fitoflueno, di- <i>cis</i> -luteína, 15- <i>cis</i> -luteína, di- <i>cis</i> -zeaxantina, 13- <i>cis</i> -luteína, 13- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> - luteína, 15- <i>cis</i> -zeaxantina, 9- <i>cis</i> - luteína, di- <i>cis</i> -β-criptoxantina, 15- <i>cis</i> -β-criptoxantina, 9- <i>cis</i> - luteína, 13- <i>cis</i> -β-criptoxantina,	DAD	Meléndez-Martínez <i>et al.</i> , 2013

			13'- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina, 9- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> - $\beta$ -criptoxantina, 13- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno, 9- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina, 13'- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno, 9'- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina, 15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, todo- <i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno, 9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno, 9'- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno, todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno, 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, isómeros di- <i>cis</i> de licopeno, 15- <i>cis</i> -licopeno, 9- <i>cis</i> -licopeno, todo- <i>trans</i> -licopeno, 5- <i>cis</i> -licopeno		
C <sub>30</sub> YMC 150 x 2,0 mm, 5 $\mu$ m	Modo de elución: gradiente. Eluyente A: metanol acetato de amonio 1M (98:2) Eluyente B: Acetato de etilo Gradiente: 100% de A en 0 min, 80% de A en 6 min, manteniendo esta proporción hasta 8 min, volviendo a 100% de A en 11 min Flujo 0.37 mL/min.	Leche materna, formula infantil y células Caco-2	13- <i>cis</i> -luteína, 13'- <i>cis</i> -luteína, todo- <i>trans</i> -luteína, 13- <i>cis</i> -zeaxantina, todo- <i>trans</i> -zeaxantina, 9- <i>cis</i> -luteína, 9'- <i>cis</i> -luteína, $\alpha$ -criptoxantina, 9- <i>cis</i> -zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina, 15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, $\alpha$ -caroteno, todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno, 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno, $\gamma$ -caroteno, <i>cis</i> -licopeno, todo- <i>trans</i> -licopeno, 5- <i>cis</i> -licopeno	DAD	Lipkie <i>et al.</i> , 2014

### Métodos HPLC en plasma y tejidos de origen animal

La tabla 2 incluye diferentes métodos para la determinación de carotenoides en plasma y tejidos de animales por HPLC. Khachik *et al.* (1997) identificaron 34 carotenoides, incluyendo trece isómeros geométricos y ocho metabolitos en muestras de leche y suero de madres lactantes: Para ello utilizaron HPLC (un sistema en fase normal y otro en fase reversa) y detección por MS y DAD. Luteína y zeaxantina se determinaron en muestras de retina utilizando un sistema de HPLC-DAD con la columna de sílice de fase normal (Yemelyanov, Katz

y Bernstein, 2001). Se han identificado trece carotenoides en muestras de plasma humano mediante separación en columna C<sub>18</sub>. Entre los pigmentos carotenoides identificados se separaron los isómeros *cis* y *trans* de  $\beta$ -caroteno (Lyan *et al.*, 2001). Rüfer *et al.* (2008) emplearon un procedimiento de separación en fase reversa y columna quiral para separar los isómeros ópticos de astaxantina en la carne de salmón y plasma humano y pulmón de hurones. Un método para la determinación de carotenoides en hurones, plasma y pulmón humano fue desarrollado por Meléndez-Martínez *et al.* (2013), utilizando diferentes gradientes de elución con metanol/ MTBE y una columna C<sub>30</sub> para llegar a separar hasta 39

carotenoides. En un estudio sobre bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides presentes en la leche materna y fórmulas infantiles, los extractos se analizaron por HPLC en fase reversa mediante una columna C<sub>30</sub> (Lipkie *et al.*, 2014).

## Métodos de UPLC

El desarrollo de columnas cromatográficas con tamaños de partícula menores a los tradicionales (3 o 5 micras) ha posibilitado la aparición de técnicas cromatográficas muy rápidas, como la cromatografía líquida de rápida resolución (*rapid resolution liquid chromatography*, RRLC) o la cromatografía líquida de ultra-resolución (*ultraperformance liquid chromatography*, UPLC). A veces se habla de cromatografía líquida de resolución ultra alta (*ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). Una de las mayores diferencias entre UPLC y HPLC es el tamaño de partícula de las columnas, que en el caso de la primera es inferior a 2 µm. En UPLC se opera a presiones considerablemente mayores, si bien se pueden conseguir análisis más rápidos (al ser posible disminuir los tiempos de retención), picos más estrechos (con lo que se mejora la relación señal-ruido) y mayor sensibilidad (Rivera y Canela-Garayoa, 2012)

Granado-Lorencio *et al.* (2010) compararon HPLC vs. UPLC para la determinación simultánea de biomarcadores del estado nutricional (vitaminas A, E, D y carotenoides individuales) y analizaron algunas de las diferencias significativas entre ambas técnicas (tabla 3). Así, el volumen de inyección puede ser del orden de diez veces menor en UPLC. Además el tiempo del análisis cromatográfico es menor, lo que se traduce a su vez en una reducción de la cantidad de disolvente empleada en cada muestra. Este ahorro es asimismo importante en términos

**TABLA 3.** Comparación UPLC vs HPLC

Características	UPLC	HPLC
Volumen de inyección	1 µL	10 µL
Flujo	0,5 mL/min	1,8 mL/min
Tiempo de análisis	4,5 min	30 min
Volumen fase móvil/análisis	< 2,5 mL	55 mL
Rendimiento (análisis/7,5 h)	Hasta 90 /día	Hasta 15/día
Volumen fase móvil	2,5 L	56 L

**Fuente:** Elaboración propia con base en Granado *et al.* (2010).

económicos, medioambientales y de productividad, ya que el número de muestras que se pueden analizar en una jornada de trabajo aumenta considerablemente.

A pesar de estas evidentes ventajas, hay que considerar que el análisis de carotenoides es particularmente complejo. Por ejemplo, en muchos casos se requieren columnas C<sub>30</sub> para conseguir una separación óptima de los carotenoides de interés, en especial de isómeros geométricos y ópticos. En este sentido, en un trabajo reciente se ha puesto de manifiesto que, dado que aún no existen columnas C<sub>30</sub> para UPLC, el uso de esta técnica para carotenoides está en muchos casos limitado (Bijttebier *et al.*, 2014).

Es necesario por lo tanto conocer los pros y los contras de estas técnicas rápidas de cromatografía líquida para decidir si son o no apropiadas para el objetivo del análisis. En la tabla 7 se resumen las características de algunos métodos de RRLC y UPLC usados para el análisis de carotenoides, algunos de los cuales se comentan con más detalle a continuación.

Stinco *et al.* (2014) desarrollaron un método de extracción (con y sin saponificación) y posterior separación mediante UPLC para el *screening* de isoprenoides (carotenoides, clorofilas y tocoferoles) en frutas y verduras. Mediante este método se pueden determinar de manera simultánea carotenoides típicos de la dieta (como violaxantina, luteína,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno, fitoeno y fitoflueno), cuatro tocoferoles y algunos pigmentos clorofílicos (clorofilas y feofitinas); la duración del análisis cromatográfico es de tan

sólo doce minutos. Para los análisis se usó una columna  $C_{18}$  Poroshell 120 (2,7  $\mu$ m, 5 cm x 4,6 mm; Agilent, Palo Alto) cuya temperatura se mantuvo a 28 °C. El volumen de inyección de muestra osciló entre 10-20  $\mu$ L y el flujo fue de 1 mL/min. En la fase móvil se usaron tres disolventes, concretamente acetonitrilo (A), metanol (B) y acetato de etilo (C), de acuerdo con el siguiente gradiente: 0 min: 85% A+15% B; 5 min: 60% A+20% B+20% C; 7 min: 60% A+20% B+20% C; 9 min: 85% A+15% B; 12 min: 85% A+ 15% B.

**TABLA 4.** Características de algunos métodos de RRLC y UPLC aplicados al análisis de carotenoides

Referencia	Método	V.I. ( $\mu$ L) <sup>a</sup>	Flujo (mL/min)	T.A. (min) <sup>b</sup>	Columna	T.C. (°C) <sup>c</sup>
Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2010	UPLC	1	0,5	4,5	HSS T3 column (2,1 x 100 mm; 1,8 $\mu$ m)	35
Hongyan Li <i>et al.</i> , 2011	UPLC	3	0,3	18	Phenomenex® Kinetex $C_{18}$ (100 x 2,1 mm; 1,7 $\mu$ m)	30
Bohoyo-Gil <i>et al.</i> , 2012	UPLC	1,4	0,3	10	Zorbax Eclipse Plus $C_{18}$ (2,1 x 50 mm; 1,8 $\mu$ m)	28
Rivera <i>et al.</i> , 2011	UPLC		0,4	15	ACQUITY UPLC®BEH 130 Å $C_{18}$ (2,1 x 100 mm; 1,7 $\mu$ m)	32
Stinco <i>et al.</i> , 2014	RRLC	10 a 20	1	12	$C_{18}$ Poroshel 120 (5 cm x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m)	28
Delpino-Rius <i>et al.</i> , 2014	UPLC	5	0-6,5 min: 0,5	17	ACQUITY UPLC®BEH $C_{18}$ (2,1 x 100 mm; 1,7 $\mu$ m)	32
			6,5-13,6 min: 0,7 13,6-16,6 min: 0,5			
Bijttebier <i>et al.</i> , 2014	UPLC	1,25	0,5	23	ACQUITY UPLC BEH $C_{18}$ (2,1 x 100; 1,7 $\mu$ m)	35
Bijttebier <i>et al.</i> , 2014	UPLC	1,25	0,5	23	ACQUITY UPLC HSS $C_{18}$ SB (2,1 x 100; 1,7 $\mu$ m)	35

<sup>a</sup> Volumen de inyección. <sup>b</sup> Tiempo de análisis cromatográfico. <sup>c</sup> Temperatura de la columna.

Li *et al.* (2012) usaron para el análisis de carotenoides de tomates una columna C<sub>18</sub> Phenomenex Kinetex (1.7 µm, 100 x 2,1 mm) y una fase móvil consistente en metanol:MTBE:agua (85:14:5, disolvente A) y metanol:MTBE:agua (90:5:5, disolvente B), de acuerdo con el siguiente gradiente: 0% A a 20% en 3 min. 20% A a 100% desde el minuto seis hasta el minuto quince. El flujo fue de 300 µL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de inyección fue de 3 µL.

Delpino-Rius *et al.* (2014) desarrollaron un método rápido para determinar el perfil de carotenoides de productos a base de frutas. Para la separación de los analitos se usó una columna ACQUITY UPLC TM BEH C<sub>18</sub> (1,7 µm; 2,1 mm x 100 mm) y una fase móvil con dos disolventes: ACN-MeOH (7:3) y H<sub>2</sub>O (100%). El volumen de inyección fue 5 µL y la columna se mantuvo a 32 °C. Con esta metodología se detectaron un total de 27 carotenoides, entre los que se encontraban neoxantina, neocromo A y B, violaxantina, luteoxantina A y B anteraxantina, auroxantina A, B y C, zeaxantina, isómeros de luteína, α- y β-criptoxantina, β-caroteno, ζ-caroteno, fitoeno y fitoflueno.

Bohoyo-Gil *et al.* (2012) optimizaron un método UPLC para el análisis de carotenoides en alimentos. En concreto, describieron la separación de siete carotenoides en menos de 8.5 minutos, realizando una comparación en términos de resolución, selectividad, sensibilidad, tiempo y ahorro de solventes con un método HPLC. Para el análisis por HPLC usaron una columna C<sub>18</sub> Lichrosorb RP-18 (10 µm, 4.6 x 200 mm) y una fase móvil con acetonitrilo:metanol (85:25) (disolvente A) y acetonitrilo:metanol:acetato de etilo (60:20:20) (disolvente B) con 0.1% de BHT y 0.05% de TEA. El flujo fue de 1 mL/min. Para el análisis por UPLC se usó una columna C<sub>18</sub> Zorbax Eclipse Plus (1.8 µm, 2.1 x 50 mm) y una fase móvil con los mismos disolventes usados para el método de HPLC. El flujo 0.3 mL/min.

Con ambas metodologías se obtuvo una correcta resolución de los picos de capsantina, luteína, zeaxantina, criptoxantina y licopeno. No obstante, α- y β-caroteno no se separaron bien por HPLC pero sí por UPLC. Asimismo, observaron cambios en el orden de elución de algunos carotenoides como zeaxantina y luteína entre ambos métodos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (Gobierno de España) mediante el proyecto AGL-2013-42757-R.

## REFERENCIAS

- Albert, K. 1998. *Trends in Analytical Chemistry* 17(10): 648-658.
- Almela, L., López-Roca, J.M. Candela, M.E. y Alcázar, M.D. 1991. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1606-1609.
- Bijttebier, S., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S. y Voorspoels, S. 2014. *Journal of Chromatography A* 1332: 46-56.
- Breithaupt, D.E. y Bamedi, A. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7175-7181.
- Britton, G. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. 1B: Spectroscopy*. Basilea: Birkhauser.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J. y White, W.S. 2004. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 396-403.
- Bohoyo-Gil, D., Dominguez-Valhondo, J., García-Parra, J. y González-Gómez, D. 2012. *European Food Research and Technology* 235: 1055-1061.
- Davies, B.H. 1976. En T.W. Goodwin (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, vol. 2*, Londres: Academic Press.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2005. *Food Research International* 38: 1073-1077.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5062-5072.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L. y Hornero-Méndez, D. 2014. *Food Research International* 65: 272-281.
- Delpino-Rius, A., Eras, J., Marsol-Vall, A., Vilaró, F., Balcells, M. y Canela-Garayoa, R. 2014. *Journal of Chromatography A* 1331: 90-99.
- Epler, K.S., Sander, L.C., Ziegler, R.G., Wise, S.A. y Craft, N.E. 1992. *Journal of Chromatography* 595: 89-101.
- Eugster, C.H. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Fernández, R.X.E., Shier, N.W. y Watkins, B.A. 2000. *Journal of Food Composition and Analysis* 13: 179-187.
- Ferruzzi, M.G., Sander, L.C., Rock, C.L. y Schwartz, S.J. 1998. *Analytical Biochemistry* 256: 74-81.
- Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Sander, L.C., Rock, C.L. y Schwartz, S.J. 2001. *Journal of Chromatography B* 760: 289-299.
- Fiksdahl, A., Mortensen, J.T. y Liaaen-Jensen, S. 1978. *Journal of Chromatography* 157: 111-117.
- Finckh, B., Kontush, A., Commentz, J., Hübner, C., Burdelski, M. y Kohlschütter, A. 1995. *Analytical Biochemistry* 232: 210-216.

## REFERENCIAS

- Franko, M., Van Bovenkamp, P. y Bicanic, D. 1998. *Journal of Chromatography B* 718: 47-54.
- Franko, M. 2001. *Talanta* 54: 1-13.
- Gilmore, A.M. y Yamamoto, H.Y. 1991. *Journal of Chromatography A* 543: 137-145.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martínez, E. y Blanco, I. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 479-489.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I. y Pérez-Sacristán B. 2010. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1389-1393.
- Hermans, N., Cos, P., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J. y Bruyne, T. 2005. *Journal of Chromatography B* 822: 33-39.
- Hongyan, L., Deng, Z., Ronghua, L., Steven, L. y Rong, T. 2012. *Food Chemistry* 132: 508-517.
- Humphries, J.M. y Khachik, F. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1322-1327.
- Inbaraj, B.S., Lu, H., Hung, C.F., Wu, W.B., Lin, C.L. y Chen, B.H. 2008. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 812-818.
- Khachik, F., Beecher, G.R. y Whitaker, N.F. 1986. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 603-616.
- Khachik, F., Spangler, C.J., Smith Jr., J.C., Canfield, L.M., Steck, A. y Pfander, H. 1997. *Analytical Chemistry* 69: 1873-1881.
- Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 5: Nutrition and Health*, Basilea: Birkhauser.
- Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. y Godoy, H.T. 1990. *Food Chemistry* 35 (3): 187-195.
- Kopec, R.E., Cooperstone, J.L., Cichon, M.J. y Schwartz, S.J. 2012. En Z. Xu y L.R. Howard (eds.). *Analysis of Antioxidant-rich Phytochemicals*, Hobeston: John Wiley and Sons Ltd.
- Lee, I., Hamaguchi, H. y Shigeto, S. 2008. *Chemical Physics Letters* 466: 144-147.
- Lietz, G. y Henry, C.J.K. 1997. *Food Chemistry* 60: 109-117.
- Lipkie, T.E., Banavara, D., Shah, B., Morrow, A.L., McMahon, R.J., Jouni, Z.E. y Ferruzzi, M.G. 2014. *Molecular Nutrition and Food Research* 58: 2014-2022.
- Luterotti, S., Franko, M. y Bicanic, D. 1999. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21: 901-909.
- Luterotti, S., Sikovec, M. y Bicanic, D. 2000. *Talanta* 53:103-113.
- Luterotti, S., Franko, M. y Bicanic, D. 2002. *Journal of American Oil Chemists' Society* 79: 1027-1031.

## REFERENCIAS

- Lyan, B., Azaïs-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Alexandre-Goubau, M.C. y Grolier, P. 2001. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 751: 297-303.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. y Mercadante, A.Z. 2012. *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 126-134.
- Mariutti, L.R.B., Pereira, D.M., Mercadante, A.Z., Valentão, P., Teixeira, N. y Andrade, P.B. 2012. *Marine Drugs* 10: 1498-1510.
- Meléndez-Martínez, A., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109: 546-553.
- Meléndez-Martínez, A., Stinco, C.M., Liu, C. y Wang, X.D. 2013. *Food Chemistry* 138: 1341-1350.
- Mercadante, A.Z. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Nueva York: CRC Press.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez, D. 1993. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1616-1620.
- Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Hornero-Méndez, D. y Pérez-Gálvez, A. 2002. En W.J. Hurst (ed.). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, Boca Raton: CRC Press.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A.J. y Mondello, L. 2013. *Food Chemistry* 140: 825-836.
- NIST, National Institute of Standards & Analysis. 2012. Slurried spinach. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 2385*.
- NIST. 2012a. Metabolites in Human Plasma. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 1950*.
- NIST. 2012b. Fat Soluble Vitamins, Carotenoids, and Cholesterol in Human Serum. *Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 968e*.
- Oliver, J., Palou, A. y Pons, A. 1998. *Journal of Chromatography A* 829: 393-399.
- Panfili, G., Fratianni, A. e Irano, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6373-6377.
- Pfander, H. 1995. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Pfander, H. y Riesen, R. 1995. En G. Britton, S. Liaansen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basilea: Birkhauser.
- Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G. y Schwartz, S.J. 2002. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 633-640.

## REFERENCIAS

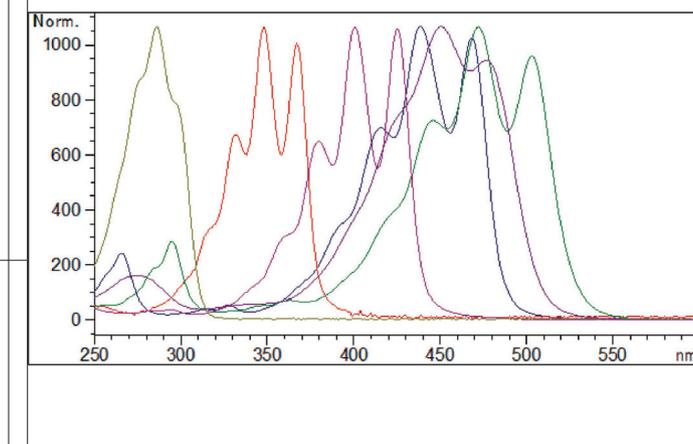
- Rios, A.O. y Mercadante, A.Z. 2004. *Food Additives and Contaminants* 21: 125-133.
- Rivera, S. M. y Canela-Garayoa, R. 2012. *Journal of Chromatography A* 1224:1-10.
- Roca, M. y Mínguez-Mosquera, I. 2003. *Journal of Plant Physiology* 160: 451-459.
- Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B. y Mercadante, A.Z. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3022-3029.
- Rodríguez-Amaya, D. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington, D.C.: International Life Sciences Institute (ILSI) Press.
- Rodríguez-Amaya, D. y Kimura, M. 2004. *Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington, D.C. y Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI)/International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
- Rodríguez-Amaya, D. 2010. *Journal of Food Composition and analysis* 23: 726-740.
- Rodríguez-Burruezo, A., González-Mas, M.C. y Nuez, F. 2010. *Journal of Food Science* 75: S446-S453.
- Rüfer, C.E., Moeseneder, J., Briviba, K., Rechkemmer, G. y Bub, A. 2008. *British Journal of Nutrition* 99: 1048-1054.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Craft, N.E. y Wise, S.A. 1994. *Analytical Chemistry* 66: 1667-1674.
- Santos, W.T.P., Azevedo, E.F., Richter, E.M. y Albuquerque, Y.D.T. 2009. *Química Nova* 32: 2412-2416.
- Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis*, Basilea: Birkhauser.
- Schmitz, H.H., Emenhiser, C. y Schwartz, S.J. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1212-1218.
- Schoefs, B. 2004. *Journal of Chromatography A* 1054:217-226.
- Scott, K.J. 1992. *Food Chemistry* 45: 357-364.
- Stewart, I. y Wheaton, T.A. 1971. *Journal of Chromatography* 55: 325-336.
- Stinco, C.M., Benítez-González, A.M., Hernanz, D., Vicario, I.M. y Meléndez-Martínez, A.J. 2014. *Journal of Chromatography A* 1370: 162-170.
- Su, Q., Rowley, K.G. y Balazs, N.D.H. 2002. *Journal of Chromatography B* 781: 393-418.
- Weston, A. y Brown, P.R. 1997. *HPLC and CE: Principles and practice*. Ámsterdam: Elsevier.
- Xavier, A.A.O., Mercadante, A.Z., Domingos, L.D. y Viotto, W.H. 2012. *Química Nova* 35: 2057-2062.

## REFERENCIAS

- Yemelyanov, A.Y., Katz, N.B. y Bernstein, P.S. 2001.  
*Experimental Eye Research* 72: 381-392.
- Yue, X., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W. y King, J.M. 2006.  
*Journal of Food Science* 71: 239-241.

# IDENTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

Adriana Z. Mercadante



## INTRODUCCIÓN

Se estima que en los alimentos comunes de la dieta pueden encontrarse unos 120 carotenoides con diferentes estructuras y propiedades fisicoquímicas. Las concentraciones de los carotenoides en los alimentos varían mucho; generalmente los principales se encuentran en mayor concentración, junto con otros muchos en menor cantidad o en trazas. Debido a estos hechos es necesario optimizar la separación cromatográfica para cada muestra específica, cuantificar con curvas de calibrado con amplio rango de concentraciones e identificar de forma correcta, lo que es una tarea desafiante y difícil en el caso de los carotenoides minoritarios (Mercadante, 2008).

Actualmente, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la ultra cromatografía líquida de alta eficiencia (UHPLC) son los sistemas más populares y confiables para la separación de carotenoides. Estos sistemas presentan ventajas significativas en términos de resolución de separación, velocidad, sensibilidad y precisión. Además, los



**FIGURA 1.** Tipos de información para la determinación de la estructura química de un carotenoide.

detectores de diodos en línea (DAD) y de espectrometría de masas (MS) se pueden acoplar fácilmente a estos sistemas.

Cuando el análisis es cualitativo, puede usarse una gran cantidad de muestra de alimento y no es preocupante que se pierda material. Por ejemplo, si el objetivo final es el aislamiento de un caroteno en particular, se puede realizar la primera extracción con un disolvente polar (por ejemplo, MeOH o EtOH) para eliminar el agua y, al menos parcialmente, las xantofilas. Después se puede desechar el alcohol y luego extraer los carotenos con un disolvente adecuado menos polar (Nunes y Mercadante, 2004). La identificación de un carotenoide conocido debe basarse, por lo menos, en su comportamiento cromatográfico en dos sistemas diferentes y en sus espectros de absorción en el UV-visible y de masas

(Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995). Se recomienda el uso del término caracterización o identificación tentativa cuando no es posible obtener estos datos mínimos. La determinación de la quiralidad y de la configuración *E/Z* requiere, respectivamente, el uso adicional de dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (NMR). Mediante derivatizaciones químicas puede obtenerse también información muy útil, como se explica en el capítulo 3. Por último, todos los datos obtenidos con las distintas técnicas deben combinarse como piezas de un rompecabezas para obtener la estructura final (figura 1).

## NOCIONES BÁSICAS DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

La radiación electromagnética consiste en un campo eléctrico asociado con un campo de fuerza magnética que se propaga a velocidades altísimas. El espectro electromagnético comprende el intervalo de todas las frecuencias de radiación electromagnética, que se extiende desde las bajas frecuencias de radio hasta la radiación  $\gamma$ , con longitudes de onda de 100 a  $10^{-13}$  metros, respectivamente. Varios esquemas y figuras que ilustran el espectro electromagnético están disponibles en internet, por ejemplo, en [http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic\\_spectrum](http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_spectrum). El espectro electromagnético de un compuesto es la distribución característica de la radiación electromagnética emitida o absorbida por ese compuesto en particular.

Las ondas electromagnéticas pueden describirse por las siguientes propiedades físicas: frecuencia, velocidad y longitud de onda. La energía de los fotones es directamente proporcional a la frecuencia de la longitud de onda, mientras la longitud de onda es inversamente proporcional a la frecuencia

de la onda. Estas relaciones se ilustran en las ecuaciones [1 a 3].

$$c = \lambda \times f \quad [1]$$

$$E = h \times f \quad [2]$$

$$E = h \times c \times \lambda^{-1} \quad [3]$$

donde:  $c$  = velocidad de la energía radiante ( $3 \times 10^8$  m/s en el vacío);  $\lambda$  = longitud de onda (metros);  $f$  = frecuencia (hertzios);  $E$  = energía del fotón (julios);  $h$  = constante de Planck (constante de proporcionalidad),  $6.63 \times 10^{-34}$  (J s).

Cuando la radiación electromagnética atraviesa un compuesto se producen transiciones electrónicas. La energía de la radiación UV-visible puede promover solamente transiciones de electrones de la capa de valencia (electrones en orbitales pi [ $\pi$ ] y de heteroátomos con pares de electrones no compartidos). Así, por ejemplo, compuestos con dos dobles enlaces conjugados absorben a 217 nm (figura 2), y a medida que aumenta el número de dobles enlaces conjugados (d.e.c.), la energía disminuye y, por lo tanto, la longitud de onda aumenta, llegando hasta la región visible (400 nm a 760 nm). La parte de la molécula responsable de la absorción de radiación en las regiones UV y visible se conoce como cromóforo. Este término surgió en la industria de tintes, para referirse a los grupos y conexiones en la molécula que son responsables del color del colorante (véase IUPAC).

En compuestos con enlaces covalentes no conjugados (por ejemplo C-C, C-H) se producen transiciones de electrones en orbitales sigma ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ). Dichos compuestos absorben

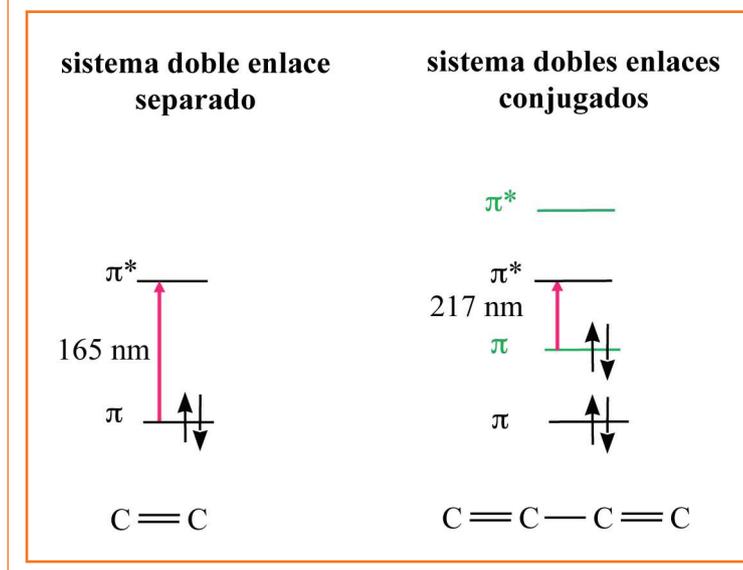


FIGURA 2. Diagrama de los orbitales  $\pi$  en sistemas de dobles enlaces separados y conjugados.

en torno a 130 nm, siendo transparentes en la región del UV-visible; por eso se eligen para ser usados como disolventes.

## NOCIONES BÁSICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) se usa para medir la masa molecular de un compuesto. La masa de un átomo es la suma de las masas de sus partículas, sustrayendo la energía liberada en la formación del núcleo de este átomo. Las masas de las partículas atómicas se recogen en la tabla 1, considerando que la unidad de masa atómica (u) es equivalente a  $1.6605 \times 10^{-27}$  kg (1/12 de la masa del  $^{12}\text{C}$ ). Las masas moleculares exactas son diferentes y únicas para cada

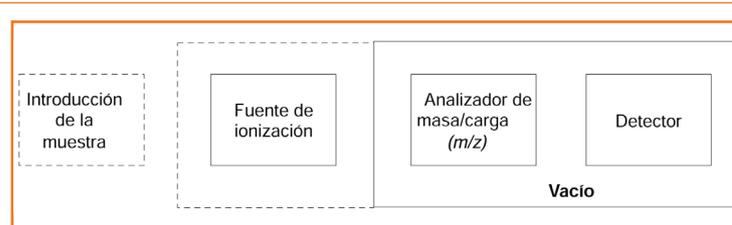
**TABLA 1.** Masa atómica y unidad de masa atómica de las partículas atómicas

Partícula	Masa atómica (kg)	Unidad de masa atómica (u)
Protón	$1.6726 \times 10^{-27}$	1.0073
Neutrón	$1.6749 \times 10^{-27}$	1.0086
Electrón	$9.1093 \times 10^{-31}$	0.0005

Fuente: XXXXXX

compuesto químico, mientras que la masa nominal es la masa redondeada en 1 u. Por ejemplo, considerando la masa nominal, los compuestos  $N_2$ , CO y  $C_2H_4$  poseen la misma masa de 28 u; sin embargo, considerando las masas moleculares exactas, los valores son únicos para cada estructura, con  $N_2 = 28.0061$  u;  $CO = 27.9949$  u y  $C_2H_4 = 28.0313$  u.

Los equipos de espectrometría de masas poseen tres partes fundamentales, a saber, fuente de ionización, analizador



**Figura 3.** Esquema simplificado de los principales componentes de un espectrómetro de masas.

de masa/carga ( $m/z$ ) y detector (figura 3). El analizador y el detector se mantienen siempre en vacío, mientras hay fuentes de ionización que necesitan vacío y otras que operan a presión atmosférica. La muestra tiene que ser introducida en la fuente de ionización del instrumento, ya sea por inyección en flujo (*flow-injection*), cromatografía gaseosa (GC), HPLC, UHPLC o electroforesis capilar (CE). Una vez que la muestra ya está en el interior de la fuente de ionización, se ionizan los compuestos. Los iones formados se dirigen hacia el analizador del espectrómetro de masas, donde se separan de acuerdo con la relación masa/carga ( $m/z$ ). Los iones separados son detectados y esta señal es enviada a un sistema de datos donde las relaciones  $m/z$  se almacenan junto con su abundancia relativa para la obtención del espectro de masas.

Existen muchos métodos de ionización disponibles y cada uno tiene sus propias aplicaciones, ventajas y desventajas. La elección del método de ionización depende esencialmente del peso molecular y de la polaridad de los compuestos presentes en la muestra, así como del analizador de  $m/z$  y del tipo de método de introducción de la muestra. Los métodos más conocidos y utilizados son la ionización por electrones (EI), aplicada típicamente para compuestos apolares y con muy bajo peso molecular, como los compuestos volátiles; la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) usada sobre todo para compuestos apolares o de baja polaridad y bajo peso molecular, como los carotenoides; la ionización por electrospray (ESI), empleada sobre todo para compuestos polares de cualquier peso molecular, como los compuestos fenólicos, y la ionización por desorción-ionización láser asistida por la matriz (*matrix-assisted laser desorption-ionization*, MALDI), recomendada para compuestos de cualquier polaridad y alto peso molecular, como las proteínas. Con la mayoría de los métodos de

ionización, existe la posibilidad de producción de iones cargados positiva o negativamente, dependiendo de la afinidad del compuesto por protones. En la ionización en el modo positivo, que es la más utilizada para carotenoides, se forma la molécula protonada ( $[M+H]^+$ ), mientras que en el modo de ionización negativo se logra la molécula deprotonada ( $[M-H]^-$ ) o el ion molecular ( $[M\bullet]^-$ ). En la actualidad se recomienda que dejen de emplearse los términos ion molecular protonado, ion pseudomolecular e ion casi-molecular (Vessecchi *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2013).

La función principal del analizador de masas es aislar, de acuerdo con la relación  $m/z$ , los iones formados en la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Actualmente hay varios analizadores de masas disponibles, con precios y características muy diferentes, como rango de  $m/z$  que puede ser analizado, precisión de masa y resolución. Los analizadores más conocidos son cuadrupolo (*quadrupole*, Q), tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF) y trampa iónica (*ion trap*, IT). Cuando se usa un analizador sólo el ion precursor (generado en la fuente de ionización) se analiza. En la espectrometría de masas secuencial (*tandem-mass spectrometry*, MS-MS) se combinan diferentes analizadores en un único instrumento. En el MS-MS el ion precursor se selecciona en un analizador, después se fragmenta a alta energía en una región intermedia (célula de choque) y los iones generados se dirigen a otro analizador de  $m/z$  para su separación y el registro de datos. Las combinaciones de MS-MS más utilizadas son triple cuadrupolo (QqQ) o cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). En el caso de la trampa iónica, la espectrometría de masas secuencial ocurre en un mismo analizador. Las ventajas del MS-MS incluyen el aumento de la sensibilidad y la obtención de informaciones estructurales basadas en el patrón de fragmentación.

El detector monitoriza la corriente de iones, la amplifica y luego transmite la señal al sistema de datos. El tipo de detector se determina de acuerdo con el tipo de analizador; los más comunes son la multiplicadora de electrones y la placa de microcanal.

## ESPECTRO UV-VISIBLE DE CAROTENOIDES

### Características generales

Las características generales del espectro de los carotenoides se discuten en el capítulo 1. Las longitudes de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) de muchos carotenoides en diferentes disolventes están disponibles en la literatura (Britton, 1995; Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004); sin embargo, es común encontrar variaciones de 1 a 3 nm en el  $\lambda_{\max}$  para el mismo carotenoide en el mismo disolvente en diferentes

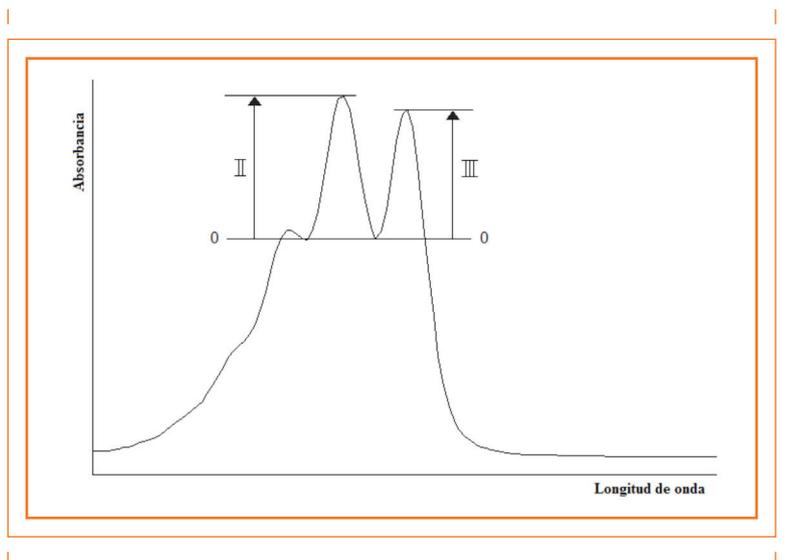
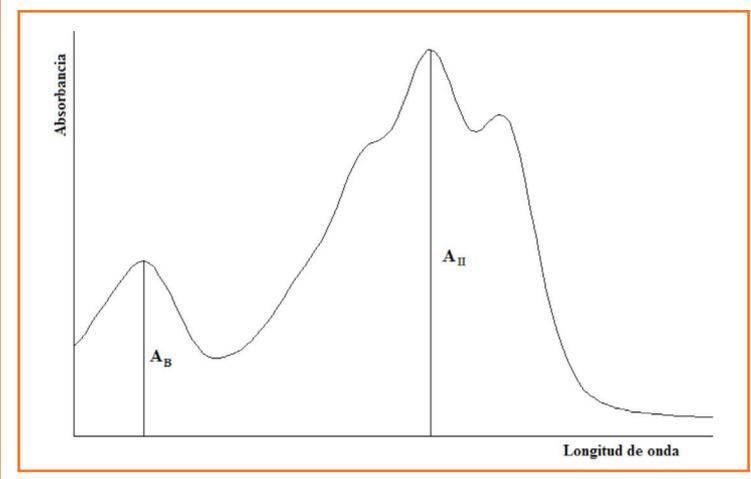


FIGURA 4. Representación de la estructura fina espectral.



**FIGURA 5.** Representación de la intensidad de la banda *cis* del espectro con respecto a la de la banda principal de absorción.

publicaciones. Un espectro UV-visible de buena calidad se puede obtener fácilmente con un espectrofotómetro con 1 a 2  $\mu\text{g}$  de un carotenoide aislado o con algunos ng en un sistema HPLC-DAD. El espectro UV-visible de un carotenoide puede ofrecer información muy útil sobre el cromóforo, grupos funcionales y anillos presentes. Para ello resulta útil, además de considerar las longitudes de onda a la que aparecen los máximos, calcular parámetros como la estructura fina espectral ( $\% \text{ III/II}$ ) y la intensidad del pico *cis* ( $\% A_B/A_{II}$ ) (figuras 4 y 5).

### Efecto del disolvente y de la estructura química

Las características del espectro UV-visible de carotenoides dependen de varios factores:

a) Disolvente: el aumento en el índice de refracción del disolvente produce un desplazamiento batocrómico (a

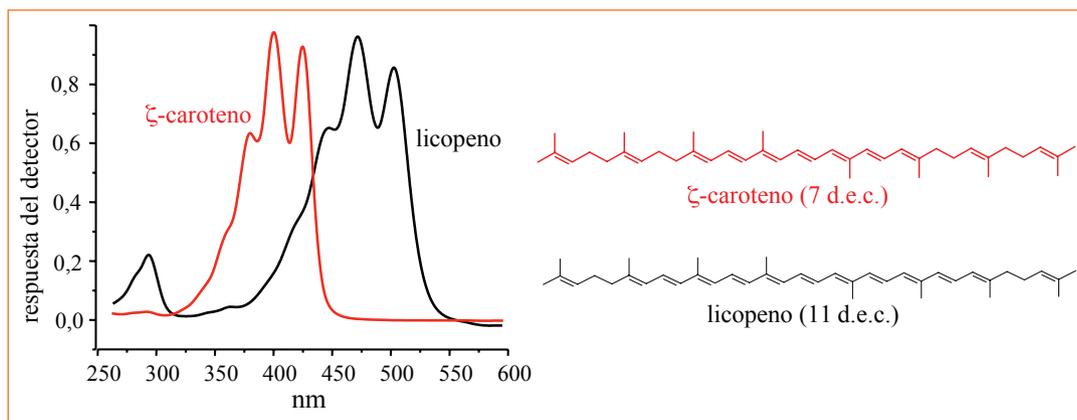
**TABLA 2.** Características del espectro UV-visible en MeOH/MTBE y del espectro de masas de isómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno obtenidas por HPLC-DAD-MS

Carotenoides (número de d.e.c. de la cadena+anillo $\beta$ )*	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	% III/II	% $A_B/A_{II}$	MS y MS-MS ** (m/z)
(15Z)- $\beta$ -caroteno (9+2 $\beta$ )	337, 420, 449, 472	10	61	537, <b>444</b>
(13Z)- $\beta$ -caroteno (9+2 $\beta$ )	338, 420, 444, 470	12	47	537, <b>444</b>
(todo-E)- $\alpha$ -caroteno (9+1 $\beta$ )	420, 445, 473	66	0	537, <b>481, 444</b>
(9Z)- $\alpha$ -caroteno (9+1 $\beta$ )	330, 420, 444, 472	60	9	537, <b>481, 444</b>
(todo-E)- $\beta$ -caroteno (9+2 $\beta$ )	421, 452, 478	25	0	537, <b>444</b>
(9Z)- $\beta$ -caroteno (9+2 $\beta$ )	338, 420, 447, 472	20	18	537, <b>444</b>

**Fuente:** De Rosso y Mercadante (2007). \*Los compuestos se presentan en orden de menor a mayor tiempo de elución en columna  $C_{30}$ .

\*\* Los fragmentos en negrita se detectaron mediante MS-MS.

**FIGURA 6.** Espectros de absorción UV-visible de  $\zeta$ -caroteno y licopeno obtenido por HPLC-DAD en MeOH/MTBE.



longitudes de onda mayores). El aumento de la polaridad del disolvente, por su parte, produce disminución de la estructura fina espectral. Por ejemplo, el licopeno presenta  $\lambda_{\max}$  de 444, 470,502 nm en éter de petróleo y de 458, 484, 518 nm en cloroformo. Por lo tanto, siempre debe indicarse el disolvente utilizado para la obtención del espectro UV-visible, especialmente cuando se obtiene mediante un DAD durante HPLC en gradiente de fase móvil.

b) Número de dobles enlaces conjugados: como ya se ha comentado, a medida que el número de d.e.c. aumenta, la energía necesaria para promover las transiciones de los electrones disminuye y las  $\lambda_{\max}$  aumentan (ecuación 3) (tabla 2). La figura 6 muestra la diferencia de 70 nm en la  $\lambda_{\max}$  de un caroteno lineal con 7 d.e.c. ( $\zeta$ -caroteno) y de otro con 11 d.e.c. (licopeno) en gradiente de MeOH y éter metil-*tert*-butílico (MTBE).

c) Isomería *Z/E*: como se dijo en el capítulo 1 existen importantes diferencias en los espectros de isómeros geométricos de un mismo carotenoide. Así, se produce un

desplazamiento hipsocrómico (a longitudes de onda menores) de 2 a 6 nm del máximo de absorción para isómeros mono-*Z*. Dicho desplazamiento puede llegar a ser de hasta 34 nm para isómeros tetra-*Z*, como el proliscopeno, si bien estos isómeros con cuatro dobles enlaces en configuración *Z* son raros. En los espectros de isómeros *Z* también se observa una disminución en la absorbancia, reducción en la estructura fina espectral y la aparición de una nueva banda de absorción, conocida como pico *cis*, aproximadamente a una longitud de onda 142 nm por debajo de la banda de mayor  $\lambda$  (III). En la figura 7 se observa que la estructura fina (% III/II) disminuye y la %  $A_{\text{B}}/A_{\text{I}}$  aumenta a medida que el doble enlace en configuración *Z* se aproxima al centro de la molécula.

d) Grupo terminal cíclico: algunos grupos terminales (como el  $\epsilon$ , entre otros) no tienen dobles enlaces conjugados con la cadena poliénica (figura 8), por lo que no forman parte del cromóforo y no afectan significativamente el espectro UV-visible. Como ya se comentó en el capítulo 1, el doble enlace del anillo  $\beta$  está conjugado con la cadena poliénica, pero no en el mismo plano. Como consecuencia, se producen impedimentos estéricos

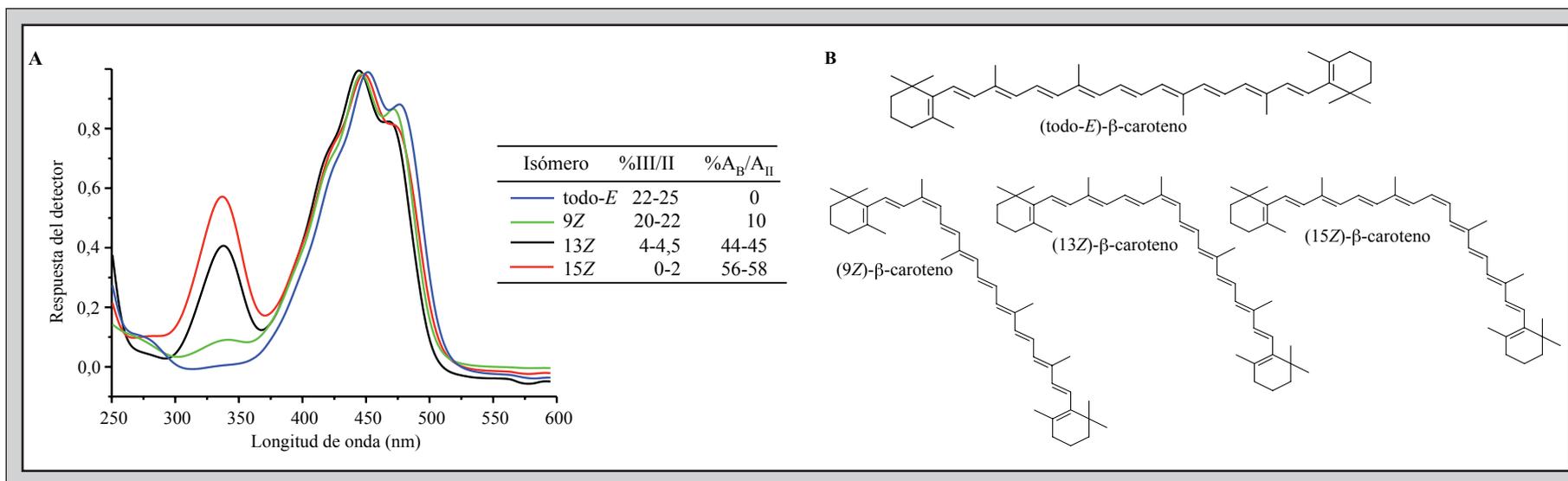


FIGURA 7. Isómeros de  $\beta$ -caroteno. a) Espectros de absorción en el UV-visible, obtenido por HPLC-DAD en MeOH/MTBE, b) Estructuras químicas.

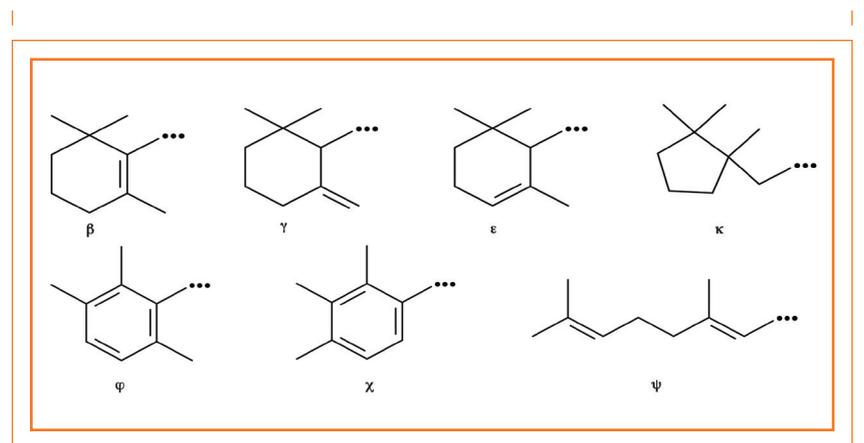
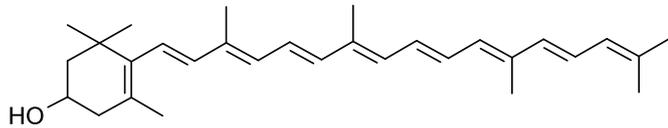


FIGURA 8. Grupos terminales presentes en las moléculas de carotenoides.

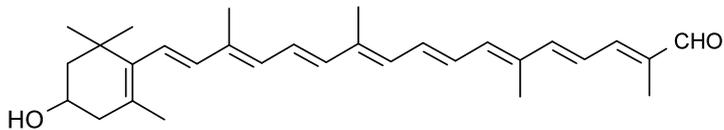
de tal forma que el valor de %III/II disminuye y se produce un desplazamiento hipsocrómico en comparación con el grupo terminal acíclico  $\Psi$  (presente por ejemplo en el licopeno), donde todos los dobles enlaces conjugados son coplanares. Así, por

ejemplo, en MeOH/MTBE, el  $\beta$ -caroteno con 11 d.e.c. (9 en la cadena + 2 en los anillos  $\beta$ ) presenta  $\lambda_{\max}$  a 421, 452, 478 y % III/II = 25, mientras el  $\gamma$ -caroteno, con 10 d.e.c. + 1 en el anillo  $\beta$  posee  $\lambda_{\max}$  a 430, 461, 492 nm y % III/II = 68 y el licopeno, también con 11 d.e.c. en la cadena poliénica, posee  $\lambda_{\max}$  a 446, 472, 503 y % III/II = 75.

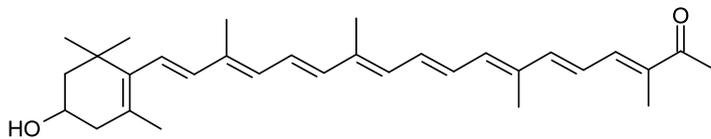
Las características espectrales presentadas en la tabla 2 son muy útiles para diferenciar fácilmente los isómeros *Z* de  $\beta$ -caroteno y de  $\alpha$ -caroteno. A pesar de que el (todo-*E*)- y (9*Z*)- $\alpha$ -caroteno así como el (13*Z*)- $\beta$ -caroteno presentan la misma  $\lambda_{\max}$ , la baja estructura fina espectral de este último ya indica que se trata de un isómero *Z* del  $\beta$ -caroteno y no del  $\alpha$ -caroteno, que posee un anillo  $\epsilon$  y otro  $\beta$ . Independientemente de la localización del enlace en la configuración *Z*, todos los isómeros *Z* de  $\beta$ -caroteno presentaron el pico *cis* a 337-338 nm, mientras que en el (9*Z*)- $\alpha$ -caroteno se observó a 330 nm.

**$\beta$ -citraurinenno (9 d.e.c.)**

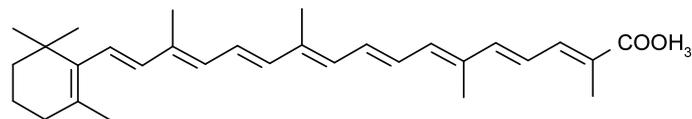
403, 425, 450 (hexano)  
402, 424, 450 (etanol)

 **$\beta$ -citraurina (10 d.e.c.)**

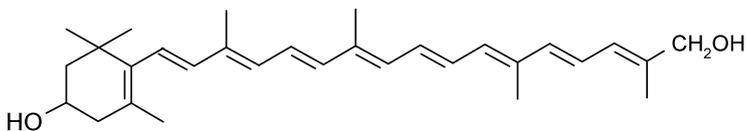
453 (hexano)  
452 (etanol)

**3-hidroxi-sintaxantina (10 d.e.c.)**

446, 474 (hexano)  
(426), 447, (475) (etanol)

**metil- $\beta$ -apo-8-carotenoato (10 d.e.c.)**

(417), 442, 465 (hexano)

 **$\beta$ -citraurinol (9 d.e.c.)**

403, 426, 450 (hexano)

**FIGURA 9.** Estructura química y longitudes de onda de máxima absorción de carotenoides con diferentes grupos químicos terminales. Datos extraídos de G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (2004).

e) Grupo carbonilo: cuando existen grupos carbonilos en conjugación con la cadena poliénica el cromóforo se extiende. Eso resulta en un desplazamiento batocrómico y, en general, en la pérdida de la estructura fina espectral. El grado de desplazamiento y de estructura fina depende de la función química y de la longitud de la cadena poliénica del carotenoide. Por ejemplo, el efecto batocrómico de un ácido carboxílico o éster es menor que el de un aldehído (figura 9).

f) Grupo epóxido: la adición de un grupo epóxido a un doble enlace solamente causa desplazamiento hipsocrómico cuando el doble enlace formaba parte del sistema de d.e.c. La presencia de un grupo 5,6-epóxido en un anillo  $\beta$  provoca una disminución de ca. 6 nm en las  $\lambda_{\text{max}}$  (debido a la "pérdida" de

un d.e.c. en el anillo) y aumento en la estructura fina, mientras que la presencia de un anillo 5,8-epóxido en un anillo  $\beta$  produce un desplazamiento hipsocrómico de 15-20 nm, debido a la "pérdida" de 2 d.e.c. (uno en el anillo  $\beta$  y otro en la cadena poliénica central) (figura 10).

g) Grupo hidroxilo: los grupos hidroxilos tienen poca o ninguna influencia en el espectro UV-visible, como se puede comprobar en la figura 9.

Cabe destacar que cualquier modificación en la estructura química que no provoque cambio en el cromóforo, como adición de grupos funcionales que no estén conjugados con el conjunto de d.e.c., no altera el espectro UV-visible.

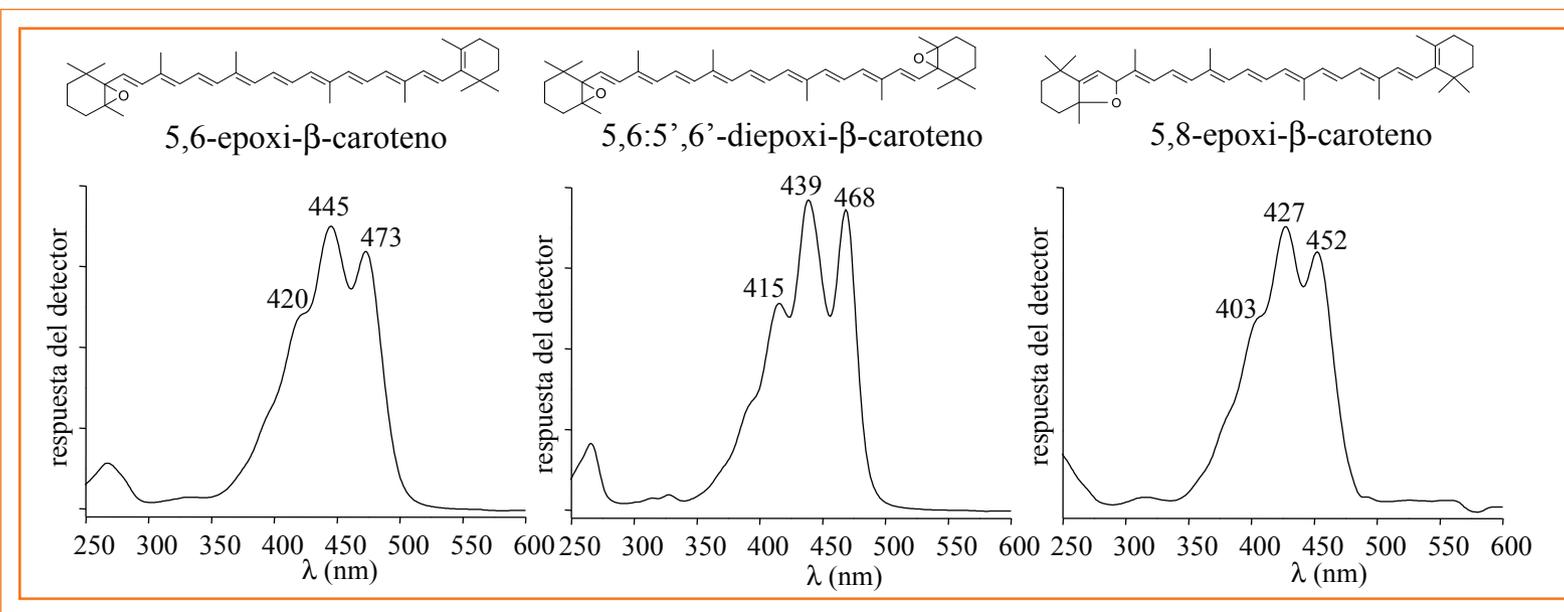


FIGURA 10. Estructuras química y espectros UV-visible, obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE, de epóxidos de  $\beta$ -caroteno.

## ESPECTRO DE MASAS DE CAROTENOIDES

Los datos más importantes obtenidos a partir del espectro de masas son la masa molecular del compuesto y los patrones de fragmentación característicos de su estructura. Como la cadena poliénica de los carotenoides puede estabilizar tanto carga positiva como negativa, los carotenoides forman iones estables con diversas técnicas de ionización. Para obtener un buen espectro de masas se requiere pequeña cantidad de muestra, generalmente pocos  $\mu\text{g}$ .

En la bibliografía hay muchos espectros, datos y fragmentos obtenidos por EI, los cuales se encuentran compilados en un trabajo (Enzell y Back, 1995). No obstante, como esta fuente de ionización no puede ser acoplada al HPLC, los datos que se usan comúnmente en la actualidad se han obtenido principalmente con ionización por APCI en el modo positivo (De Rosso y Mercadante, 2007a; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). Así, solamente los espectros obtenidos con esta técnica se discutirán en este capítulo. En este sentido hay que tener en cuenta que, debido a que diferentes técnicas de ionización pueden producir diferentes patrones de fragmentación para el mismo carotenoide, la interpretación de espectros de masas basada en la bibliografía debe ser realizada con cuidado.

### Masa molecular y fragmentación de la cadena poliénica

En la fuente APCI en el modo positivo, en general se detecta el pico de masa atómica más alta, con valor impar, que corresponde a la molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) del carotenoide. Normalmente es el pico de mayor intensidad (pico base) en el espectro de masas, con algunas excepciones. En

el modo negativo, se detectan tanto la molécula desprotonada ( $[M-H]^-$ ) como el ión molecular cargado negativamente ( $[M]^-$ ) (Mariutti *et al.*, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). Las fragmentaciones logradas por MS-MS, consecuencia de la masa molecular y de los grupos terminales y funcionales, confirman la atribución correcta del pico de la molécula protonada.

En la cadena poliénica, se han observado pérdidas de tolueno (92 u) y a veces de metil-ciclopentadieno (80 u) en los espectros de carotenos y xantofilas obtenidos por APCI, tanto en el modo positivo como en el negativo (De Rosso y Mercadante, 2007; Mariutti *et al.*, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). La pérdida de xileno (106 u) es menos frecuente en APCI (De Rosso y Mercadante, 2007; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). A veces, además de estas pérdidas se observan otras que corresponden a grupos funcionales (figura 11). Como la pérdida de por lo menos uno de esos compuestos se verifica en todos los carotenoides, estas informaciones son útiles para confirmar la atribución de la  $[M+H]^+$ , aunque tenga poca utilidad para distinguir entre los carotenoides.

### Fragmentaciones desde los grupos terminales y funcionales

En relación con los anillos (tabla 3), se han observado pérdidas del anillo  $\beta$ -ionona (124 u) y de este anillo acompañado de un grupo metileno (137 u) desde la  $[M+H]^+$  en  $\beta$ -caroteno y en  $\alpha$ -caroteno, mientras la eliminación de parte del anillo  $\epsilon$ - se verificó en  $\alpha$ -caroteno (De Rosso y Mercadante, 2007) y en luteína (Mariutti *et al.*, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012).

La pérdida de agua desde la molécula protonada revela la presencia de grupos oxigenados. Estas pérdidas pueden ser

## APCI-modo positivo

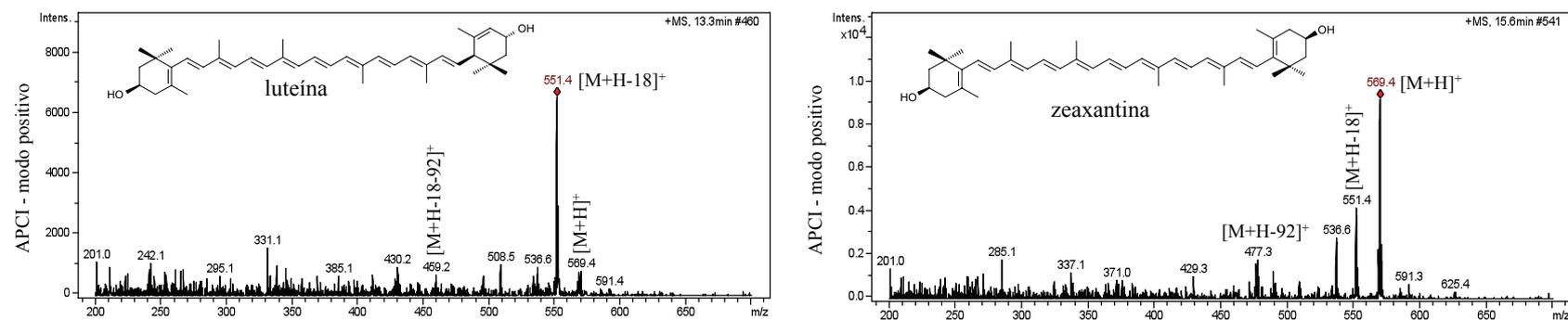


FIGURA 11. Estructuras químicas y espectros de masas de luteína y zeaxantina mostrando la fragmentación en la fuente.

sucesivas en xantofilas di-hidroxiladas. Por ejemplo, luteína y zeaxantina tienen el mismo peso molecular (568 Da) y, en consecuencia, la misma  $[M+H]^+$  en  $m/z$  569. A pesar de este hecho, la diferenciación entre estos dos carotenoides puede realizarse con base en la intensidad relativa del pico de la  $[M+H]^+$  en comparación con el fragmento a  $m/z$  551 ( $[M+H-18]^+$ ). En la zeaxantina la mayor intensidad del pico de la  $[M+H]^+$  en comparación con el fragmento a  $m/z$  551 confirma que los grupos hidroxilos no son alílicos al doble enlace del anillo. Por otro lado, el espectro de la luteína posee características opuestas. Esto es, el pico correspondiente a la pérdida de agua posee mayor intensidad que el pico de la  $[M+H]^+$  (figura 11). Esta característica fue también utilizada para diferenciar zeinoxantina y  $\alpha$ -criptoxantina, ya que ambos poseen el mismo espectro UV-visible y la misma masa molecular (De Rosso y Mercadante, 2007), aunque solamente el último presenta actividad de vitamina A.

Según lo comentado en la sección "Nociones básicas de

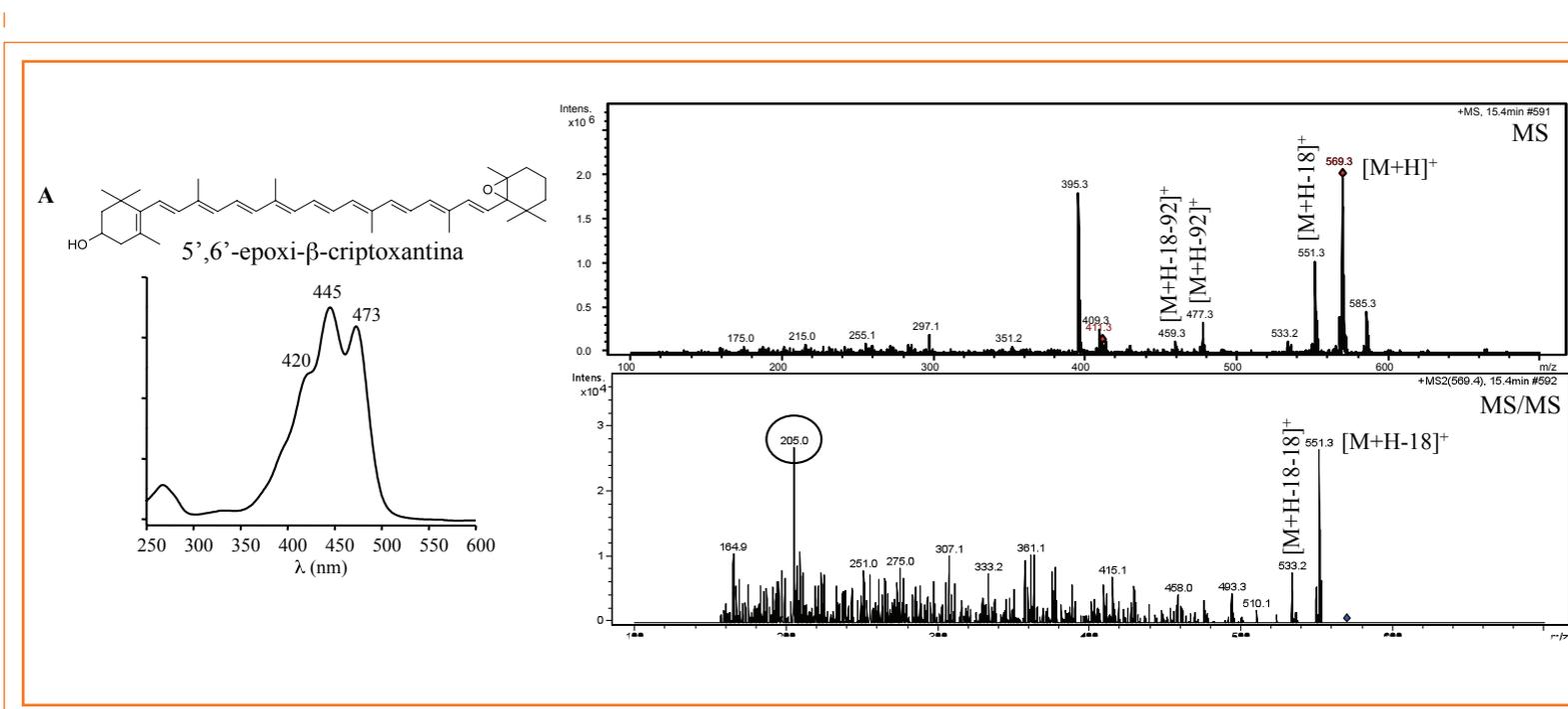
espectrometría de masas", el uso de MS-MS es necesario para confirmar el origen del fragmento. Por ejemplo, los epóxidos 5,6 y 5',6' de  $\beta$ -criptoxantina poseen el mismo cromóforo y, por lo tanto, espectros UV-visible idénticos, así como la misma masa molecular de 568 Da. Ambos epóxidos presentan  $[M+H]^+$  de 569 u y pérdida de agua ( $m/z$  551), tanto en la fuente de ionización como en el MS-MS (tabla 3). El modo más fácil de diferenciarlos es a través de la presencia en el MS-MS de los fragmentos a  $m/z$  205 o 221, respectivamente (figura 12).

Los ésteres de xantofilas que se encuentran de forma natural en muchas fuentes, como por ejemplo frutas, están acilados con diferentes ácidos grasos. Como ya se ha comentado, dichos ésteres se hidrolizan durante la saponificación. Los ésteres presentan características del espectro UV-visible idénticas a aquellas del carotenoide libre, sin embargo pueden ser identificados por MS, ya que sus pesos moleculares dependen de los ácidos grasos presentes. A pesar de que el pico de la  $[M+H]^+$  puede ser de baja intensidad o incluso

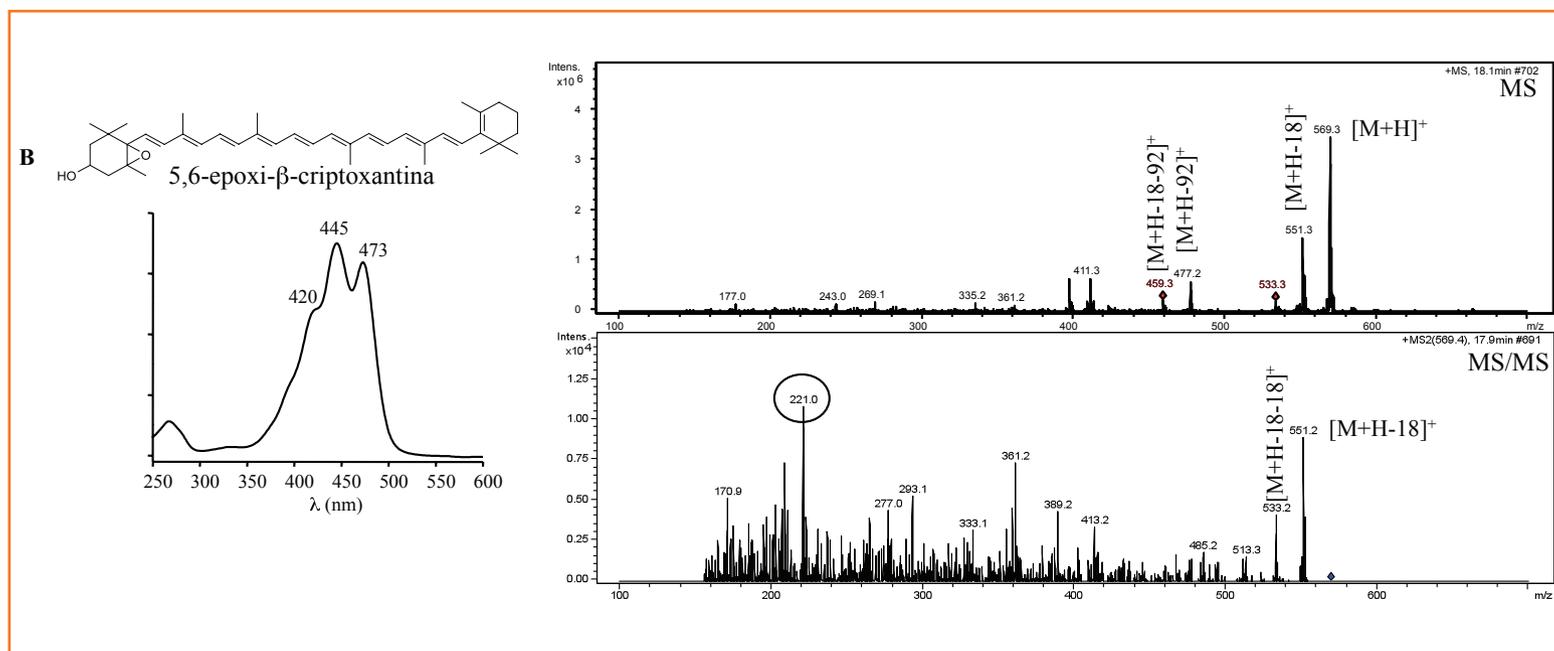
**TABLA 3.** Fragmentos característicos del espectro de masas de carotenoides obtenidos mediante APCI en el modo positivo

Grupos terminales y funciones químicas	Fragmentos característicos (MS y/o MS-MS)
anillo $\beta$	$[M+H-124]^+$ , $[M+H-137]^+$ , 269, 177, 137
anillo $\epsilon$	$[M+H-56]^+$ , $[M+H-123]^+$ , $[M+H-139]^+$ , 177, 137, 123
grupo $\psi$	$[M+H-69]^+$
grupo hidroxilo	$[M+H-18]^+$
grupo aldehído	$[M+H-18]^+$
grupo cetónico	$[M+H-18]^+$
grupo 5,6- o 5,8-epóxido	$[M+H-18]^+$ , 205 (anillo $\beta$ ), 221 (anillo $\beta$ hidroxilado)

**Fuente:** De Rosso y Mercadante (2007); Mariutti *et al.* (2012); Van Breemen, Dong y Pajkovic (2012).



**FIGURA 12.A.** Estructuras químicas, espectros en el UV-visible (obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE) y espectros de masas MS y MS-MS (ionización APCI en modo positivo) de 5,6-epoxi- $\beta$ -criptoxantina y 5,6'-epoxi- $\beta$ -criptoxantina.



**FIGURA 12.B.** Estructuras químicas, espectros en el UV-visible (obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE) y espectros de masas MS y MS-MS (ionización APCI en modo positivo) de 5,6-epoxi- $\beta$ -criptoxantina y 5,6'-epoxi- $\beta$ -criptoxantina.

inexistente debido a la intensa fragmentación en la fuente de ionización, siempre se detectan fragmentos de alta intensidad correspondientes a la eliminación de una o dos moléculas de ácidos grasos en el MS (Breithaupt, Wirt y Bamedi, 2002; Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en algunos casos la interpretación de los espectros de MS puede ser difícil debido a la presencia de triacilglicerolos en la muestra.

A pesar de que se utiliza poco para carotenoides, la ionización en el modo negativo puede complementar la información

obtenida por ionización en el modo positivo (Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012). Además, la ionización en el modo negativo puede usarse para evitar la ionización preferencial de los lípidos en el modo positivo. Por ejemplo, un ruido de fondo elevado, probablemente debido a los iones positivos de los lípidos presentes en la muestra, dificultó la identificación de las moléculas protonadas y la interpretación del patrón de fragmentación (aun por MS-MS) de los carotenoides de estrella de mar (Mariutti *et al.*, 2012). Por ejemplo, se observó una señal muy intensa a  $m/z$  369, correspondiente a la  $[M+H]^+$  del colesterol. Por el contrario, en modo negativo, se formaron principalmente iones moleculares de carotenoides cargados

negativamente  $[M^{\bullet}]^{-}$  y los lípidos no se ionizaron (Mariutti *et al.*, 2012).

## DERIVATIZACIONES QUÍMICAS

Las reacciones-derivatizaciones químicas se utilizaban hasta la popularización del equipo de HPLC-DAD-(APCI)-MS; sin embargo, estas reacciones siguen siendo útiles, sobre todo para la identificación de carotenoides de fuentes no estudiadas. Estas técnicas requieren normalmente una cantidad pequeña de muestra y la reacción puede monitorearse por espectrometría en el UV-visible o por HPLC, entre otros métodos.

La isomerización térmica de un patrón de carotenoide puede utilizarse para indicar o confirmar la presencia de isómeros *Z* en la muestra, evaluando la coincidencia de características espectrales y cromatográficas en HPLC-DAD. Este procedimiento fue aplicado con éxito para confirmar la presencia de isómeros *Z* de astaxantina en la estrella de mar (Mariutti *et al.*, 2012) y de  $\beta$ -criptoxantina en algunas frutas (De Rosso y Mercadante, 2007a).

Por otra parte la adición de ácido cataliza la transformación de 5,6-epóxidos a 5,8- epóxidos, que puede ser monitoreada tanto por UV-visible como por HPLC-DAD (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005), lo que ayuda a confirmar la presencia de grupos 5,6-epóxidos en la estructura del carotenoide. Se pueden reducir ceto-carotenoides con  $\text{LiAlH}_4$  o  $\text{NaBH}_4$ , para formar los alcoholes correspondiente. Por ejemplo, la astaxantina presenta un espectro UV-visible con  $\%III/II=0$  y el alcohol formado, crustaxantina, posee el típico espectro con tres bandas bien definidas y  $\%III/II=35-40$ , en MeOH/MTBE (Mariutti *et al.*, 2012).

En el capítulo 3 se proporciona información más detallada sobre algunas de estas reacciones.

## RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y DICROÍSMO CIRCULAR

La técnica más poderosa para la elucidación de la estructura de un compuesto es NMR. El entorno de cada átomo de hidrógeno del carotenoide puede evaluarse por medio del espectro de  $^1\text{H-NMR}$ . Los espectros de NMR de  $^{13}\text{C}$  sirven para evaluar el tipo de cada átomo de carbono y su entorno. Así, los espectros de NMR son esenciales para la elucidación de la estructura de un nuevo carotenoide, incluyendo la localización exacta de los dobles enlaces en configuración *Z* y la estereoquímica relativa; no obstante, no ofrece informaciones sobre la configuración absoluta del compuesto. Tanto la medida como la interpretación de un espectro de NMR son laboriosas debido al gran número de hidrógenos presente en los carotenoides, muchos de los cuales son muy parecidos químicamente, pero no exactamente equivalentes. Por ejemplo, la mayoría de los hidrógenos de la cadena poliénica central absorben en la región de 6,1-6,7 ppm, y dan señales superpuestas. Además, la interacción entre hidrógenos implica que la señal de un protón esté dividida, apareciendo como dobletes, tripletes, cuádrupletes o multipletes. Esta multiplicidad hace el espectro aún más complejo, requiriendo la realización de experimentos bidimensionales.

Por otra parte, para obtener un buen espectro de NMR se necesita el compuesto puro y en cantidades mucho más elevadas (típicamente al menos 1 mg) de las que son necesarias para UV-visible y MS. En la bibliografía existe una compilación muy completa de desplazamientos químicos de

carotenoides, incluyendo algunos isómeros (Englert, 1995).

La determinación de la configuración absoluta de un carotenoide es posible mediante dicroísmo circular (CD). La interpretación del espectro sólo puede hacerse por comparación con compuestos de referencia o modelos con quiralidad conocida. La cantidad de muestra requerida es baja (5-50 µg), sin embargo los equipos de CD no están al alcance de todos los laboratorios.

## CONSIDERACIONES FINALES

Como ya se ha comentado en otros capítulos, el análisis de carotenoides es inherentemente difícil y se pueden introducir errores en todas las etapas del proceso. Los instrumentos como HPLC-DAD-MS ofrecen varias ventajas, al combinar la cromatografía como método de separación con métodos de identificación que proporcionan al mismo tiempo informaciones sobre el cromóforo y el peso molecular para cada pico del cromatograma.

La identificación de un carotenoide basada sólo en su espectro de UV-visible y orden de elución en la columna de HPLC se debe evitar, ya que es fácil que conduzca a identificaciones erróneas. En el caso en que la espectrometría de masas no esté disponible, es esencial realizar co-cromatografía con patrones, ya sean comerciales o preparados en el laboratorio.

Es importante considerar que, independientemente de las características del equipo de MS, esta técnica no proporciona ninguna información sobre estereoquímica. Así, isómeros geométricos (*E/Z*) de un mismo carotenoide poseen espectros de masas idénticos. Asimismo, no es posible diferenciar entre epóxidos 5,6 y 5,8 por MS. Es importante tener claro que la estructura de un carotenoide sólo puede determinarse inequívocamente mediante NMR y que hay que usar además CD para carotenoides con centros o átomos quirales. La determinación de la localización exacta de los dobles enlaces *Z* sólo es posible con NMR.

### AGRADECIMIENTOS

La autora agradece el apoyo financiero de las agencias de fomento brasileñas Fundación de Ayuda a la Investigación del estado de São Paulo (Fapesp), Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) y Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES), por sus siglas en portugués.

## REFERENCIAS

- Breithaupt, D.E., Wirt, U. y Bamedi, A. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 66-70.
- Britton, G. 1995. En *Carotenoids: Spectroscopy*, vol 1B. Ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Basel: Birkhäuser Verlag, 13-62.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2004. *Handbook of Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5062-5072.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9135-9141.
- Englert, G. 1995. *Carotenoids: Spectroscopy, vol 1B*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Basel: Birkhäuser Verlag, 147-260.
- Enzell, C.R. y Back, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy*. Basilea: Birkhäuser, 261-320.
- Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basilea: Birkhauser.
- Mariutti, L.R.B., Pereira, D.M., Mercadante, A.Z., Valentão, P., Teixeira, N. y Andrade, P.B. 2012. *Marine Drugs* 10: 1498-1510.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9369-9373.
- Mellado-Ortega, E. y Hornero-Méndez, D. 2012. *Food Chemistry* 135: 1344-1352.
- Mercadante A.Z. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Boca Raton: CRC Press, 447-478.
- Murray, K.K., Boyd, R.K., Eberlin, M.N., Langley, J.G., Li, L. y Naito, Y. 2013. *Pure and Applied Chemistry* 85: 1515-1609.
- Nunes, I.L. y Mercadante, A.Z. 2004. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 24: 440-447.
- Van Breemen, R.B., Dong, L.L. y Pajkovic, N.D. 2012. *International Journal of Mass Spectrometry* 312: 163-172.
- Vessecchi, R., Lopes, N.P., Gozzo, F.C., Dörr, F.C., Murgu, M., Lebre, D.T., Abreu, R., Bustillos, O.V. y Riveros, J.M. 2011. *Quimica Nova* 34: 1875-1887.

## CAPÍTULO 5

# ESTRATEGIAS EN METABOLÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LOS CAROTENOIDES EN PLANTAS Y SU ACCIÓN EN EL ORGANISMO HUMANO

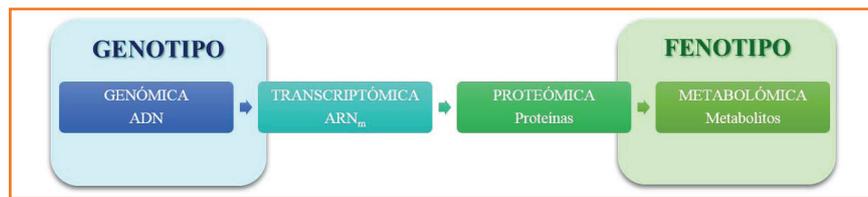
María Dolores Luque de Castro y María Molina-Calle



### LA METABOLÓMICA COMO MARCO DE ESTUDIO DE LOS CAROTENOIDES

El auge de la metabolómica en la última década ha hecho que esta disciplina adquiera un papel cada vez más importante en estudios sobre la elucidación de mecanismos, rutas y comportamiento de sistemas vivos, así como en estudios sobre la interacción de estos sistemas con el medio. En sus comienzos, esta nueva “ómica” fue definida por Fiehn (2002) como “un análisis global, exhaustivo, en el que se identifican y cuantifican todos los metabolitos de un sistema biológico”. Desde entonces, la metabolómica se ha definido de diferentes formas en numerosos artículos y revisiones científicas, por lo que Beyoğlu e Idle (2013) aunaron todas ellas en una definición amplia de la nueva disciplina como “el estudio global y no sesgado del conjunto de moléculas pequeñas (<1 kDa) en un biofluido, tejido, órgano u organismo”.

La metabolómica está directamente relacionada con el resto de las ómicas como



**FIGURA 1.** Relación entre las distintas ómicas en función del flujo de información biológica, desde la carga genética hasta su expresión final como metabolitos.

consecuencia del flujo de información biológica (figura 1) (Gomase *et al.* 2008). Así, la genómica es la ómica que estudia el ADN de un organismo o célula, es decir, su carga genética o su genotipo. El siguiente eslabón en el flujo de información es el ARN mensajero, que estudia la transcriptómica y apoya la información para el estudio de las proteínas, objeto de la proteómica. El objetivo de la última de las grandes ómicas son los metabolitos, resultado de la acción enzimática de ciertas proteínas.

El conjunto de moléculas pequeñas objeto de la metabolómica conforma el metaboloma, definido como “la serie completa de todos los metabolitos formados por una célula en respuesta a su metabolismo, que comprende el endometaboloma (todos los metabolitos intracelulares) y el exometaboloma (todos los metabolitos excretados al fluido extracelular)”. El metabolismo, en definitiva, es una red extensa de reacciones metabólicas en la que los productos de una reacción son los reactantes de otra subsiguiente. Por ello, se define metabolito como “cualquier intermedio o producto final del metabolismo, usualmente restringido a pequeñas moléculas que no están genéticamente codificadas”. En función tanto de las rutas metabólicas en las que están implicados los metabolitos como de su función se pueden clasificar en:

a) Metabolitos primarios: aquellos que están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo.

b) Metabolitos secundarios: los que no están directamente implicados en los procesos de crecimiento, desarrollo y reproducción, pero generalmente tienen una función biológica importante como, por ejemplo, la defensa contra predadores, parásitos o enfermedades, competencia entre especies o para facilitar los procesos de reproducción (colores, olores, etc.).

El metaboloma y, por lo tanto, el estado metabólico de un ser vivo, puede verse afectado por diversos factores intrínsecos (edad, estado de salud, estado reproductivo, etc.) y extrínsecos (nutrientes, compuestos artificiales como pesticidas o fertilizantes, en caso de plantas, y fármacos, contaminantes, etc., en caso de animales y seres humanos). Por eso, el estudio del metaboloma es de gran importancia para conocer el estado de un organismo y cómo le afecta su entorno.

El metaboloma está considerado la última expresión de la información biológica, por lo que se relaciona directamente con el fenotipo. Como ejemplos se pueden considerar los pigmentos, que afectan el color de la piel y el pelo, o la acumulación de azúcares, que proporciona el sabor dulce a la fruta. La información obtenida a partir de todas o algunas de estas ómicas puede combinarse para conseguir un conocimiento más completo de la biología de un organismo y, en consecuencia, de los procesos que afectan el crecimiento, el envejecimiento, las reacciones a estímulos externos, etc. El uso de la información combinada proveniente de varias ómicas constituye la biología de sistemas.

La metabolómica presenta importantes ventajas para el

estudio de un sistema biológico con respecto al resto de las ómicas. Para llevar a cabo este tipo de estudios se utilizan plataformas analíticas que se caracterizan por tener una excelente reproducibilidad analítica y biológica con un bajo costo de análisis por muestra, en contraposición a los costos de aplicación de cualquiera otra de las grandes ómicas. Además, la metabolómica es mínimamente invasiva, no requiere una preselección de los analitos y permite llevar a cabo estudios exploratorios. Sin embargo, esta disciplina presenta ciertas características que la hacen más compleja que otras ómicas en algunos aspectos. Los metabolitos son moléculas muy diversas químicamente, no se encuentran confinados, como en el caso del ADN, y están presentes en el organismo en una gran número (en el ser humano puede haber unos diez mil metabolitos, mientras que un sistema vegetal puede alcanzar hasta 200.000) y en un amplio rango de concentraciones que puede abarcar hasta nueve órdenes de magnitud (de picomoles a milimoles). La gran variedad de analitos y su amplio rango de concentraciones hacen necesaria la aplicación de técnicas muy diversas, tanto para la preparación de la muestra como para el análisis de los metabolitos en cuestión, jugando un papel clave la experiencia del investigador para seleccionar las más adecuadas en función de la naturaleza de los metabolitos a determinar y de la matriz de la muestra.

La enorme variedad de metabolitos y de tipos de sistemas que abarca la metabolómica ha dado lugar a la división de la disciplina en subdisciplinas, entre las que destacan por su extensión la lipidómica (dividida a su vez en diferentes ramas en función de la clase de lípidos considerados: acil-lipidómica, glicerofosfolipidómica, etc.), y la nutrimetabolómica, mediante la que se estudian las dosis y cambios temporales en compuestos de bajo peso molecular en respuesta a tratamientos dietéticos. Mientras que en lipidómica la extensión

la establece el número de clases, subclases, familias, etc. de lípidos que existen y sus acciones clave para el funcionamiento del organismo, en el caso de la nutrimetabolómica su importancia viene dada por la variedad entre sujetos que a su vez da lugar a su diferente comportamiento frente a los alimentos, lo que justifica la investigación sobre la dieta personalizada.

## ESTRATEGIAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA Y SUS PRINCIPALES OBJETIVOS

Existen distintas estrategias analíticas en metabolómica entre las que se puede elegir dependiendo del objetivo del estudio. En general, todas ellas se caracterizan por un costo menor de análisis por muestra y tiempos de análisis más cortos que en las otras grandes ómicas.

### Perfil metabolómico

El perfil metabolómico o *metabolomic profiling* se utiliza para clasificar muestras con base en una característica determinada (procedencia, relevancia u origen biológico). Se utilizan espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) o de espectrometría de masas (MS) del conjunto de metabolitos en estudio para obtener un conjunto de señales características. Es una estrategia rápida, pero los datos obtenidos son genéricos, ya que no aportan información específica de los metabolitos, por lo que se orientan a la clasificación rápida de numerosas muestras utilizando estadística multivariante. Como ejemplo, Van Ruth *et al.* (2011) analizaron el conjunto de carotenoides de la yema de huevo mediante esta estrategia para discriminar entre huevos convencionales y orgánicos.

## Análisis orientado

El análisis orientado (dirigido) o *targeted analysis* se restringe a un número limitado de metabolitos (a veces un único metabolito) que han sido caracterizados previamente, por lo que representa una pequeña fracción del metaboloma. La cuantificación de metabolitos clave con funciones bien definidas en rutas metabólicas puede usarse para la detección de perturbaciones de estas rutas, lo que permite obtener información sobre el estado general del sistema en estudio. El análisis orientado, al estar enfocado a un grupo reducido de metabolitos, requiere una etapa de preparación de la muestra generalmente laboriosa como, por ejemplo, una extracción en fase sólida (SPE). Algunos autores argumentan que el análisis orientado no puede considerarse una estrategia de la metabolómica, sino un mero análisis de un número limitado de compuestos. No obstante, la selección de esos compuestos para realizar el seguimiento de un proceso metabólico (o para la discriminación entre diferentes comportamientos metabólicos) constituye estrictamente un estudio metabolómico.

## Análisis metabolómico global

El análisis metabolómico global o *untargeted analysis* se refiere al análisis cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos presentes en un sistema. Es una estrategia que requiere la integración de los resultados obtenidos por aplicación de diferentes métodos de preparación de la muestra y distintos métodos de análisis basados en diferentes técnicas de separación y de detección. Además, el conjunto de datos obtenidos mediante la aplicación de estos métodos es muy extenso, por lo que requiere tratamientos con técnicas quimiométricas avanzadas para convertirlos en datos

manejaables y, finalmente, en resultados interpretables. Los metabolitos se identifican mediante dos vías: La comparación con patrones o con bases de datos especializadas (preferiblemente mediante ambas para una identificación segura). Esta estrategia permite la identificación de nuevos metabolitos que estén implicados en rutas metabólicas y, por lo tanto, el conocimiento de dichas rutas.

## HERRAMIENTAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN METABOLÓMICA

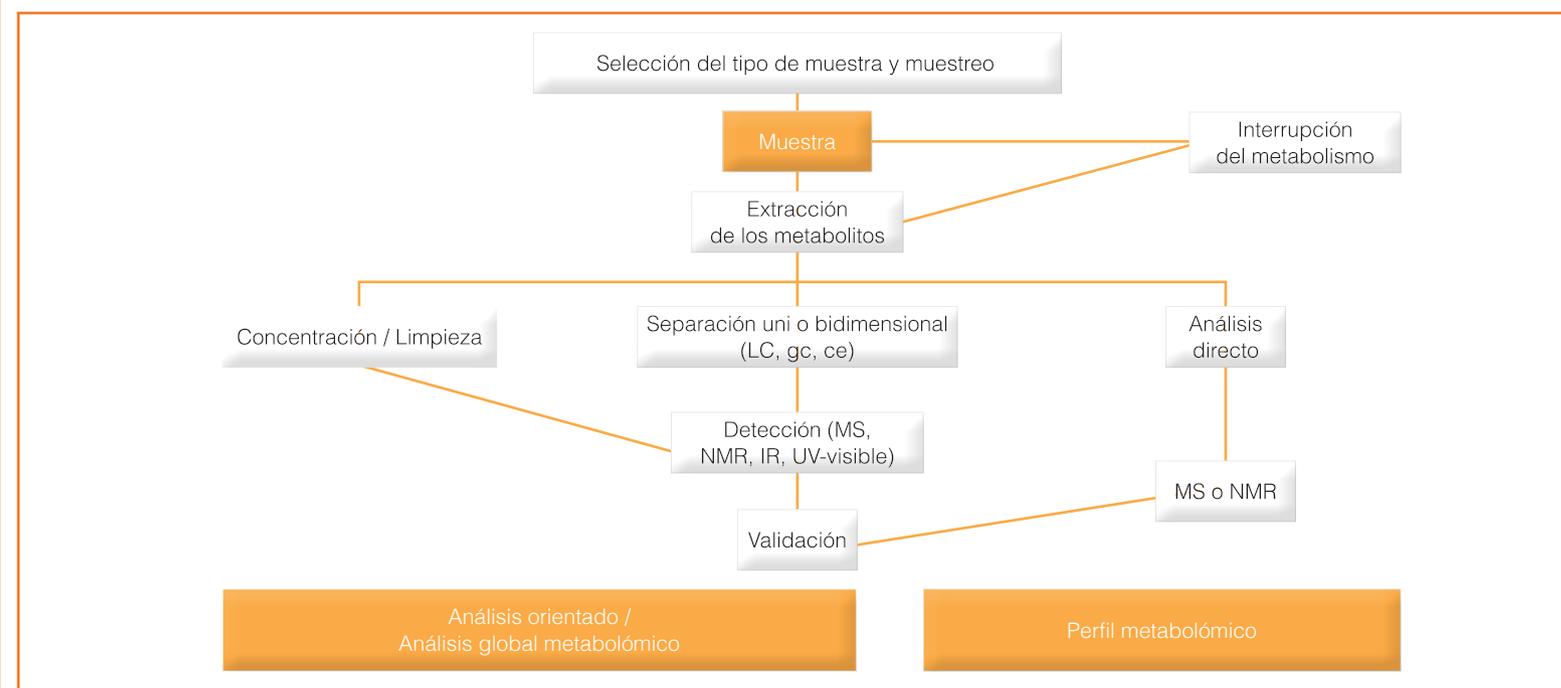
La selección de las herramientas analíticas más adecuadas en cada caso depende del objetivo del estudio, que a su vez delimitará la estrategia analítica a utilizar y, por lo tanto, el método analítico que se requiere poner a punto:

a) Para obtener el perfil metabolómico, la situación más común es un análisis directo de la muestra precedido de etapas muy simples, como la dilución o la eliminación de proteínas.

b) Cuando se trata de análisis orientado los protocolos son más selectivos, ya que es necesario obtener la fracción deseada eliminando o minimizando la presencia de especies interferentes; lo que en definitiva requiere un mayor número de etapas en la preparación de la muestra.

c) Si se trata del análisis metabolómico global se requieren protocolos genéricos no selectivos con el fin de identificar el mayor número posible de metabolitos.

En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo de un proceso analítico en metabolómica en función de la estrategia, que se puede resumir en las siguientes etapas: selección y



**FIGURA 2.** Esquema general del proceso analítico en metabolómica.

preparación de la muestra, extracción de los metabolitos y análisis con o sin separación previa.

### Selección del tipo de muestra y muestreo

Una vez planificado el estudio a realizar, la primera etapa es la selección de la muestra que, dependiendo del sistema, puede ser un biofluido, células o tejidos en análisis animal o clínico, u hojas, frutos, raíces, flores, etc., si se trata de plantas. La etapa de muestreo es de gran importancia ya que influirá decisivamente en el resultado final. La representatividad es la característica fundamental de un buen muestreo. Realizado

el muestreo, la primera etapa del tratamiento en el caso de muestras líquidas es la eliminación de partículas en suspensión o la precipitación de proteínas, si se trata de muestras clínicas; mientras la extracción de los metabolitos en muestras vegetales sólidas se facilita mediante secado y pulverización o por trituración de la muestra.

La etapa de interrupción del metabolismo es clave para su estudio *in vivo*, ya que su objetivo es evitar los cambios causados por la actividad enzimática desarrollados tras el muestreo. Esta etapa debe ser muy rápida, prácticamente instantánea, compatible con las siguientes etapas del proceso

analítico, y no debe producir cambios físicos o químicos en los metabolitos. Estos requerimientos hacen que las alternativas más empleadas en esta etapa sean la disminución de la temperatura hasta un intervalo comprendido entre  $-20$  y  $-80$  °C y el uso de valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos.

## Extracción de los metabolitos

Las características de la etapa genéricamente conocida como extracción dependen del estado físico de la muestra y del tipo de estrategia metabólica subsiguiente, pero su objetivo es siempre separar, de forma más o menos selectiva, los metabolitos en estudio de la matriz de la muestra. Mientras en análisis orientado se requiere una alta selectividad, esta característica en análisis global conduciría a una muestra tratada con escaso número de metabolitos, situación no deseable. El estado físico de la muestra condiciona la técnica utilizada para conseguir el aislamiento más o menos selectivo de los metabolitos, que puede ser extracción líquido-líquido (LLE) o SPE en el caso de muestras líquidas. La última de estas técnicas, así como su versión miniaturizada —microextracción en fase sólida (SPME)— se utilizan ampliamente en sus versiones manuales y automatizadas para la limpieza de la muestra o la preconcentración de los metabolitos o con ambos objetivos. Los compuestos retenidos dependerán del tipo de sorbente utilizado y pueden ser los metabolitos de interés o las especies potencialmente interferentes. El pequeño volumen de muestra que se requiere en SPME la convierte en una herramienta muy útil en análisis clínicos. La selección del eluyente juega un papel clave en el factor de preconcentración que se consigue con la SPE en cualquiera de sus formatos.

La obtención de una disolución de los metabolitos a partir de una muestra sólida puede basarse en digestión (de uso poco

frecuente) o en extracción sólido-líquido, más propiamente conocida como lixiviación. Las diferentes alternativas para llevar a cabo esta última incluyen las técnicas convencionales, como la maceración y la extracción Soxhlet, muy utilizadas por su simplicidad y el bajo costo del dispositivo experimental. Una mejora sustancial en la eficiencia y en el tiempo de extracción se ha conseguido al sustituir las técnicas convencionales por otras basadas en el uso de líquidos sobrecalentados o fluidos supercríticos. Inconvenientes de cada uno de estos tipos de extracción son que en los primeros se utilizan temperaturas altas que pueden degradar los compuestos termolábiles; mientras los fluidos supercríticos (generalmente  $\text{CO}_2$ ) son no polares, por lo que la lixiviación de compuestos polares o iónicos requiere el uso de coextractantes que complican el método en cuestión. La extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico puede proporcionar métodos muy selectivos, como en el caso de la extracción de la cafeína del café y del té (Park *et al.* 2007), pero con el inconveniente del alto costo de adquisición y de uso (teniendo en cuenta que la despresurización del sistema proporciona el extracto seco, pero que la ausencia de residuos del extractante requiere que éste sea de alta pureza). La extracción con etanol sobrecalentado la han utilizado Mustafa *et al.* (2012) para obtener los carotenoides de zanahorias desechadas; mientras que Liau *et al.* (2010) usaron  $\text{CO}_2$  supercrítico con etanol como coextractante para extraer lípidos y carotenoides de microalgas de la especie *Nannochloropsis oculata*.

Energías auxiliares como microondas (MW) o ultrasonidos (US) se han utilizado en una amplia variedad de muestras para favorecer la transferencia de masa del sólido al lixiviante. La limitación en la aplicación de alguna de estas energías es la termolabilidad de los metabolitos (en el caso de las MW) y la producción de radicales libres en medios polares sometidos a la acción de los US. La eficacia de la lixiviación de

carotenoides asistida por US en comparación con la extracción convencional se puso de manifiesto en el estudio de Ye *et al.* (2011), en el que demostraron que, en presencia de US, la cantidad de estos compuestos extraída de maíz es hasta 10 veces mayor que sin la aplicación de US y que para conseguir extraer la misma cantidad, la extracción con us requiere 10 veces menos tiempo.

### Análisis sin etapa de separación: análisis directo

Los análisis sin separación previa se utilizan casi exclusivamente para la obtención del perfil metabolómico. Para estos análisis se usan principalmente la NMR, la MS y, en menor proporción, las espectrometría infrarroja y Raman. La NMR es una técnica no destructiva y, por lo tanto, muy útil para muestras valiosas, con una preparación de muestra simple y rápida (normalmente sólo requiere dilución). Además, permite obtener espectros NMR directamente de células y tejidos, así como monitorear metabolitos sensibles al proceso de extracción. Por otro lado, presenta una menor sensibilidad que la MS, requiere el uso de disolventes deuterados, sobre todo metanol o cloroformo, y el agua presente en los sistemas biológicos ocasiona interferencia, por lo que debe llevarse a cabo la supresión de su señal. Esta técnica se basa en la absorción de energía de una frecuencia determinada por algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo. Los núcleos atómicos presentes en compuestos biológicos capaces de absorber esta energía son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{31}\text{P}$ , de los que principalmente se usan los dos primeros, dando lugar a las modalidades  $^1\text{H}$ - NMR y  $^{13}\text{C}$ - NMR. La absorción por cada tipo de núcleos depende de los núcleos de otra naturaleza presentes en su entorno, por lo que es útil a la hora de determinar la estructura del metabolito en estudio. La NMR

permite la combinación de diferentes espectros de una misma muestra, denominadas técnicas NMR bidimensionales, con lo que se puede conocer la interacción de los núcleos de una misma molécula. Aunque estas técnicas proporcionan mayor información cualitativa, los tiempos de adquisición de datos son más largos, incluso de un día. Un ejemplo del uso de esta técnica para obtener un perfil metabolómico es el estudio de Neily *et al.* (2011), en el que obtuvieron el espectro  $^1\text{H}$ -NMR de los carotenoides presentes en pieles de diferentes tomates transgénicos a diferentes tiempos de desarrollo. Mediante comparación por análisis de componentes principales (PCA) de los espectros obtenidos consiguieron diferenciar variedades y estadios de desarrollo.

Las espectrometrías infrarroja y Raman también se han utilizado para la obtención del perfil metabolómico, ya que tienen un pequeño costo por análisis y tiempos de toma y tratamiento de datos cortos. Sin embargo, al contrario que la NMR, la información estructural que proporcionan es más limitada y son poco sensibles. La espectrometría Raman se utiliza para determinar el nivel de carotenoides en piel, ya que es no invasiva y no implica peligro personal si se aplica *in vivo*.

La MS (basada en la ionización, posterior fragmentación y detección de los iones formados por los analitos de interés) es una técnica ampliamente utilizada, no sólo en metabolómica, sino también en otras ómicas, como la proteómica. La información que proporciona incluye la masa exacta del metabolito y la elucidación de su mecanismo de fragmentación, lo que permite la identificación de su estructura. El análisis sin separación previa presenta la ventaja respecto a otras técnicas de que un espectrómetro de masas se comporta, en cierto modo, como un equipo de separación, ya que permite separar las señales en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los

compuestos. Aunque la MS con inyección directa (DIMS) es una técnica muy útil para la obtención del perfil metabolómico, la combinación de MS y técnicas de separación previa ha ganado mucha importancia en metabolómica, por lo que se explica más detalladamente en la subsección siguiente.

### Análisis con etapa de separación previa

Los métodos de análisis que implican separación previa a la detección, aunque se han utilizado en ocasiones para la obtención del perfil metabolómico, se usan más ampliamente en el caso de análisis orientados y análisis globales metabolómicos, ya que permiten la detección individual de los metabolitos para su cuantificación o identificación, siendo las técnicas cromatográficas (de gases o de líquidos) las más usadas en este ámbito —en menor proporción se utiliza la electroforesis capilar (CE)—. La cromatografía de gases (CG) permite la separación de compuestos volátiles, como, por ejemplo, compuestos aromáticos. Puede incorporar un muestreador de espacio de cabeza (HS) en el que se calienta la muestra en un vial cerrado, creando una atmósfera en su interior en la que se concentran los compuestos volátiles. El HS, además, se puede combinar con la SPME, concentrando así los compuestos volátiles en el sorbente, como en el caso del estudio de Donadio *et al.* (2011), en el que analizaron mediante HS-SPME/GC-MS los derivados volátiles de carotenoides generados por microorganismos en aguas salinas. Para la separación de compuestos menos volátiles es necesaria una reacción de derivatización de los metabolitos con la que se aumente su volatilidad.

A pesar de que la cromatografía de gases está muy extendida para el análisis de compuestos volátiles así como de ácidos grasos y fenoles previa derivatización, no es una técnica

de separación útil para el análisis de carotenoides, que son compuestos termolábiles, ya que las altas temperaturas de trabajo provocan su degradación. Por ello, la cromatografía líquida (LC) es la mejor alternativa para la separación de carotenoides. Una de las razones que apoyan su elección es que los diferentes formatos de LC, desde los convencionales hasta los cromatógrafos de ultrarresolución, cubren todas las necesidades en cuanto al tamaño de muestra, capacidad y velocidad de separación de los metabolitos. Además, la posibilidad de uso de una gran variedad de fases móviles y de fases estacionarias (columnas) aumenta su versatilidad para la separación de diferentes tipos de metabolitos. Las columnas de fase reversa, principalmente las empaquetadas con sílice ( $C_{30}$  o  $C_{18}$ ), se caracterizan por una fuerte interacción con compuestos de baja polaridad, mientras que las columnas de fase normal, como las HILIC, son más eficaces para compuestos polares.

La CE es una técnica de separación que se usa especialmente para análisis orientados de metabolitos polares. Para la separación se requiere un medio electrolítico cuya elección depende de la naturaleza química de los metabolitos a separar. Para metabolitos con carga permanente como antocianos o flavonoides sulfatados se utiliza como medio electrolítico un tampón acuoso (Bednář *et al.* 2005); para metabolitos con grupos hidroxilo se requiere un pH básico, mientras que aquellos que no pueden clasificarse como ácidos o bases (por ejemplo azúcares o glucósidos fenólicos) necesitan derivatización previa (Unger, 2009); por último, para compuestos poco o no polares es necesario utilizar un tampón acuoso que contenga un disolvente orgánico miscible como acetonitrilo, dietilamina, etc. (Porras y Kenndler, 2005).

Tras la aplicación de alguna de las etapas de separación comentadas, el detector más utilizado en metabolómica es el

MS, que aporta una gran exactitud en la medida de las masas y una excelente sensibilidad. El MS de cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) posibilita la ionización de los compuestos (modo MS) y su fragmentación (modo MS-MS) proporcionando una exactitud en el valor de las masas obtenidas del orden de 0.0001 unidades de  $m/z$  y generando una gran cantidad de información de cada uno de los metabolitos para su posterior identificación. Este analizador de masas se caracteriza por proporcionar una alta selectividad, mientras que su sensibilidad es menor que la de otros analizadores de masas como el de triple cuadrupolo (QqQ). El QTOF se combina con frecuencia con un cromatógrafo de líquidos o de gases para el análisis global metabolómico.

Entre las fuentes de ionización más comunes en MS, la ionización química a presión atmosférica (APCI) es la preferida en análisis de carotenoides, ya que sus condiciones de trabajo suaves se adaptan mejor a la termolabilidad de estos metabolitos.

La excelente sensibilidad de los equipos de qqq los convierte en los preferidos para el análisis cuantitativo en estrategias orientadas. Este detector también ioniza y fragmenta los metabolitos pero, a diferencia de los QTOF, registra una señal en el modo de análisis denominado monitoreo de reacciones seleccionadas (*selected reaction monitoring*, SRM) correspondiente a una transición del ión precursor (compuesto ionizado) al ión producto (fragmento generado). Debido a la múltiple fragmentación de los compuestos, es necesaria una optimización de los parámetros de ionización y fragmentación con el fin de seleccionar el fragmento con la mayor señal posible sin perder la señal del ión precursor. Esta transición se relaciona con la concentración del metabolito mediante interpolación de la señal obtenida en una recta de calibrado

creada a partir de patrones de los compuestos de interés a distintas concentraciones. Una de las mejores formas de compensar los efectos de la supresión de ionización es la utilización de estándares internos adecuados, cuyos mejores exponentes son los marcados con algún isótopo estable, como  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  o, más comúnmente,  $^2\text{H}$  (Fernández-Peralbo *et al.*, 2014).

Otro analizador de masas muy usado para análisis metabolómico global es la trampa de iones (IT), que se combina frecuentemente con un GC, por lo que está orientado al análisis de compuestos volátiles, que pueden ser metabolitos o sus productos de derivatización. La incompatibilidad entre las altas temperaturas con las que se trabaja en GC y la termolabilidad de los carotenoides explica que el acoplamiento GC- MS(IT) no se haya utilizado para el análisis de estos compuestos, aunque sí para sus derivados, como se comenta en la sección “Metabolismo de los carotenoides en el organismo humano”.

Detectores más asequibles, tanto por su costo de adquisición y mantenimiento como por su manejo y tratamiento de los datos, también se han utilizado para análisis orientados en metabolómica. Espectrofotómetros de absorción molecular en la zona UV-visible, tanto de tipo convencional como de diodos en fila (DAD) y los de emisión de fluorescencia (FLD) conectados a un LC se utilizan en análisis sencillos de pocos compuestos o en etapas de optimización de un método en las que la evolución global en función del cambio de las variables en estudio puede seguirse a través la comparación del perfil cromatográfico. La omnipresencia de grupos absorbentes en los carotenoides hace de la fotometría una técnica de detección muy útil para el seguimiento de las etapas de optimización, generalmente en la zona visible del espectro.

No ocurre lo mismo en el caso de la fluorimetría, ya que la emisión luminiscente requiere una etapa de derivatización con la que se consigue la rigidez suficiente de la molécula para la desactivación radiante. La ventaja de ambos tipos de detectores es que no son destructivos, por lo que se pueden acoplar en línea con otros detectores, como un MS.

## ANÁLISIS DE DATOS EN METABOLÓMICA

El análisis de datos es de gran importancia en metabolómica, ya que permite transformar los datos brutos en información útil para el estudio. La obtención de este tipo de información

requiere herramientas quimiométricas y bioinformáticas para el tratamiento de los datos brutos. El análisis de los datos generados en estudios metabolómicos es complejo y requiere varias etapas, como se esquematiza en la figura 3.

### Preprocesado de datos

La finalidad del preprocesado de datos es la transformación de los datos “brutos” (los que proporciona el instrumento analítico y que son exclusivos de la marca comercial) en datos “limpios” (aquellos que poseen un formato universal) para su procesamiento por cualquier software de tratamiento de datos. Las principales técnicas de preprocesado de datos son:

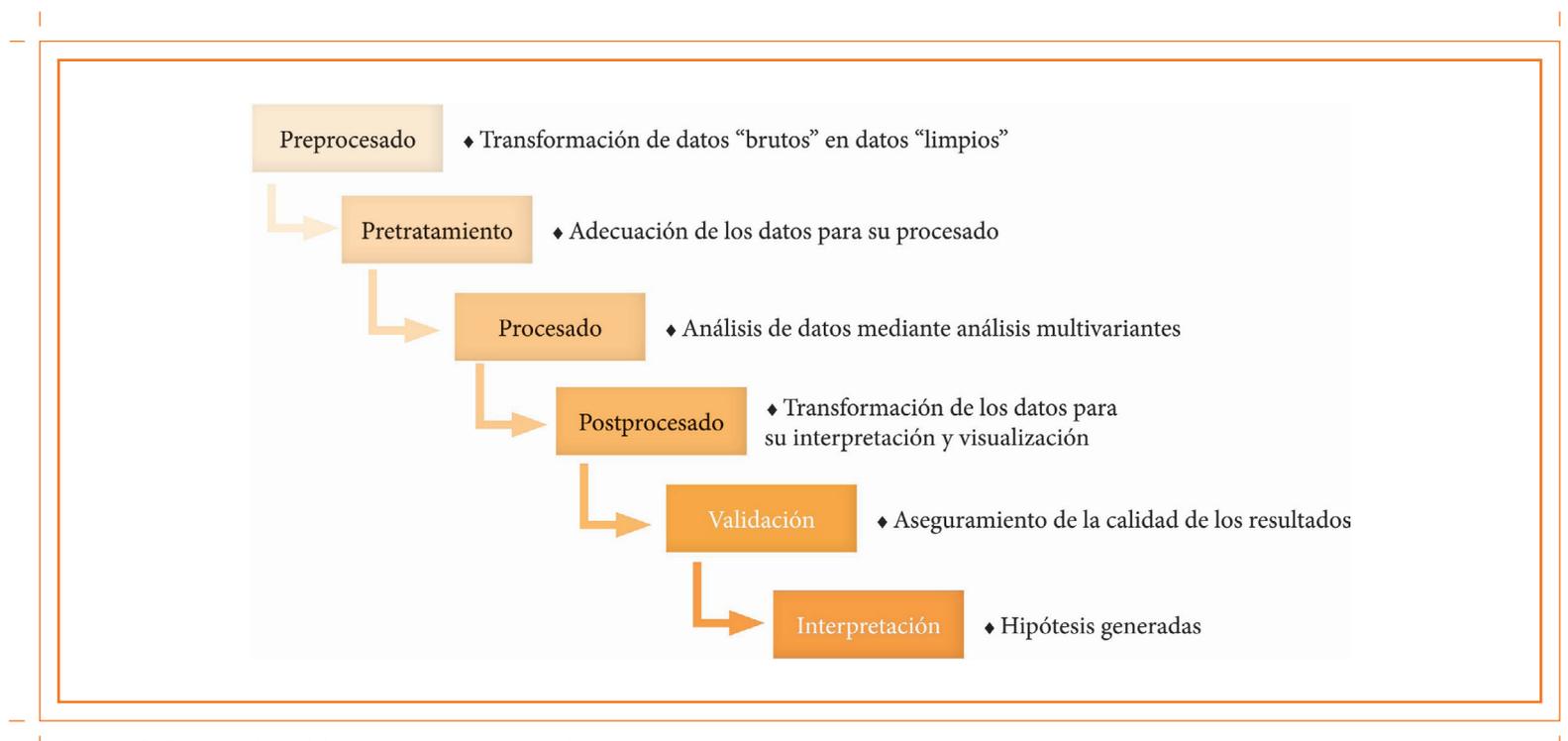


FIGURA 3. Etapas del análisis de datos en metabolómica.

a) Deconvolución, que permite resolver *in silico* señales solapadas en NMR o GC- y LC-MS. Para técnicas cromatográficas se genera una tabla de señales donde cada metabolito se representa por una variable.

b) Alineamiento, mediante el que se ordenan las señales correspondientes a los mismos metabolitos en registros NMR y en cromatogramas para que tengan el mismo desplazamiento químico o el mismo tiempo de retención, ya que son valores variables entre análisis. Es una etapa muy útil para la combinación de datos procedentes de diferentes muestras.

c) Corrección de la línea de base, para la eliminación del ruido de fondo en registros NMR y en cromatogramas, así como de señales no asociadas con metabolitos. El ruido de fondo puede ser químico, debido al proceso de medida, o aleatorio, asociado con el sistema de detección.

d) Corrección de fase, que se utiliza para eliminar la asimetría de los picos en los espectros NMR obtenidos por la transformada de Fourier.

e) Selección de picos (*peak-picking*), que organiza las señales obtenidas mediante NMR y MS y las presenta como tabla para su posterior tratamiento.

## Pretratamiento de datos

Para esta etapa los datos se presentan normalmente como una tabla que contiene los resultados analíticos a los que se aplican diferentes operaciones matemáticas para facilitar la comparación entre muestras. Las operaciones aplicadas con mayor frecuencia con este propósito son:

a) Normalización, que permite estandarizar los datos para hacerlos comparables mediante el ajuste del ruido.

b) Escalado, que establece la intensidad de las diferentes señales en función de la más intensa con el fin de facilitar la comparación entre ellas.

c) Centrado, que normaliza los datos y usa el valor medio para trasladar el centro de gravedad y disminuir la importancia de determinadas señales.

d) Detección de valores anómalos (*outliers*), que identifican las variables, muestras o combinaciones de ambas que se desvían de la distribución normal de la mayoría de los datos.

## Procesado de datos

Los estudios metabolómicos generan una gran cantidad de datos que dependen de un número grande de variables. El procesado permite aplicar análisis univariantes y multivariantes a estos datos para conseguir información útil de ellos. El análisis multivariante es el más usado en metabolómica, al estar implicadas muchas variables. Integra un conjunto de técnicas estadísticas cuya finalidad es analizar simultáneamente un conjunto de datos formados por varias variables medidas en cada muestra. Sus objetivos son visualizar los datos, es decir, conseguir detectar relaciones entre las diferentes muestras usando gráficas, animaciones o imágenes; el análisis de datos para buscar pautas consistentes o relaciones entre las variables que componen un conjunto de datos complejo y el modelado de los datos para determinar relaciones entre conceptos y objetos mediante la preparación de un modelo matemático. Las técnicas de análisis multivariante se clasifican en dos grupos según su finalidad:

a) Análisis no supervisado (exploratorio), para poner de manifiesto la existencia de conjuntos (*clusters*) de muestras y detectar cambios locales de densidad de datos e identificar valores anómalos o fuentes de variabilidad de los datos. Los algoritmos utilizados en este caso no requieren *a priori* ningún tipo de información adicional de las muestras y están basados en el cálculo de la semejanza entre ellas. Los análisis no supervisados utilizados con más frecuencia son el análisis por componentes principales (PCA) y el análisis de conjuntos o clústers (CA).

b) Análisis supervisado (clasificadorio), con el que se desarrollan modelos que permiten predecir la clasificación de muestras desconocidas. Puede ser de tipo cualitativo (si se predice la clase a la que pertenece una serie de muestras) o cuantitativo (si se establecen probabilidades de clasificación y se definen los límites de cada clase y factores de respuesta cuantitativos para un amplio rango de muestras). En este caso es necesario obtener información para el desarrollo del modelo. También se requiere una etapa de validación del modelo, ya que existe probabilidad de correlaciones entre los descriptores del modelo y una amplia dimensionalidad. Los análisis supervisados más utilizados son los que se basan en mínimos cuadrados parciales (PLS) y en *soft independent modeling class analogy* (SIMCA).

## Posprocesado de datos

El objetivo del posprocesado de los datos es interpretar los análisis llevados a cabo en la etapa anterior, con la que se pretende determinar los metabolitos causantes de la diferenciación entre muestras y estudiar sus cambios químicos y de concentración en las muestras. Estos metabolitos se denominan biomarcadores y permiten monitorear la evolución

de un organismo o detectar enfermedades, seguir su evolución y elegir un tratamiento.

## Validación de los resultados

En la validación de los resultados se corrobora que los biomarcadores identificados lo han sido correctamente. Para ello, existen bases de datos de metabolitos en las que se aportan sus datos químicos y biológicos así como sus espectros de fragmentación en MS. La comparación de los datos obtenidos en el análisis de las muestras con los datos existentes en estas bases de datos permite confirmar que la identificación ha sido correcta. Algunas de las bases de datos más empleadas son la del metaboloma humano, HMDB, la METLIN, la MassBank o la MS Database. Otra alternativa para la validación de los resultados es la comparación de los metabolitos identificados con sus patrones comerciales. Es una validación más fiable, ya que no influyen variables del instrumento de análisis; sin embargo, existen relativamente pocos patrones comerciales de metabolitos.

## PAPEL ACTUAL DE LA METABOLÓMICA EN LA ALIMENTACIÓN PERSONALIZADA: LA NUTRIMETABOLÓMICA

Las ciencias de la nutrición demostraron a lo largo del siglo xx que la alimentación influye directamente en el estado de un organismo vivo; sin embargo, una misma dieta no influye en todos los organismos de igual forma: una ingesta de calorías y de macro y micronutrientes no adecuada para cada estilo de vida puede conducir a un desequilibrio metabólico, e incluso a enfermedades. Las necesidades alimentarias de un ser humano dependen de varios factores, como son la altura, el

peso, la actividad, la fuerza, la resistencia, o las preferencias dietéticas. Por eso, el objetivo final de la nutrimetabolómica es establecer una dieta personalizada para cada individuo con el fin de conseguir un estado metabólico óptimo mediante la alimentación. La incorporación al organismo de las cantidades adecuadas de nutrientes no sólo depende de la cantidad de alimento ingerido, sino de la concentración de nutrientes en el alimento.

Una dieta personalizada para un ser humano presenta una gran complejidad debido principalmente al amplio rango de variables biológicas básicas, genéticas (por ejemplo el sexo) y temporales (etapas de la vida o situaciones concretas como el embarazo), y las diferentes variables debidas a influencias ambientales, exógenas (como la exposición al sol o a toxinas y alérgenos) o endógenas (ciclos de sueño, ejercicio, sedentarismo u obesidad). Por otro lado, establecer el efecto de la dieta es mucho más complicado que el efecto de una droga o fármaco, ya que los alimentos presentan miles de moléculas que actúan simultáneamente y ejercen efectos muy sutiles en muchos casos y sinérgicos. La metabolómica juega un papel clave en la comprensión de los efectos de la nutrición en la salud debido a que el metaboloma es muy sensible a cualquier cambio en el organismo, ya sea externo o interno, y existen numerosas rutas metabólicas bien establecidas —a diferencia de la expresión de numerosos genes, que es desconocida—. Sin embargo, la metabolómica no puede desvelar por sí sola la complejidad de la dieta de un organismo; se necesita información como la que puede proporcionar el estudio del microbioma y cómo afecta al proceso de digestión y asimilación de nutrientes. La microflora intestinal está compuesta por entre  $10^{13}$  y  $10^{14}$  microorganismos, diez veces más que el número de nuestras propias células, con más de mil especies de bacterias y

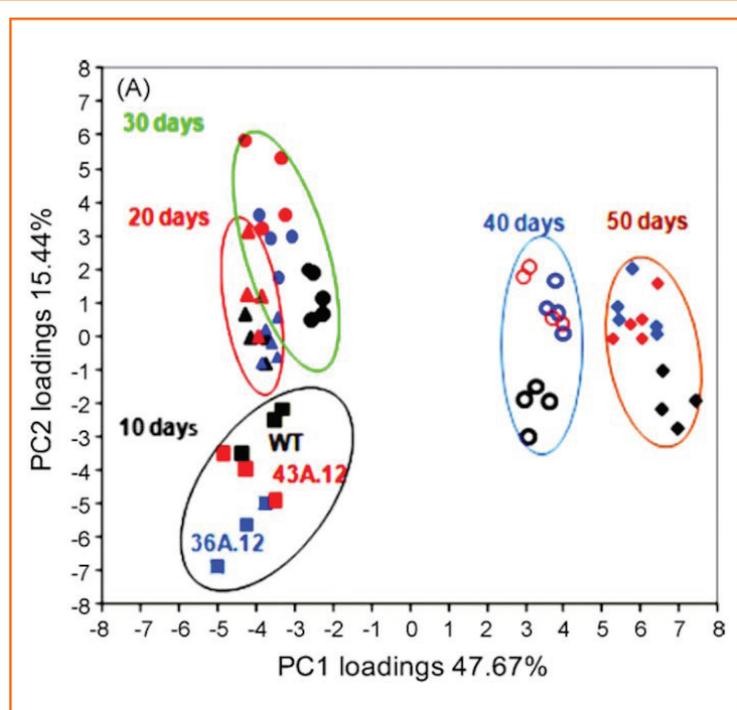
cien veces más genes que nuestro propio genoma. Teniendo en cuenta esta densidad de población en el intestino humano, con toda probabilidad la microflora intestinal tiene un papel importante en el proceso de alimentación. Los microorganismos que forman parte de ella pueden transformar ciertos nutrientes ingeridos en otros compuestos, benéficos o perjudiciales para nuestra salud, como ocurre en el caso de la fibra, que el ser humano no es capaz de digerir, sin embargo las bacterias son capaces de romperla para obtener energía. El estado metabólico de un ser humano se ve afectado por la alimentación, pero también el microbioma influye en este estado, por lo que conseguir una microflora equilibrada y bien adaptada puede prevenir enfermedades gastrointestinales y hepáticas, lo que a su vez se puede conseguir mediante la alimentación (por ejemplo, la ingesta de fructooligosacáridos favorece la proliferación de “bacterias buenas” que compiten con posibles patógenos dañinos para el organismo).

## METABOLÓMICA Y CAROTENOIDES EN PLANTAS

Hace más de una década los investigadores ya proponían, como vía para avanzar en la generación de cultivos con un contenido en carotenoides mayor, la obtención y estudio del perfil metabolómico global de estos compuestos (Fraser y Bramley, 2004). Los estudios posteriores no se han hecho eco de esta propuesta (ni tampoco los anteriores). De hecho, el perfil metabolómico o metabolómica sólo aparece (según los resultados de la búsqueda realizada por las autoras de este capítulo) en las palabras clave de dos artículos, publicados en 2011 y 2014, respectivamente.

El estudio realizado por Neily *et al.* (2011) se basó en perfiles

metabólicos globales de carotenoides en tejidos de tomates transgénicos usando  $^1\text{H-NMR}$  y LC-DAD con el objetivo de dilucidar los efectos de la acumulación de altos niveles de poliaminas en el metabolismo de este fruto. El PCA que proporcionaron los datos de  $^1\text{H-NMR}$  obtenidos de tomates en diferentes grados de desarrollo (de verde a rojo) mostró una clara discriminación entre ellos, como muestran los residuales de la figura 4. La cuantificación de 37 metabolitos en tejido del pericarpio y 41 en tejido de placenta también mostraron diferencias en perfiles metabólicos entre las líneas transgénica y no transgénica, especialmente en las primeras etapas de



**FIGURA 4.** PCA de los datos de  $^1\text{H-NMR}$  obtenidos de tomates en diferentes grados de maduración. Con permiso de Elsevier, Ref. Neily *et al.* (2011).

la maduración. La acumulación y el decrecimiento de unos carotenoides respecto de otros, en función tanto del grado de desarrollo como de la línea, permitieron establecer el signo de la regulación genética de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de estos metabolitos; lo que pone de manifiesto cómo la metabolómica puede proporcionar información “corriente arriba” sobre el genoma y el proteoma. Precursores de estos resultados, pero sin considerar la metabolómica, fueron los de Sandmann, Römer y Fraser (2006), que concluyeron que el metabolismo y la degradación son formas de control de los carotenoides en plantas. No obstante, estos autores no establecieron de forma inequívoca que mientras el metabolismo está regido por rutas bioquímicamente catalizadas, la degradación se produce por factores externos, como la luz o la temperatura, que pueden dar lugar a fotodegradación y termodegradación, respectivamente.

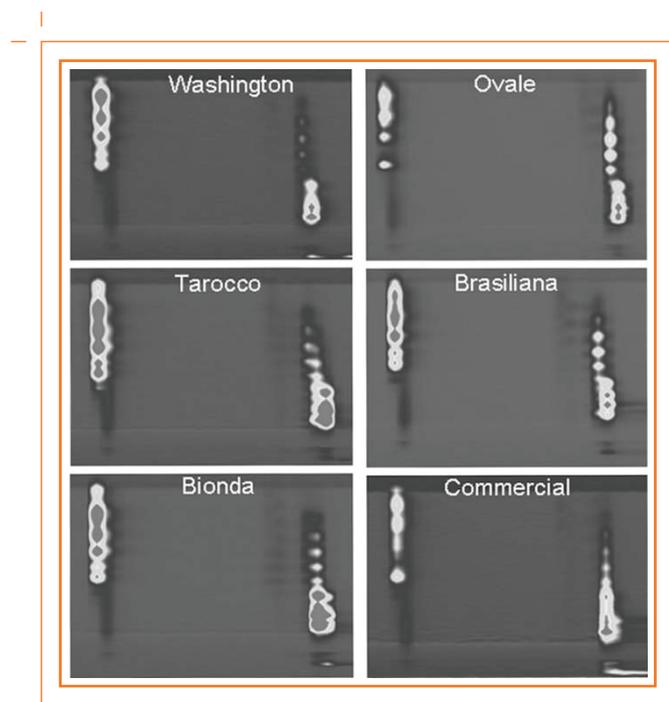
El estudio más reciente llevado a cabo por Van Meulebroek *et al.* (2014) se redujo al análisis de cinco carotenoides, a pesar de usar como palabras clave perfil metabólico. En realidad, los autores utilizaron los carotenoides luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno (representativos de xantofilas y carotenos) como mero ejemplo de la idoneidad de un equipo Orbitrap para realizar estudios en metabolómica. Con este propósito, optimizaron la extracción sólido-líquido seguida de la extracción líquido-líquido de estos compuestos en tomate y realizaron su análisis tanto mediante el acoplamiento LC con DAD y un espectrómetro de masas en tándem, como con un equipo Orbitrap-MS y compararon los resultados de ambos. Concluyeron los autores que este último equipo proporciona mayor sensibilidad y selectividad que el primero y que, a pesar de haberlo aplicado a un número tan reducido de metabolitos, los principios del Orbitrap permiten el cribado de todos los carotenoides conocidos y la búsqueda de compuestos

desconocidos. Los autores crearon una base de datos, utilizando la fórmula molecular de 355 de los carotenoides más relevantes, que correspondían a 137 fórmulas químicas diferentes, pero sin información de los tiempos de retención de esos compuestos; por lo que la identificación basada sólo en el ión  $[M+H]^+$  y el correspondiente ión isotópico  $^{13}C$  ha de considerarse sólo tentativa. Este es el principal problema al que se enfrenta la metabolómica vegetal: la ausencia de bases de datos bien establecidas, semejantes, por ejemplo, a la del metaboloma humano (<http://www.hmdb.ca/>), con las que poder realizar una identificación fiable de los metabolitos en estudio. Esta ausencia y el hecho de que no se conozca la información que la metabolómica puede proporcionar al estudio de los carotenoides, ha llevado a que la práctica totalidad de los estudios realizados se haya orientado a aspectos no relacionados con esta disciplina. Algunos ejemplos de este aserto se comentan a continuación.

Demostrar la capacidad del uso de dos columnas cromatográficas en serie para resolver mezclas complejas fue el objetivo perseguido por Dugo *et al.* (2008), que eligieron como modelo los carotenoides libres y esterificados del zumo o jugo de naranja para su análisis mediante LC-DAD/APCI-MS. Los autores pusieron de manifiesto la resolución

que proporciona la conjunción de las dos columnas en serie mostrando un cromatograma de 45 picos bien definidos obtenido mediante DAD en 110 min; resolución que no es necesaria teniendo en cuenta que el espectrómetro de masas en serie hace posible el análisis con mucha menor resolución temporal basado en la diferencia en la relación  $m/z$  de los compuestos que coeluyen. La ausencia de patrones de todos los metabolitos y de bases de datos bien establecidas sólo permitió la identificación de 25 de los 45 picos.

Un año más tarde, Dugo *et al.* (2009) realizaron un nuevo estudio utilizando zumo de siete variedades de naranjas y un equipo LC×LC-DAD-APCI-IT-TOF-MS para obtener “el modelo de carotenoides” de cada variedad, en el que incluyeron epoxicarotenoides. Los autores no aprovecharon la amplia información proporcionada por el binomio muestras-equipamiento analítico para hacer un exhaustivo tratamiento quimiométrico y estadístico, característico de la metabolómica, con el que llevar a cabo una discusión de gran interés en la que quedaran claramente de manifiesto las diferencias y semejanzas de estos metabolitos en las diferentes muestras y su relación con las rutas metabólicas a través de las cuales se formaron. Por el contrario, la discusión de los resultados obtenidos sólo se basó en el comentario de los cromatogramas que se muestran en la figura 5, de los que los autores consideraron se deducía información para conocer el



**FIGURA 5.** Comparación de los cromatogramas bidimensionales de los diferentes zumos de naranja estudiados. Con permiso de Wiley-VCH, Ref. Dugo *et al.* (2009).

grado de madurez de las naranjas, su frescura y la potencial adulteración del zumo.

La información obtenida por Gentili y Caretti (2011) en el estudio realizado mediante LC-DAD-MS-MS (triple cuadrupolo) en muestras de harina de maíz y kiwis verde y dorado, en las que determinaron cuatro carotenoides y cuatro vitaminas liposolubles, constituía, en principio, una base excelente para un estudio metabolómico orientado. No obstante, la investigación se redujo a la puesta a punto del método determinativo, su aplicación a las citadas muestras y una identificación en grado de tentativa incipiente de los metabolitos, puesto que el espectrómetro de masas utilizado se caracteriza por su sensibilidad, pero no por su capacidad para la identificación. También en este caso faltó el tratamiento quimiométrico y su interpretación para obtener información sobre las causas de las diferentes concentraciones de estos metabolitos en las muestras.

Estudios semejantes, en los que los autores optimizan y caracterizan un método para el análisis de carotenoides en una determinada materia prima vegetal basado en el uso de LC-DAD para la caracterización y cuantificación, y en el de un MS para validar la identificación sin entrar en juego la metabolómica, se comentan de forma más breve a continuación. De Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya (2009) realizaron un estudio de este tipo en pimiento verde y rojo, caracterizaron 20 carotenoides mediante LC-DAD, validaron 13 de ellos mediante MS y cuantificaron los cuatro que consideraron más importantes para establecer diferencias de concentración entre las dos variedades. Más recientemente, Giuffrida *et al.* (2013) realizaron un estudio semejante en 12 variedades de pimientos, correspondientes a tres cultivos, identificando de forma tentativa hasta 52 carotenoides y, en

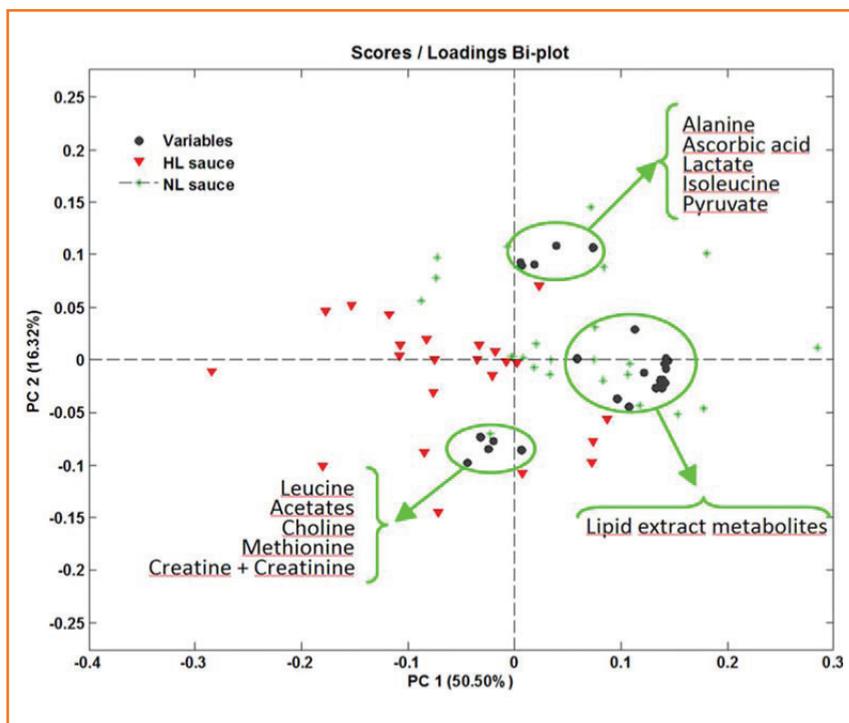
opinión de los autores, ofreciendo información importante sobre las diferentes rutas metabólicas en los tres cultivares estudiados. Esta información está sustentada exclusivamente en las tablas de compuestos y en la cuantificación de algunos de ellos.

Un estudio similar realizaron Fromm *et al.* (2012); en este caso en aceites de semillas de diferentes tipos de manzanas, con el propósito de conocer el contenido de carotenoides y tocoferoles para un aprovechamiento exhaustivo de estos desechos.

Una investigación que merece comentarse por su singularidad es la realizada por Donadio *et al.* (2011) en ciertas sales marinas, cuyo aroma se atribuye a compuestos derivados de carotenoides. Los autores utilizaron salmueras de estas salinas y un acoplamiento HS-SPME-GC-MS, con el que identificaron hasta 58 compuestos volátiles, de los cuales un número significativo se considera derivado de carotenoides: Los norisoprenoides, cuya existencia en las sales se atribuye a la presencia en las salinas de microorganismos, como microalgas, bacterias, hongos y levaduras. Un estudio metabolómico de esta microflora podría ser de enorme interés.

## METABOLISMO DE LOS CAROTENOIDES EN EL ORGANISMO HUMANO

Para saber cómo afectan al ser humano compuestos como los carotenoides es necesario conocer los procesos en los que están involucrados en el organismo. La metabolómica (más concretamente la nutrimetabolómica) es una herramienta muy útil para elucidar los mecanismos de digestión y asimilación en el intestino de los carotenoides, su transporte y acumulación,



**FIGURA 6.** PCA de los datos de  $^1\text{H-NMR}$  obtenidos en el análisis de suero de pacientes con una ingesta alta de carotenoides (rojo) y con una ingesta baja de carotenoides (verde) junto con algunos de los compuestos responsables de la diferenciación (negro). Con permiso de Omics Group, Ref. Bondia-Pons *et al.* (2013).

sus efectos y las rutas metabólicas implicadas en el proceso global. Sin embargo, las estrategias metabolómicas también se han utilizado muy escasamente con este fin.

La relación de la ingesta de carotenoides en la dieta con la disminución de la aparición de algunas enfermedades, como cáncer o de problemas cardiovasculares, parece estar sólidamente establecida en la actualidad (Darvin *et al.* 2011; Bolhassani, Khavari y Bathaie, 2014; Palace *et al.* 1999). Aspectos claves en la asimilación de los carotenoides, como

la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad, no se han estudiado hasta la fecha desde el punto de vista metabolómico.

Un artículo publicado recientemente (Bondia-Pons *et al.*, 2013) es el único en el que se incide en el binomio carotenoides-metabolómica. El objetivo de la investigación realizada fue discernir las diferencias en la respuesta nutricional de individuos sometidos a dietas que contienen salsas de tomates en dos grados de maduración evaluados por el contenido en licopeno (cohorte de 24 individuos jóvenes y sanos y cruce de dietas durante cuatro semanas). En las muestras de suero tomadas antes y después de la ingesta se analizaron las fracciones polar y lipídica mediante  $\text{H}^1\text{-NMR}$  y se diferenciaron los perfiles metabolómicos obtenidos en cada caso mediante análisis multivariante, y se identificaron algunos de los metabolitos responsables de esta diferenciación (*e.g.* creatina, creatinina, leucina, colina y metionina). Mediante PCA se discriminaron los sujetos con ingestas de licopeno alta y baja, y se relacionaron con los metabolitos afectados en cada caso, como se observa en la figura 6. En este estudio, sin embargo, se evaluó exclusivamente el efecto en sangre de la ingesta de carotenoides, pero no el proceso de digestión, en el que pueden verse más implicados otros factores, como la matriz del alimento o la microflora intestinal.

Investigaciones sobre distintos compartimentos del organismo en los que se acumulan los carotenoides han dado origen a diferentes publicaciones. Así, algunos estudios han evaluado la acumulación de los carotenoides en la piel, ya que se les atribuyen efectos protectores contra los rayos solares UV, con incremento de la microcirculación y disminución de la generación de radicales libres. Meinke *et al.* (2013) demostraron que la ingesta de carotenoides mediante suplementos alimenticios provocó un aumento de su acumulación en la

piel y, en consecuencia, una disminución en la concentración de radicales libres. Aguilar *et al.* (2014), por otro lado, establecieron la relación entre el aumento en la ingesta de frutas y verduras y la mayor acumulación de carotenoides en la piel, que a su vez correlacionaron con el contenido en sangre. En ambos estudios se obtuvo la concentración de carotenoides en piel mediante análisis *in vivo* usando espectrometría Raman de resonancia. Los datos del exhaustivo cuestionario proporcionado por cada participante posiblemente hubieran dado lugar a estudios metabólicos, además de los simples diagramas de barras realizados por los autores.

La acumulación de carotenoides que se produce en la retina ocular se considera que puede frenar los procesos que originan la degeneración macular, una de las principales causas de ceguera irreversible. Como base para cualquier estudio metabólico en esta área, Bhosale y Bernstein (2005) pusieron a punto un método de cuantificación de luteína, zeaxantina y 3'-oxoluteína en la retina de personas muertas basado en HPLC-APCI-MS. La sensibilidad del método permitió la cuantificación de la 3'-oxoluteína, un producto de oxidación de luteína y de zeaxantina; lo que puede constituir una excelente vía para estudiar el metabolismo de carotenoides en este compartimento tan sensible y crucial para el individuo.

La acumulación relativa de carotenoides en plasma y semen (ocho y cuatro carotenoides, respectivamente, considerados en el estudio) en pacientes fértiles e infértiles estudiada mediante HPLC-UV-FLD fue investigada por Benedetti *et al.* (2012). Los resultados obtenidos mostraron que una mayor concentración de carotenoides en sangre conlleva una mayor concentración en semen, lo que está relacionado directamente con la calidad del semen y la fertilidad del paciente. Este estudio deja entrever que las rutas metabólicas implicadas

en la conservación del semen podrían estar afectadas por la ingesta de carotenoides, pero se desconoce el proceso de incorporación de estos compuestos al semen, por lo que un estudio metabólico podría ser clave para aclarar este aspecto.

El efecto negativo del  $\beta$ -caroteno combinado con los compuestos oxidantes del tabaco en el desarrollo de cáncer de pulmón, revisado por Salerno, Crifò y Siems (2010), o la relación entre la concentraciones de carotenoides en suero materno y en suero fetal en el parto, estudiada por Scaife *et al.* (2007), son algunos ejemplos de la importancia de los carotenoides en el organismo humano. La necesidad de información de los procesos y rutas metabólicas implicados en cada caso abre una vía a futuros estudios metabólicos para su esclarecimiento y subsiguientes actuaciones. Una base sólida para estos estudios la constituye el método desarrollado por Ferreiro-Vera *et al.* (2011) para el análisis de carotenoides en plasma basado en el acoplamiento en línea de SPE automática y HPLC-DAD.

## RETOS PENDIENTES EN EL BINOMIO METABOLÓMICA-CAROTENOIDES

De los retos pendientes que engloban la metabólica y los carotenoides hay que distinguir entre los que se refieren a su biosíntesis y destino en plantas y los que se relacionan con las vías mediante las cuales el organismo humano los metaboliza.

A pesar de que se han hecho progresos significativos para explicar el metabolismo de los carotenoides en plantas, quedan todavía aspectos relevantes que no se han resuelto en mayor o menor proporción, como:

a) No se conocen suficientemente los mecanismos regulatorios globales que sustentan el metabolismo de los carotenoides y los elementos genéticos que regulan la expresión de los genes de la biosíntesis de estos metabolitos secundarios, por lo que la información “corriente arriba” que proporciona la metabómica puede ser importante para aclarar estos mecanismos.

b) Las moléculas señalizadoras que inician el desarrollo de los plastidios para la biosíntesis y acumulación de los carotenoides son muy poco conocidas, lo que debería constituir una línea de investigación primordial del binomio metabólica-carotenoides.

c) La acción de la luz en el control de la biosíntesis de carotenoides es bien conocida, pero cómo la luz regula realmente este proceso sigue siendo una incógnita para cuya resolución es imprescindible la metabómica.

d) La información de cómo el flujo metabólico se distribuye entre las diferentes ramas de las rutas biosintéticas de los isoprenoides es muy limitada, por lo que la flujómica, como ómica derivada de la metabómica, tiene un papel clave en la obtención de la información necesaria sobre este aspecto.

e) El conocimiento exhaustivo de las interacciones entre la ruta biosintética de los carotenoides y otras rutas, y la forma en que estas interacciones influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta es un reto en investigación claramente dependiente de la metabómica.

La forma en la que se produce la regulación de la renovación de los carotenoides en las plantas para mantener la homeostasis constituye otra de las asignaturas pendientes

del binomio considerado. Un estudio en profundidad de los diferentes aspectos implicados en la regulación de los carotenoides proporcionará conocimientos sobre los mecanismos regulatorios que facilitará las estrategias transgénicas para modificar el contenido y la composición de estos compuestos con resultados predecibles en las diferentes especies de plantas.

Con respecto al conjunto de procesos que experimentan los carotenoides en el ser humano, existen numerosas lagunas que impiden conocer en profundidad cómo se metabolizan estos compuestos. La gran mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha relacionan directamente la ingesta de carotenoides con su función final o su acumulación, pero en ellos no se considera qué ocurre en las etapas que tienen lugar entre ambos extremos, así como aspectos de esta área que deberían ser objeto de investigación son los siguientes:

a) El efecto que la digestión tiene sobre los carotenoides. Las reacciones químicas y bioquímicas en las que pueden estar implicados durante el proceso digestivo; el papel, posiblemente clave, de la microflora intestinal en los cambios producidos, que influirán de forma decisiva en la facilidad con que son absorbidos y transportados a los diferentes puntos de acción o acumulación.

b) Las vías de transporte de los carotenoides a fluidos biológicos, como la sangre, y los compuestos que pueden favorecer o dificultar este proceso son aspectos poco o nada conocidos que demandan investigación adecuada.

c) Las zonas de acumulación de los carotenoides en el organismo humano y, especialmente, su función en ellas. Aunque se ha comprobado la acumulación de estos

compuestos en zonas como la piel y la retina ocular, o en fluidos como el semen, poco se conoce acerca de las funciones que realizan, relacionadas o no con enfermedades u homeostasis.

d) El metabolismo de los carotenoides en el organismo, aparte de su carácter de precursores de vitaminas, está escasamente estudiado.

El estudio de todos estos aspectos podrá significar un mejor conocimiento de la implicación de los carotenoides en el organismo, así como al desarrollo de planes total o parcialmente personalizados para una ingesta adecuada de compuestos que conduzcan a conseguir mejoras en la salud de cada individuo.

### AGRADECIMIENTOS

A la Junta de Andalucía y al programa FEDER por el apoyo financiero a través del proyecto FQM-1602

## REFERENCIAS

- Aguilar, S.S., Wengreen, H.J., Lefevre, M., Madden, G.J. y Gast, J. 2014. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114: 1174-1180.
- Bednář, P., Papoušková, B., Müller, L., Barták, P., Stávek, J., Pavloušek, P. y Lemr, K. 2005. *Journal of Separation Science* 28: 1291-1299.
- Benedetti, S., Tagliamonte, M.C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., De Stefani, S., Palini, S. y Bulletti, C. 2012. *Reproductive Biomedicine Online* 25: 300-306.
- Beyoğlu, D. y Idle, J.R. 2013. *Biochemical Pharmacology* 85: 12-20.
- Bhosale, P. y Bernstein, P.S. 2005. *Analytical Biochemistry* 345: 296-301.
- Bolhassani, A., Khavari, A. y Bathaie, Z.S. 2014. *Biochimica et Biophysica Acta* 1845: 20-30.
- Bondia-Pons, I., Cañellas, N., Abete, I., Rodríguez, M.A., Perez-Cornago, A., Navas-Carretero, S., Zulet, M.A., Correig, X. y Martínez, J.A. 2013. *Omics: A Journal of Integrative Biology* 17: 611-618.
- Botella-Pavía, P. y Rodríguez-Concepción, M. 2006. *Physiologia Plantarum* 126: 369-381.
- Darwin, M.E., Sterry, W., Lademann, J. y Vergou T. 2011. *Molecules* 16: 10491-10506.
- De Azevedo-Meleiro, C.H. y Rodriguez-Amaya, D.B. 2009. *Journal of Separation Science* 32: 3652-3658.
- Donadio, C., Bialecki, A., Valla, A. y Dufossé, L. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 801-810.
- Dugo, P., Giuffrida, D., Herrero, M., Donato, P. y Mondello, L. 2009. *Journal of Separation Science* 32: 973-980.
- Dugo, P., Herrero, M., Giuffrida, D., Ragonese, C., Dugo, G. y Mondello, L. 2008. *Journal of Separation Science* 31: 2151-2160.
- Fernández-Peralbo, M.A., Ferreiro Vera, C., Priego-Capote, F. y Luque de Castro, M.D. 2014. *Talanta* 126: 170-176.
- Ferreiro-Vera, C., Mata-Granados, J.M., Quesada Gómez, J.M. y Luque de Castro, M.D. 2011. *Talanta* 85: 1842-1847.
- Fiehn, O. 2002. *Plant Molecular Biology* 48: 155-171.
- Fraser, P.D. Bramley, P. M. 2004. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Fromm, M., Bayha, S., Kammerer, D.R. y Carle, R. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10733-10742.
- Gentili, A. Caretti, F. 2011. *Journal of Chromatography A* 1218: 684-697.
- Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C. y Dugo, G. 2013. *Food Chemistry* 140: 794-802.

## REFERENCIAS

- Gomase, V.S., Changbhale, S.S., Patil, S.A. y Kale, K.V. 2008. *Current Drug Metabolism* 9: 89-98.
- Liao, B., Shen, C., Liang, F., Hong, S., Hsu, S., Jong, T. y Chang, C. J. 2010. *The Journal of Supercritical Fluids* 55: 169-175.
- Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., Van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C. y Giovannoni, J. 2004. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9897-9902.
- Lu, S. y Li L. 2008. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 778-785.
- Meinke, M.C., Friedrich, A., Tscherch, K., Haag, S.F., Darvin, M.E., Vollert, H., Groth, N., Lademann, J. y Rohn, S. 2013. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84: 365-373.
- Mustafa, A., Mijangos Treviño L., y Turner, C. 2012. *Molecules* 17: 1809-1818.
- Mustilli, A. C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F. y Bowler, C. 1999. *The Plant Cell* 11: 145-157.
- Neily, M.H., Matsukura, C., Maucourt, M., Bernillon, S., Deborde, C., Moing, A., Yin, Y., Saito, T., Mori, K., Asamizu, E., Rolin, D., Moriguchi, T. y Ezura, H. 2011. *Journal of Plant Physiology* 168: 242-252.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. y Sumitomo, K. 2006. *Plant Physiology* 142: 1193-1201.
- O'Neill, M.E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den Berg, H., Hinger, I., Rousell, A.M., Chopra, M., Southon, S. y Thurnham, D. I. 2001. *British Journal of Nutrition* 85: 499-507.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q. y Singal, P.K. 1999. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 746-761.
- Park, H.S., Choi, H., Lee, S.J., Park, K.W., Choi, S. y Kim, K.H. 2007. *The Journal of Supercritical Fluids* 42: 205-211.
- Porras, S.P. y Kenndler, E. 2005. *Electrophoresis* 26: 3203-3220.
- Salerno, C., Crifò, C. y Siems, W. 2010. *Central European Journal of Chemistry* 9: 1-6.
- Sandmann, G., Römer, S. y Fraser, P. D. 2006. *Metabolic Engineering* 8: 291-302.
- Scaife, A.R., McNeill, G., Campbell, D.M., Martindale, S., Devereux, G. y Seaton, A. 2007. *British Journal of Nutrition* 95: 771-778.
- Simkin, A.J., Gaffé, J., Alcaraz, J., Carde, J., Bramley, P.M., Fraser, P.D. y Kuntz, M. 2007. *Phytochemistry* 68: 1545-1556.
- Taylor, M. y Ramsay, G. 2005. *Physiologia Plantarum* 124: 143-151.

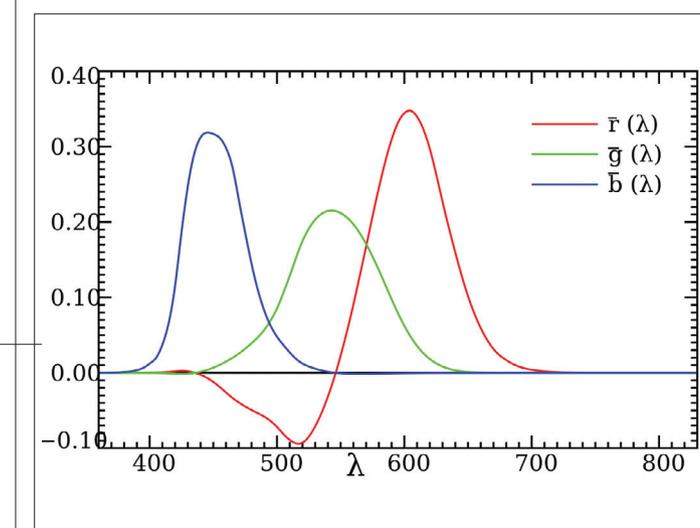
## REFERENCIAS

- Unger, M. 2009. *Planta Medica* 75: 735-745.
- Van Meulebroek, L., Vanden Bussche, J., Steppe, K. y Vanhaecke, L. 2014. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406: 2613-2626.
- Van Ruth, S., Alewijn, M, Rogers, K., Newton-Smith, E., Tena, N., Bollen, M. y Koot, A. 2011. *Food Chemistry* 126: 1299-1305.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J. y Xiong, Y. 2011. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 2131-2136.

## CAPÍTULO 6

# APLICACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ESPECTROMETRÍA VISIBLE Y DE COLOR AL ANÁLISIS DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS

Antonio J. Meléndez-Martínez, Isabel M. Vicario y Francisco J. Heredia



## INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos tiene un importante efecto psicológico en el consumidor, de ahí su relación bien establecida con la aceptación y el empleo extendido de colorantes en la industria alimentaria. La disponibilidad de métodos apropiados para evaluar este parámetro de calidad es, por consiguiente, una necesidad de esa industria. Aunque la evaluación visual se emplea en el control de calidad de alimentos y es de gran utilidad para algunos fines, los métodos instrumentales objetivos de medida del color ofrecen una serie de ventajas en el control de calidad en distintas fases de la producción, transformación y comercialización de los alimentos. Los carotenoides, son responsables del color de muchos alimentos y se usan como colorantes naturales, tanto individualmente (*e.g.*  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína) como en extractos (*e.g.* annatto, azafrán), si bien, como ya se ha comentado, su importancia va más allá de su papel como pigmentos. En este capítulo discutimos la aplicación de datos espectrométricos y de color en el análisis de carotenoides. Entre otros aspectos, se tratan la relación entre

su estructura química y el color —objetivamente medido— y la utilidad de parámetros de color y de las medidas de absorbancia y reflectancia en el visible para cuantificarlos.

## COLOR: DEFINICIÓN Y ATRIBUTOS

Cuando observamos una fuente de luz visible o un objeto iluminado por ella, los bastones (sensibles al blanco y negro) y conos (que responden a los estímulos de rojo, verde y azul) dentro de la retina envían información al cerebro, a través del nervio óptico, que se interpreta en términos de color. El color es por lo tanto un fenómeno psicofísico y complejo, relacionado principalmente con la energía radiante espectral de una fuente de luz visible, la fisiología de la visión y la psicología del observador. La percepción del color de un objeto depende en cierta medida de su composición, aunque esto no significa que el color sea una propiedad inherente del objeto, que puede absorber parte de la luz visible que le llega y reflejar, transmitir o dispersar el resto. De hecho, el color percibido del objeto cambia si cambiamos las características espectrales de la fuente que lo ilumina (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994). Es importante considerar que el color es uno de los componentes de la apariencia de los alimentos más relacionados con la percepción de la calidad, aunque la apariencia es un concepto más amplio que abarca también otros atributos como brillo, forma y textura visual (Francis, 1995; Hutchings, 1994).

Según Francis (1995), el color puede definirse como “el impacto de las longitudes de onda de la luz del espectro visible de 390 a 760 nm en la retina humana”. Es decir, el color puede definirse como una respuesta mental al estímulo que produce una radiación luminosa visible en la retina, que es

transmitida al cerebro por el nervio óptico. Otra definición es la proporcionada por Wyszecki y Stiles (2000); según estos autores el color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir las diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, por las diferencias en la composición espectral de la energía radiante en la observación.

El estímulo colorimétrico se compone de tres sensaciones distintas, aunque a veces hay leves discrepancias con respecto a los términos utilizados para su definición. Estos atributos se denominan generalmente como matiz, luminosidad o brillo y saturación, croma o colorido (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994). Hunt (1998) define tres atributos de las sensaciones visuales, denominadas, brillo, tono y colorido: *a)* brillo es el atributo según el cual un área parece exhibir más o menos luz; *b)* el tono de un color es el atributo de la sensación visual según la cual el estímulo aparece similar a uno de los colores percibidos: rojo, verde, amarillo y azul o a ciertas proporciones de dos de ellos; se considera el atributo cualitativo del color y está relacionado con la longitud de onda dominante del espectro, y *c)* el colorido es el atributo según el cual un área parece exhibir más o menos de su tono.

Además, definió tres términos subjetivos y relativos de la siguiente manera: *a)* luminosidad: brillo de un área evaluado en relación con el brillo de un área similar iluminada que parece blanca o altamente transmisiva, *b)* croma: es el colorido de una zona juzgada en relación con la luminosidad de un área iluminada de forma similar que parece blanca o altamente transmisiva y *c)* saturación: el colorido de una zona juzgado en relación con su brillo.

## ¿POR QUÉ LOS CAROTENOIDES SON COLOREADOS?

Cuando los electrones de los átomos o de las moléculas absorben un cuanto de energía de la radiación electromagnética se producen transiciones energéticas de un estado de menor energía a otro de mayor energía. La absorción de la radiación ocurre cuando su energía (E) coincide con la diferencia de energía entre los dos estados energéticos. No obstante, no todas las transiciones electrónicas son posibles. La energía de la radiación puede expresarse según la siguiente fórmula:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad [1]$$

donde E es la cantidad de energía, h es la constante de Planck,  $\nu$  la frecuencia de la radiación, c la velocidad de la luz y  $\lambda$  la longitud de onda.

En las moléculas los núcleos rotan y vibran, por lo que un electrón en su estado basal o excitado puede existir en varios niveles de energía vibracional. A su vez, para cada uno de ellos, son posibles varios niveles de energía rotacional. A diferencia de lo que ocurre con los átomos, en el caso de las moléculas la transición electrónica no tiene un requerimiento energético específico, ya que podría ocurrir por una variedad de cuantos de energía que coincidan con las diferencias de energía entre el estado basal y excitado para los distintos niveles de energía vibracional y rotacional. Por lo tanto, los espectros de absorción de las moléculas contienen bandas de absorción en lugar de líneas, ya que la absorción de la luz ocurre en un rango de longitudes de onda (Britton 1983; 1995).

En el caso de los carotenoides, la transición electrónica relevante se produce entre un orbital molecular pi enlazante ( $\pi$ )

y un orbital molecular pi antienlazante ( $\pi^*$ ), tal que uno de los electrones  $\pi$  de la cadena poliénica es ascendido a un orbital  $\pi^*$  previamente desocupado. Debido al hecho de que los electrones  $\pi$  están altamente deslocalizados en el cromóforo de dobles enlaces conjugados (d.e.c.), el estado excitado es de poca energía en comparación con otras moléculas, así que la energía de la radiación visible (ca. 380-770 nm) es suficiente para producir las transiciones electrónicas (Britton, 1983; 1995).

Los carotenoides absorben fundamentalmente luz violeta y azulada (ca. 400-500 nm), por lo que típicamente exhiben tonalidades amarillentas, anaranjadas o rojizas. No obstante la gama de colores de estos isoprenoides puede ampliarse al azul, púrpura y verde mediante la formación de complejos con proteínas (Britton, 1992). Al menos son necesarios siete dobles enlaces conjugados (d.e.c) para que un carotenoide sea coloreado, así los carotenoides más saturados como fitoeno y fitoflueno (con 3 y 5 d.e.c., respectivamente, figura 4, del capítulo 1) son incoloros (Rodríguez-Amaya 2001).

## LA IMPORTANCIA DEL COLOR EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El color de los productos alimentarios es de gran interés en la industria debido al efecto psicológico que ejerce sobre los consumidores (véase el capítulo 7). El papel del color en la aceptación de los alimentos va más allá de lo visual, ya que con frecuencia suele estar asociado con otras expectativas sensoriales (como aroma y gusto) (Fernández-Vázquez *et al.*, 2014), de ahí que a veces se hable de sinestesia cromática. También es importante considerar que, en la mayoría de los casos, el consumidor no está familiarizado con la naturaleza

física del color, y que mira el producto como si su color fuese constante y no dependiente de factores como el tipo de luz que lo ilumina. En otras palabras, se puede decir que aunque el color tiene gran importancia en la adquisición o el rechazo de un producto, estas asociaciones también pueden ser engañosas o infundadas en algunas ocasiones.

Según Clydesdale (1993) hay asociaciones alimentos-colores aceptables que se desarrollan a una edad temprana y nos llevan a rechazar ciertos alimentos que no presentan las características colorimétricas esperadas. En este sentido, el color a menudo se relaciona con la seguridad, grado de madurez, estado y grado de cocción y el efecto del procesado industrial o almacenamiento, entre otros factores. El hecho de que los alimentos tengan asociado un color característico está muy relacionado con la generalización del uso de colorantes en la industria, con el objetivo último de hacerlos más atractivos.

El color también es muy importante en relación con la aceptabilidad de los alimentos con base en factores culturales y publicitarios. Por ejemplo, un español rechazará naranjas con áreas verdes en la piel, ya que las considerará inmaduras, mientras que este es el aspecto que se espera de las naranjas maduras en países tropicales. Por otra parte, la publicidad puede llevar a los consumidores a comprar un producto con un color extraño.

## ANÁLISIS VISUAL DEL COLOR

En principio, el color de los alimentos puede evaluarse visual u objetivamente mediante instrumentos apropiados y en condiciones adecuadas.

La evaluación visual puede realizarse mediante la comparación de las características colorimétricas de la muestra con las de los elementos contenidos en escalas o atlas de color (sistema DIN, sistema Munsell, sistema OSA-UCS, sistema Ostwald, etc.). Otro ejemplo de este tipo de análisis visual es la comparación del color de los zumos de naranja con los de colores de estándares de plástico desarrollados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2005). Estas colecciones pueden ser útiles en la industria alimentaria para diversos objetivos. Además, son portátiles y estables en cierta medida, aunque estudios recientes han revelado varios problemas en una escala de colores utilizados para el análisis visual de aceite de oliva (Melgosa *et al.*, 2000; Melgosa *et al.*, 2001, Moyano *et al.*, 1999). El análisis visual del color de los alimentos es una herramienta insustituible en la industria alimentaria y se trata en profundidad en el capítulo 7. No obstante, para la evaluación objetiva deben utilizarse métodos instrumentales.

## ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL COLOR

La medida y definición objetiva del color es un propósito perseguido desde hace siglos por numerosos científicos como Newton, Young, Helmholtz, Grassmann, Maxwell, Adams, Munsell, Hunter y muchos otros.

Tradicionalmente se han utilizado tres tipos de aparatos para el análisis instrumental del color: colorímetros, espectrofotómetros y espectrorradiómetros.

Los colorímetros miden el color de fuentes de radiación primarias (que emiten luz propia) y secundarias (que reflejan o transmiten luz externa). Estos aparatos poseen filtros de color

que conducen a la obtención directa de los valores triestímulo X, Y, Z de forma óptica, no matemática (Artigas, 2002). El colorímetro reproduce la respuesta de sólo un observador patrón y un iluminante estándar preestablecidos, por lo que los valores obtenidos pueden ser distintos para cada instrumento.

Los espectrofotómetros, en cambio, miden la distribución espectral, de medidas relativas de transmitancia o reflectancia de un objeto a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones teóricas. Los valores triestímulo (X, Y, Z) obtenidos dependen del iluminante, la geometría de la medida y del observador (Hutchings, 1994). Tanto la transmitancia como la reflectancia son propiedades relativas, intrínsecas del objeto, que no se modifican con la iluminación recibida ni con el observador, hecho que sí ocurre con el color. En el espectrofotómetro la medida de la transmitancia es el cociente entre la respuesta del instrumento en presencia de muestra y cuando la muestra no está en el camino óptico.

Los espectrorradiómetros fueron diseñados para la medida radiométrica de la distribución espectral de una fuente de radiación primaria o secundaria (Wyszecki y Stiles, 2000). Al igual que en el caso de los espectrofotómetros, los valores triestímulo se obtienen matemáticamente. El espectrorradiómetro tiene los mismos componentes que el espectrofotómetro con la excepción de la fuente de luz que, en este caso, es externa al instrumento y, por lo tanto, variable. Aunque no es su uso específico, se utilizan también para la medida de la transmitancia o reflectancia de una muestra, modificando la posición relativa de la fuente de iluminación.

Aparte de estos instrumentos clásicos existen otros, como por ejemplo aparatos que llevan a cabo un análisis digital de imágenes. Esta técnica de análisis de imágenes se ha

usado para muchos fines, entre ellos para evaluar el color de tomates y productos derivados en relación con su contenido de licopeno (Stinco *et al.*, 2013).

Como resultado de las medidas instrumentales el color puede definirse numéricamente, para lo cual las características de los tres componentes que intervienen en el proceso (fuente de luz visible, objeto y observador) y otras condiciones (como ancho de banda y las geometrías de iluminación y observación, entre otros) deben tomarse en cuenta y definirse (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994).

La colorimetría es la disciplina que se ocupa de la especificación numérica de un estímulo visual definido de tal forma que (Wyszecki y Stiles, 2000):

a) Estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con la visión normal de los colores. Es decir, existe una perfecta igualación de color (*colour matching*); b) estímulos que aparecen iguales tienen la misma especificación, y c) los números que especifican el estímulo son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de la energía radiante espectral del mismo.

Las leyes experimentales de igualación de color se resumen en el principio conocido como “generalización tricromática”. Este principio establece que bajo un amplio rango de condiciones de observación, muchos estímulos de color pueden igualarse por mezclas aditivas de tres estímulos primarios, cuyas energías radiantes han sido previamente ajustadas y fijadas (Wyszecki y Stiles, 2000). Las leyes aplicables a la generalización tricromática se pueden expresar geoméricamente por medio de un espacio tridimensional

denominado espacio triestímulo. En este espacio, cada estímulo de color puede ser representado por medio de un vector que expresa las cantidades proporcionales de los estímulos primarios rojos, verdes y azules que lo originan (Wyszecki y Stiles, 2000).

La Comisión Internacional de Iluminación (CIE, por sus siglas en francés) ha propuesto progresivamente diferentes espacios de color (CIEXYZ, CIELUV, CIELAB), observadores (observador de referencia colorimétrica CIE 2° y CIE 10°) e iluminantes (A, B, C, D<sub>65</sub>, D<sub>75</sub>, D<sub>55</sub>) y de las ecuaciones de color básico y el concepto original de espacio triestímulo (Wyszecki y Stiles, 2000). Como resultado, cada estímulo de color puede definirse numéricamente y representarse en un espacio de color.

Actualmente, el espacio de color más utilizado es CIELAB (CIE, 1978). Los parámetros de este espacio son los siguientes: a) L\* es una estimación de la luminosidad relativa; según este parámetro cualquier color puede considerarse equivalente a un miembro de la escala de grises, entre el negro (L\* = 0) y el blanco (L\* = 100); b) a\* toma valores positivos para los colores rojizos y valores negativos para los verdosos, y c) b\* toma valores positivos para los colores amarillentos y valores negativos para los azulados.

Estos parámetros se relacionan matemáticamente con los valores triestímulo X, Y, Z.

A partir de los parámetros colorimétricos a\* y b\* se definen los parámetros psicométricos, croma (C\*<sub>ab</sub>) y tono (h<sub>ab</sub>): C\*<sub>ab</sub> permite determinar para cada tono su grado de diferencia en comparación con un color gris de la misma luminosidad y se relaciona con el atributo cuantitativo de colorido. Tono (h<sub>ab</sub>) es el atributo según el cual los colores han sido tradicionalmente

definidos como rojizos, verdosos, etc. Es considerado el atributo cualitativo de colorido.

Matemáticamente, estos parámetros psicométricos se definen como sigue:

$$C_{ab}^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad [2]$$

$$h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad [3]$$

Estos parámetros definen un espacio de color uniforme en el que se puede representar cada estímulo visual. En la figura 2

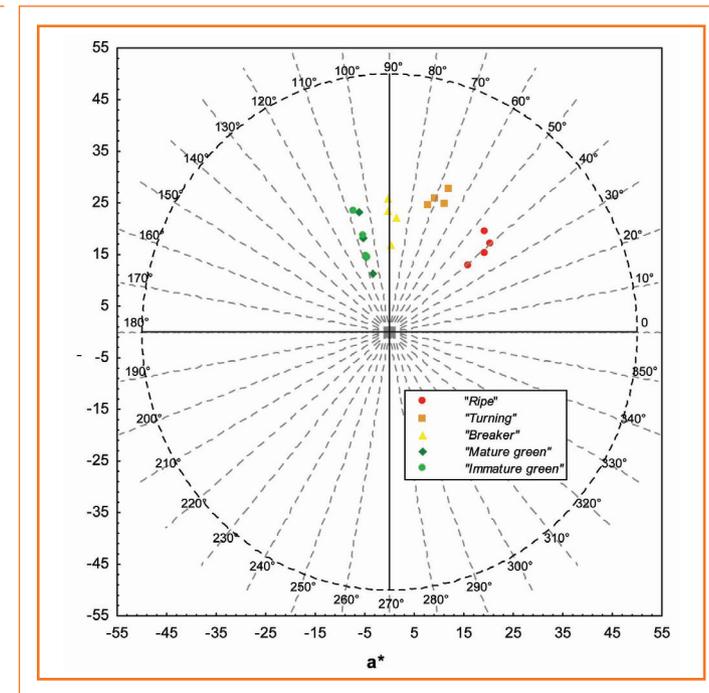


FIGURA 1. Distribución de muestras de tomate en distintos estados de desarrollo en el plano a\* b\*.

se presenta la distribución de diferentes muestras de tomate en distintos estados de desarrollo en el plano  $a^* b^*$ .

Las diferencias de color en el espacio CIELAB se han calculado tradicionalmente aplicando la siguiente fórmula:

$$\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [4]$$

De igual forma, las diferencias en los parámetros de color en este espacio se pueden calcular de la siguiente manera:

$$\Delta L^* = L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{estándar}} \quad [5]$$

$$\Delta a^* = a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{estándar}} \quad [6]$$

$$\Delta b^* = b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{estándar}} \quad [7]$$

$$\Delta C^* = C^*_{\text{muestra}} - C^*_{\text{estándar}} \quad [8]$$

Para entender las diferencias de color como la suma de sus componentes angulares ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h_{ab}$ ) y poder expresarlo aritméticamente como la suma de ellos, un nuevo parámetro relacionado con la diferencia de tono se define de la siguiente forma:

$$\Delta H^* = (\Delta E^{*2} - \Delta L^{*2} - \Delta C^{*2})^{1/2} \quad [9]$$

## VENTAJAS DE LA EVALUACIÓN OBJETIVA DEL COLOR

La principal ventaja de la evaluación objetiva instrumental del color en relación con los métodos visuales es que se puede eliminar el inevitable componente subjetivo de estos últimos. De esta manera, se facilita la comunicación entre científicos, técnicos, productores, fabricantes, proveedores y compradores. Además, la medida instrumental de color ofrece una serie de ventajas que la hacen una herramienta apropiada para el control de calidad en la industria agroalimentaria, en el campo o en el mercado. Algunas de éstas son las siguientes:

- Simplicidad: aunque los conceptos físicos y matemáticos subyacentes a los conceptos básicos de colorimetría son complejos, el manejo de instrumentos para el análisis de color es sumamente sencillo. De hecho, cualquier persona se puede entrenar para su uso en un corto tiempo.
- Fácil interpretación de los resultados: aunque existen diferencias sutiles en el significado de los atributos de color (como los enumerados en la primera sección) la interpretación de los parámetros de color del espacio CIELAB es bastante sencilla.
- Asequibilidad: hay una gran variedad de instrumentos que se adaptan a cada necesidad y muchos de ellos son asequibles para casi cualquier departamento de control de calidad.
- Rapidez: las lecturas de color se pueden hacer en segundos.

- La mayoría de las mediciones de color no requieren la manipulación de la muestra en absoluto. En otras ocasiones es mínima (filtración, homogeneización).
- Portabilidad: existe una gran variedad de instrumentos portátiles.
- Posibilidad de automatización: algunos aparatos ofrecen la posibilidad de realizar las lecturas automáticamente a intervalos de tiempo definibles, lo cual puede usarse para llevar a cabo un control en línea del color de los alimentos.
- Versatilidad: la instrumentación de color puede adaptarse para llevar a cabo diferentes tipos de mediciones (transmisión, reflexión, dispersión, etc.).
- Volumen de información: en cuestión de segundos pueden obtenerse cientos de datos colorimétricos y espectrométricos. Es decir, se genera una gran cantidad de datos, de la cual se puede extraer información mediante tratamientos estadísticos apropiados.

## POSIBLES APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE PIGMENTOS EN LOS ALIMENTOS

El color de los alimentos se debe fundamentalmente a los pigmentos que contienen. Por lo tanto es razonable pensar que tanto los datos de espectrometría visible como los parámetros de color obtenidos a partir de ellos pueden ser útiles para su determinación. Es lógico pensar que la cantidad de luz absorbida por un alimento se puede correlacionar con la cantidad de pigmentos que contiene. Asimismo, el tipo de luz

absorbida, que depende de las características de los cromóforos de los pigmentos, podría ser útil para su análisis cualitativo.

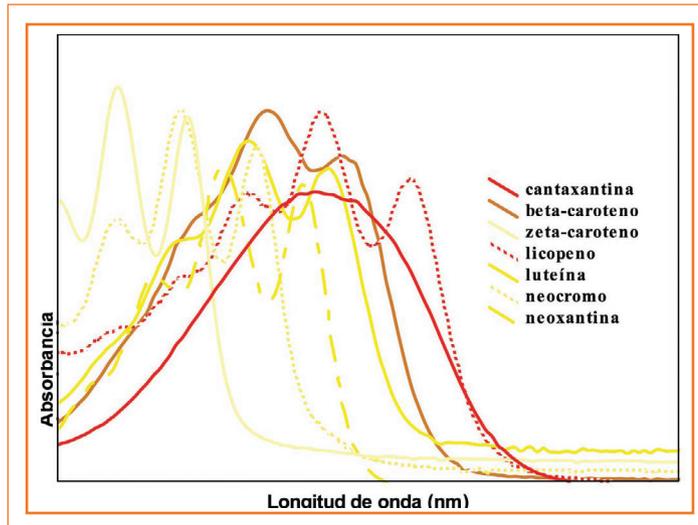
Las características y ventajas de las medidas instrumentales de color de los alimentos son muy interesantes no sólo para el control de calidad del color, sino también para la evaluación del contenido de pigmentos. Así, por ejemplo, el análisis por triplicado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de una muestra de zumo o jugo de naranja para determinar su contenido de carotenoides requiere no menos de dos horas, ya que los carotenoides deben ser extraídos, saponificados y analizados. Además tales operaciones implican un riesgo importante de degradación (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Por el contrario, por medio de medidas de color podríamos obtener una estimación quizá algo menos precisa pero de forma casi instantánea del contenido de carotenoides del zumo (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

En relación con todo esto parece razonable afirmar que la medida instrumental del color de los alimentos en combinación con métodos estadísticos apropiados podría ser útil para:

- El análisis cuantitativo y cualitativo de pigmentos. La evaluación rápida de los pigmentos a través de los parámetros de color tendría muchas aplicaciones en la industria alimentaria, en el campo y en el mercado. Además, puede ser útil en disciplinas como la ciencia de los alimentos, de las plantas o ciencias agrícolas, entre otras, donde a veces es necesario analizar grandes poblaciones de muestras.
- Evaluar etapas de desarrollo en función del contenido de pigmentos, ya que la degradación de la clorofila y el aumento en la biosíntesis de otros pigmentos es una

característica del proceso de maduración de los frutos.

- Evaluar los cambios cuantitativos y cualitativos de pigmentos como resultado del procesado o del almacenamiento, entre otros factores. Esto podría ser útil para optimizar dichos procesos o para determinar la vida útil de los productos.
- Clasificar los alimentos según su calidad con base en su contenido de pigmentos-color puesto que el color es un atributo clave de calidad y algunos pigmentos tienen importancia nutricional.
- Evaluar algunas propiedades de los alimentos relacionadas con los pigmentos que contienen, de forma más rápida y sencilla. Dos ejemplos serían la actividad



**FIGURA 2.** Detalle de los espectros visibles en acetona de cantaxantina,  $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno, licopeno, luteína, neocromo y neoxantina.

teórica como vitamina A en alimentos que contengan carotenoides provitamínicos y la capacidad antioxidante *in vitro* de alimentos o formulaciones que contengan ciertos pigmentos. Con respecto a este último aspecto, hay que considerar que la actividad antioxidante *in vivo* de algunos pigmentos y sus posibles mecanismos de actuación son temas aún controvertidos. En este sentido la valoración de la capacidad antioxidante *in vitro* podría estar de alguna manera relacionada con la estabilidad de los productos o su valor como ingredientes funcionales, pero no es extrapolable a la actividad antioxidante *in vivo*.

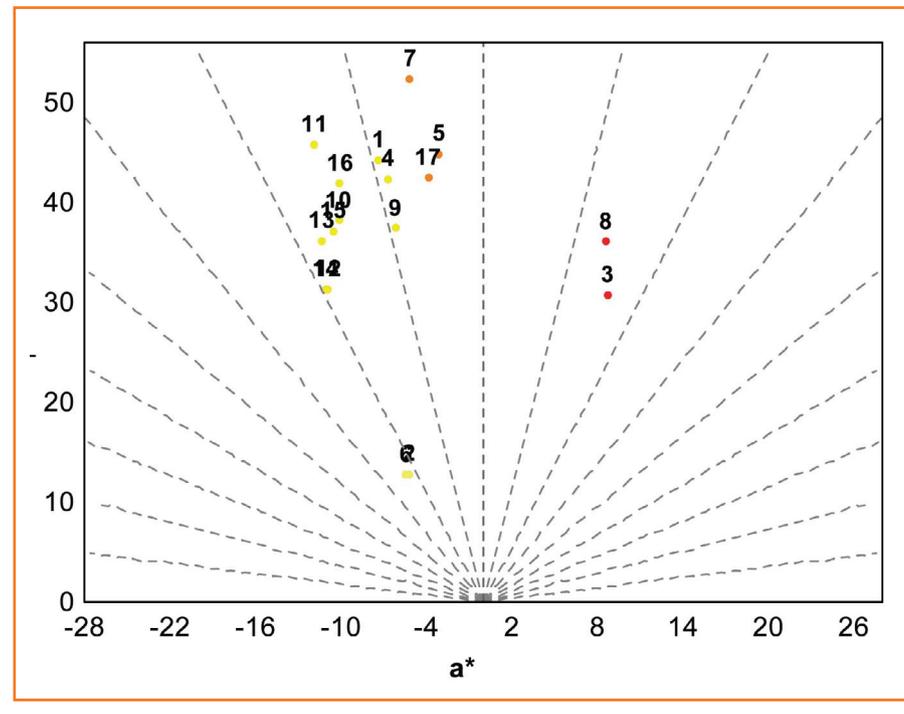
## RELACIONES COLOR-CAROTENOIDES

### Relaciones estructura-espectro visible de los carotenoides

La relación entre la estructura química de los carotenoides, la localización de sus máximos de absorción visible ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) y la forma de los espectros es bien conocida y ha sido tratada en detalle en el capítulo 1. El examen de las características espectroscópicas es muy útil para propósitos analíticos (Britton, 1995).

### Relaciones estructura-color de carotenoides

Las relaciones entre las estructuras químicas de los carotenoides y sus espectros de absorción son bien conocidas, como ya se ha indicado. Sin embargo aún hay mucho por hacer en lo que se refiere al estudio del efecto que las modificaciones de los carotenoides tienen en el color de alimentos u otras matrices. Por ejemplo,



también puede ser útil para detectar estos cambios visuales. La evaluación instrumental de color de 16 carotenoides alimentarios en soluciones de acetona a la misma concentración ayudó a obtener interesantes observaciones en esta sentido (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). En la figura 2, se muestran los espectros de absorción visible de algunos de los carotenoides evaluados.

La representación de los datos en el plano  $a^*b^*$  (figura 3) mostró que los pigmentos cíclicos anaranjados y amarillentos analizados se agruparon claramente según el número d.e.c. en sus cromóforos en el segundo cuadrante (valores negativos  $a^*$  y valores positivos  $b^*$ ).

Se observó una disminución del valor de  $a^*$  desde los carotenoides con 11 d.e.c. ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina) a los de 10 d.e.c. ( $\alpha$ -caroteno, luteína y anteraxantina) y 9 d.e.c. (violaxantina, neoxantina luteína epóxido y mutatoxantina). Los carotenoides con 8 d.e.c. (luteoxantina y neocromo) presentaron valores de  $a^*$  similares a aquellos con 9 d.e.c., aunque bajos valores de  $b^*$ , que indican cierta pérdida de color amarillo. Los pigmentos con 7 d.e.c. (auroxantina y  $\zeta$ -caroteno) mostraron valores de  $a^*$  similares a aquellos con 10 d.e.c., pero valores de  $b^*$  mucho más bajos que en los restantes grupos.

Los dos carotenoides rojizos analizados, el acíclico licopeno (11 d.e.c.) y cantaxantina (contiene 13 d.e.c., cuatro de ellos endocíclicos) estaban claramente separados del resto en el primer cuadrante (valores positivos de  $a^*$  y  $b^*$ ). Los valores de tono de los carotenoides de color rojizo fueron aproximadamente  $75^\circ$ , mientras que los correspondientes a los restantes pigmentos estudiados oscilaron entre aproximadamente  $94^\circ$  y  $113^\circ$ .

**FIGURA 3.** Representación de los valores de  $a^*$  y  $b^*$  de disoluciones de carotenoides en el plano  $a^*b^*$ . 1. Anteraxantina; 2. Auroxantina; 3. Cantaxantina; 4.  $\alpha$ -Caroteno; 5.  $\beta$ -Caroteno; 6.  $\zeta$ -Caroteno; 7.  $\beta$ -Criptoxantina; 8. Licopeno; 9. Luteína; 10. Luteína epóxido (1); 11. Luteína epóxido (2); 12. Luteoxantina; 13. Mutatoxantina; 14. Neocromo; 15. Neoxantina; 16. Violaxantina; 17. Zeaxantina.

durante el procesado y almacenamiento de los alimentos que contienen carotenoides pueden ocurrir cambios que afectan su cromóforo, como por ejemplo reordenamientos de carotenoides 5,6-epóxido a carotenoides 5,8-furanoides o rupturas oxidativas, entre otros. Esta información puede ser muy valiosa para hacer un seguimiento rápido de estos cambios por medio de medidas instrumentales de color. La traducción de la información espectrométrica (como por ejemplo desplazamientos hipsocrómicos y batocrómicos, efectos hipocrómicos o hiperocrómicos) en información de color (cambios en los valores de croma o tono, por ejemplo)

En cuanto a los valores de croma, todos los pigmentos estudiados presentaron valores entre 31-53 unidades CIELAB, excepto los carotenoides con 7 d.e.c., con valores notablemente inferiores (alrededor de 14 unidades CIELAB) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Sobre el efecto de la isomerización de 5,6-epóxidos a 5,8-furanoides en su color, se observó que como resultado de la reordenación de un grupo 5,6-epóxido en anteraxantina, neoxantina y violaxantina para dar mutatoxantina, neocromo y luteoxantina, respectivamente, se produjo una disminución en los valores de  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y aumentos en el  $h_{ab}$ . No obstante, la conversión del grupo restante 5,6-epóxido en luteoxantina para dar auroxantina produjo un incremento de en  $a^*$  y  $h_{ab}$  y marcadas disminuciones de  $C_{ab}^*$  y  $b^*$  (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Recientemente se ha estudiado el efecto de la epoxidación y la rotura oxidativa del  $\beta$ -caroteno en los parámetros de color, observándose que ambas reacciones conducen a importantes descensos en los valores de  $b^*$  y  $C_{ab}^*$ . Eso indica que estos parámetros pueden ser útiles para monitorear la oxidación mediante estos mecanismos de este carotenoide provitamina A (Gurak *et al.*, 2014).

## Efectos de cambios químicos en el color de los carotenoides

Los efectos de distintos tratamientos y condiciones de almacenamiento sobre el contenido de carotenoides y el color de los alimentos han sido estudiados por varios autores. Por ejemplo, Cortés *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la pasteurización en diferentes condiciones y mediante pulsos

eléctricos de alta intensidad (PEAI) sobre el color y el perfil de carotenoides del zumo de naranja. Los tratamientos PEAJ provocaron menores disminuciones en el contenido de carotenoides que la pasteurización, y los cambios en el contenido de pigmentos estuvieron acompañados de disminuciones en  $a^*$  y aumentos en  $b^*$ . Además, indicaron que los tratamientos podrían conducir a cambios de color visualmente perceptibles por los consumidores.

Chen, Peng y Chen (1995) evaluaron los cambios en el perfil de carotenoides y el color de zumos de zanahoria sometidos a diferentes condiciones de procesado y observaron isomerizaciones  $Z/E$  que, en algunos casos, estuvieron acompañadas de cambios en el tono de naranja a amarillo.

Más recientemente, en un zumo modelo de manzana de acajú (*Anacardium occidentale*) sometido a diferentes tratamientos térmicos se observaron importantes cambios de color provocados fundamentalmente por isomerizaciones ( $Z/E$  y de grupos 5,6 epóxidos a 5,8-furanoides) y oxidaciones en los carotenoides (Zepka y Mercadante, 2009; Zepka *et al.*, 2009).

Las isomerizaciones de carotenoides 5,6-epóxido a 5,8-furanoides (figura 4) están causadas por condiciones ácidas y se ven favorecidas en algunos alimentos, como los zumos de cítricos, una vez que se pierde la compartimentación celular. En este sentido, se han observado cambios de color, algunos de los cuales son visualmente perceptibles, como consecuencia de la progresiva isomerización de anteraxantina y violaxantina a sus isómeros 5,8-furanoides (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2009; Melendez-Martínez *et al.*, 2010).

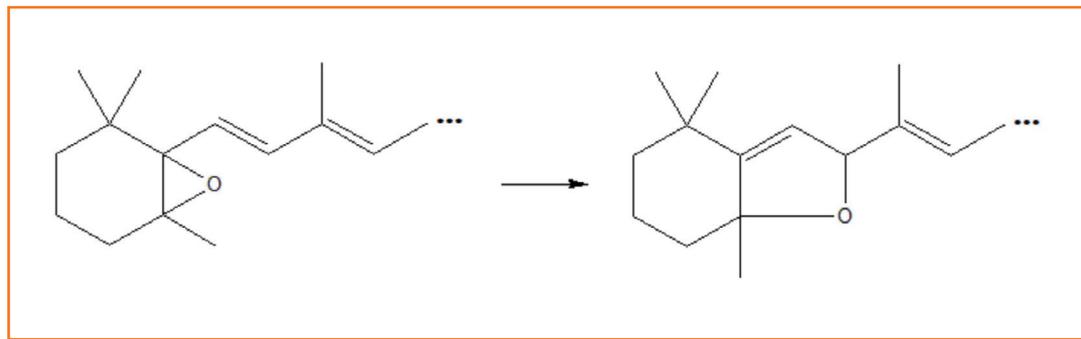


FIGURA 4. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

### Estimación del contenido de carotenoides a partir de medidas de absorbancia-reflectancia y de color

Existe una gran variedad de estudios sobre el color y el contenido de carotenoides de diversos alimentos como los frutos cítricos (Lee y Castle, 2001; Shim y Kim, 2002; Cortés *et al.*, 2006, Beltrán González *et al.*, 2008; Van Wyk, Huysamer y Barry, 2009), zanahorias (Bao y Chang, 1994; Chen, Peng y Chen, 1995), tomates (Heredia *et al.*, 2009; Meléndez-Martínez *et al.*, 2010) y otros (Pérez-López *et al.*, 2007; Gómez-Ladrón de Guevara *et al.*, 1996; Cano *et al.*, 1996). No obstante, en algunos casos las relaciones entre ambos no han sido estudiadas en profundidad.

### Determinación de carotenoides a partir de medidas de absorbancia

La absorción visible intensa de los carotenoides también es la base para su análisis cuantitativo, aspecto que se trata en el capítulo 1.

La exactitud en la cuantificación de carotenoides depende de la exactitud de los coeficientes de absorción. Para su determinación se recomienda pesar entre 1 y 2 mg del pigmento puro (con una exactitud de  $\pm 0.001$  mg.) y disolverlos completamente en un disolvente apropiado (Britton, 1995), algo que no es tan simple como podría parecer, sobre todo si los carotenoides

están cristalizados, por lo que el contenido de carotenoides a menudo se subestima (Britton, 1992). De todo esto, se puede deducir fácilmente que el análisis cuantitativo de los carotenoides implica cierto grado de inexactitud. En este sentido, también es importante tener en cuenta que los coeficientes de absorción de los isómeros *Z* son notablemente más bajos que los correspondientes a sus homólogos (todo-*E*). No obstante, pocos se han determinado experimentalmente hasta la fecha (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004), así que la cuantificación de estos isómeros mediante el uso de los coeficientes correspondientes a los isómeros todo-*E*, implica un mayor nivel de imprecisión.

Por otra parte, cuando no se ha determinado experimentalmente el coeficiente de absorción específico ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) de un carotenoide o se pretende evaluar la concentración de un extracto de carotenoides, se suele emplear un valor arbitrario de 2500 (Britton y Young, 1993). Sin embargo, este procedimiento lleva a una subestimación notable de estos pigmentos en el caso del zumo de naranja (Meléndez-Martínez, 2005) y probablemente de otros muchos productos.

Además de la metodología clásica a la que nos hemos referido en este apartado y en el capítulo 1, se han propuesto otras para algunas aplicaciones. Así, cabe mencionar la descrita por Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera (2001), quienes desarrollaron un método espectrofotométrico útil y rápido para la estimación de las fracciones de carotenoides rojizos y amarillentos en productos del pimiento rojo, mediante la aplicación de la ley Lambert-Beer para mezclas complejas, y considerando las lecturas a dos longitudes de onda (472 y 508 nm).

Más recientemente, se ha propuesto una metodología para estimar el contenido de carotenoides de zumo de naranja considerando los valores de reflectancia a cinco longitudes de onda seleccionadas (420, 455, 515, 545 y 610 nm o 420, 445, 510, 545 y 605, según las condiciones de medida) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010). Además de considerar varias  $\lambda$ , la novedad principal de esta metodología es que la valoración del contenido de carotenoides se hace considerando valores de reflectancia medidos directamente en el producto, no en el extracto de carotenoides. Para este fin, se aplicó el método del vector característico (Lebart *et al.* 1985) a fin de obtener 5 longitudes de onda a partir de las cuales se podrían reconstruir los espectros visibles de los zumos con una buena exactitud para evaluar su color (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010).

### Correlación entre contenido de carotenoides y parámetros de color en diferentes alimentos

La cuantificación de carotenoides a partir de un extracto por medidas espectrofotométricas ha sido un método habitual durante muchos años. Dos desventajas de este procedimiento son la poca exactitud de los coeficientes de extinción empleados y que se utiliza la información espectrométrica de

un único punto, aunque el espectro de absorción visible de la mayoría de los carotenoides presenta bandas de absorción en un intervalo de unos 40 nm.

Sin embargo, los valores triestímulos de CIE X, Y, Z (a partir de los cuales se obtienen los parámetros de color de otros espacios, como ya se ha mencionado) se calculan considerando el espectro visible completo de una muestra, entre otros datos. Por lo tanto, es razonable pensar que los parámetros de color de un alimento pueden utilizarse para evaluar su contenido de pigmentos, ya que éstos son los principales responsables del espectro visible.

La utilidad de las coordenadas de color para estimar el contenido de licopeno en diferentes productos del tomate está bien documentada. D'Souza, Singha e Ingle (1992) concluyeron que tanto  $a^*$  como  $L^*$  se correlacionaban bien con los niveles de pigmentos, aunque las mejores correlaciones se obtuvieron considerando el parámetro  $(a^* / b^*)^2$ . En un interesante estudio Arias *et al.* (2000) llegaron a la conclusión de que el contenido de licopeno del tomate podría estimarse con base en los parámetros  $a^*$ ,  $a^* / b^*$  y  $(a^* / b^*)^2$ . En otro estudio se concluyó que los valores de tono de diferentes tomates medidos en homogeneizados eran mejores indicadores de su contenido de licopeno que los medidos en la región ecuatorial (Thompson *et al.*, 2000). Más recientemente se ha estimado el contenido de licopeno de zumos y frutos de tomate a partir de los parámetros de color obtenidos con dos diferentes instrumentos, aplicando estadística multivariante y considerando diferentes modelos lineales (Fernández-Ruiz *et al.*, 2010). Asimismo se ha estimado el contenido de licopeno en tomates y derivados usando análisis digital de imágenes, como se comentó (Stinco *et al.*, 2013).

El color de los aceites de oliva se debe tanto a clorofilas (principalmente feofitina a) y carotenoides (sobre todo  $\beta$ -caroteno y luteína) (Moyano *et al.*, 2010) y se ha comprobado que los niveles de estos pigmentos presentan una alta correlación ( $r > 0.8$ ) con los parámetros del espacio CIELAB en varios aceites de oliva de diferentes variedades y etapas de maduración. Por ejemplo, se encontraron altas correlaciones ( $r > 0.8$ ) entre la clorofila y el contenido total de pigmentos de las muestras y el parámetro  $a^*$ . Asimismo, se encontró buena correlación entre la fracción de carotenoides y los parámetros de color  $b^*$  y  $C_{ab}^*$  ( $r > 0.95$ ). Además, también se encontraron valores de  $r > 0.8$  entre los pigmentos (considerados en conjunto o por separado) y dos índices color,  $C_{ab}^* / L^*$  y  $b^* / L^*$  (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991). Más recientemente, en un estudio en el que se analizaron 1700 muestras de ocho variedades de aceitunas españolas en diferentes etapas de maduración se observó que las mejores correlaciones se encontraban entre este índice y  $C_{ab}^*$  y  $b^*$  (Moyano *et al.*, 2008, 2008a), lo que concuerda con los resultados publicados por Mínguez-Mosquera *et al.* (1991). Una conclusión importante de los dos estudios de Moyano *et al.*, (2008, 2008a) es que, teniendo en cuenta la información de color completa y la aplicación de métodos estadísticos multivalentes apropiados es posible obtener ecuaciones que permitan predecir el contenido de pigmentos a partir de los parámetros de color.

El color del zumo de naranja ha sido objeto de un gran número de estudios, sobre todo en Estados Unidos (Meléndez-Martínez *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios enfocados a estudiar la relación de este atributo con los carotenoides, considerados individualmente o en conjunto, han aparecido en los últimos 15 años. En este sentido, Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia (2003) encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido

de los principales carotenoides del zumo de naranja y los parámetros de color  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ . Además, mediante métodos de estadística multivariante obtuvieron ecuaciones que permitieron determinar los contenidos de carotenoides individuales a partir de información colorimétrica. Para ello, se consideraban los conjuntos de parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$  para tomar en consideración la información colorimétrica completa. En un estudio posterior Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia (2007) concluyeron que los parámetros mejor correlacionados con el contenido total de carotenoides de zumo de naranja ultracongelado eran  $b^*$  y  $C_{ab}^*$ . Los resultados de estos dos estudios son útiles para ilustrar con un caso práctico la importancia de las relaciones entre el contenido del pigmento y los parámetros de color. Así, del primer estudio (Meléndez-Martínez *et al.*, 2003) se puede inferir que los niveles de carotenoides del zumo de naranja considerados individualmente se correlacionan bien con los atributos cuantitativos ( $C_{ab}^*$ ) y cualitativos ( $h_{ab}$ ) del color. El tono está estrechamente relacionado con el tipo de radiación visible absorbida por el pigmento que, a su vez, está determinado principalmente por su cromóforo. Sin embargo, cuando los carotenoides del zumo se consideran en conjunto, el atributo cuantitativo de color sigue siendo un buen predictor del contenido de carotenoides, mientras que el tono no lo es, cuando, como en este caso, se consideran juntos pigmentos con cromóforos de diversa estructura. En lo referente a la utilidad de los parámetros de color para estimar el contenido total de carotenoides en zumos Zulueta, Esteve y Frígola (2007) analizaron 17 zumos comerciales y bebidas a base de leche y encontraron buenas correlaciones de ese parámetro con  $a^*$  y  $b^*$  ( $r > 0.75$ ).

Se han realizado otros estudios sobre la correlación entre el color y el contenido de carotenoides en batatas (Takahata,

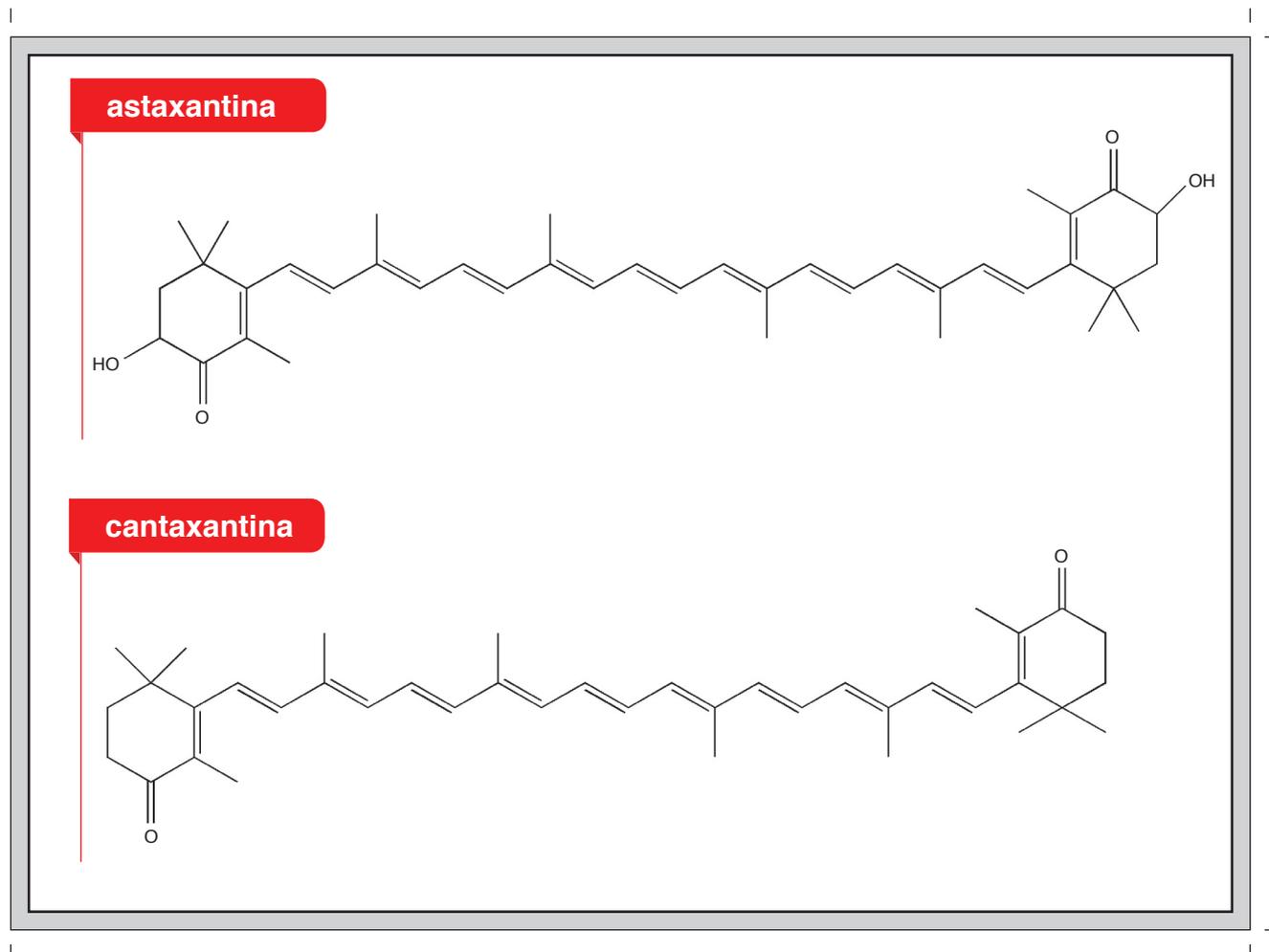
Noda y Nagata, 1993; Ameny y Wilson, 1997), productos de zanahoria (Chen y Tang, 1998), albaricoques (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008), mangos (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2008, Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005) y cereales (Humphries, Graham y Mares, 2004). En lo referente a los estudios sobre batatas, Takahata, Noda y Nagata (1993) encontraron que el contenido de  $\beta$ -caroteno de variedades con la pulpa naranja estaba bien correlacionado con  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Asimismo propusieron la estimación de los niveles de  $\beta$ -caroteno a partir de los valores de  $a^*$  como una herramienta útil para el control de calidad en la producción. Contrariamente, Ameny y Wilson (1997) encontraron que el valor Hunter b correlacionaba mucho mejor que  $a^*$  con el contenido de  $\beta$ -caroteno de diversos productos de batata. Puesto que el carotenoide provitamínico  $\beta$ -caroteno es el principal carotenoide de las batatas (Huang, Tanudjaja y Lum, 1999, Van Jaarsveld *et al.*, 2006; Kidmose *et al.*, 2007), se puede pensar que es posible obtener una buena estimación de la hipotética actividad vitamínica A de estos productos a partir de medidas de color. Sin embargo, este aspecto se tratará más adelante.

El valor de b de Hunter también se ha correlacionado con los cambios en carotenoides en residuos de pulpa de zanahoria almacenada en diferentes condiciones (Chen y Tang, 1998). Los niveles de carotenoides coloreados individuales y totales también se correlacionan bien con los parámetros de color (sobre todo  $a^*$  y  $h_{ab}$ ) en albaricoque (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que el tono y los valores de  $a^*$  en mangos son parámetros útiles para obtener información rápida sobre su contenido de carotenoides (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2008; Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005). Por otro lado, en un estudio en el que se analizaron diversos tipos de pan y de variedades de trigo durum y triticale, se obtuvieron altas correlaciones entre  $b^*$  y los niveles de

carotenoides en muchas muestras, proponiéndose ecuaciones para estimar el contenido de estos pigmentos a partir de dicha coordenada de color (Humphries, Graham y Mares, 2004). Los resultados de este estudio son útiles para seleccionar de una manera más rápida y eficiente variedades con altos niveles de carotenoides para su cultivo.

Aunque muchos de los estudios en los que se investiga la relación entre el contenido de carotenoides y el color de los alimentos se han realizado en alimentos vegetales, los hay también en los que se han evaluado alimentos de origen animal. Por ejemplo, se ha empleado un índice de color para estimar el contenido en carotenoides de leche de vaca (Calderón *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2007a). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre alimentos de origen animal se han realizado en pescados. Estos estudios son especialmente numerosos en el caso de peces de la familia de los salmónidos, en los que el color rojo del músculo es considerado un importante atributo de calidad. Como se podía esperar, el color de los filetes (principalmente debido a cetocarotenoides rojizos como astaxantina y cantaxantina, figura 5) se correlaciona bien con  $a^*$  (Skrede y Storebakken, 1986; Skrede, Storebakken y Nås, 1990; Ando *et al.* 1992). Además, también se ha propuesto la calibración multivariante de datos de espectrometría visible como un procedimiento apropiado para estimar niveles de carotenoides en trucha arcoíris (Ronsholdt y McLean, 2001). Otro importante hallazgo de estos autores es que la aplicación de la teoría de Kubelka-Munk puede ser útil para eliminar la información espectral de origen físico, es decir, no debida a los pigmentos.

En un exhaustivo estudio en el que se analizaron los datos de 376 muestras de peces alimentados con astaxantina se encontraron relaciones no lineales entre los parámetros de



**FIGURA 5.** Estructuras químicas de cantaxantina y astaxantina.

color y los niveles de carotenoides (Hatlen, Jobling y Bjerkeng, 1998). Los autores observaron que el color de los peces puede verse afectado por factores como las condiciones de cría, el origen genético y el estado reproductivo. Por otra parte, en una interesante discusión proponen como hipótesis que las diferencias en el color de los filetes podrían estar relacionadas

tanto con sus propiedades químicas como físicas y concluyen, entre otras cosas, que otros componentes del músculo distintos de los lípidos (especialmente agua y proteínas) deben tenerse en cuenta, junto con el contenido de carotenoides, para explicar las diferencias de color en el conjunto de muestras estudiadas.

## Utilidad de los parámetros de color para estimar la potencial actividad de los carotenoides

De los estudios mencionados, se concluye que es posible determinar los niveles de carotenoides y pigmentos, en general, a partir de los datos de espectrometría visible y de color. Dado que algunos carotenoides (unos 60 de los 700 descritos hasta ahora) presentan actividad como vitamina A y se ha demostrado que muchos tienen actividad antioxidante *in vitro*, es razonable pensar que las medidas de color en alimentos que contienen carotenoides podrían utilizarse también para evaluar de forma rápida tanto la hipotética actividad vitamínica como la capacidad antioxidante.

Sin embargo, en este punto es conveniente hacer hincapié en el hecho de que, obviamente, estos valores (ya sean equivalentes de actividad de retinol, unidades internacionales, capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, etc.) no son extrapolables a condiciones *in vivo*. En este sentido, es importante considerar que la actividad biológica depende de muchos factores, como la biodisponibilidad y la bioconversión, que a su vez dependen de muchos factores (matriz del alimento, interacciones, estado nutricional y de salud, envejecimiento, variabilidad interindividual, etc.) (Faulks y Southon, 2005; Yeum y Russell, 2002). En lo referente a la

actividad antioxidante de estos compuestos, hay que advertir que los mecanismos subyacentes no están totalmente dilucidados. Por su naturaleza lipofílica los carotenoides se encuentran en ambientes lípidicos, como las membranas celulares, donde pueden interactuar con diversos electrófilos según su estructura química y su orientación (Woodall, Britton y Jackson, 1997; Woodall *et al.*, 1997). Asimismo, estudios recientes apuntan a que la actividad antioxidante *in vivo* de los carotenoides o sus metabolitos también puede deberse a la inducción de procesos mediados por enzimas s (Ben Dor *et al.*, 2005; Lian y Wang, 2008).

La utilidad de la información de color para hacer una estimación de la hipotética actividad como vitamina A de diversos alimentos, como zumos de naranja (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2003, Meléndez-Martínez *et al.*, 2007), cereales (Humphries, Graham y Mares, 2004), mangos (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005) y albaricoques (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008) ha sido propuesta por varios autores. Por otro lado, en un estudio preliminar en el que se evaluó la capacidad antioxidante de extractos lipofílicos de tomate frente al catión radical ABTS, se ha constatado que los valores TEAC están correlacionados con las coordenadas de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h_{ab}$  ( $R = 0.839$  y  $0.838$ , respectivamente) (Stinco *et al.*, 2010).

## REFERENCIAS

- Ameny, M.E. y Wilson, P.W. 1997. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 301-306.
- Ando, S., Yamauchi, H., Hatano, M. y Heard., W.R. 1992. *Aquaculture* 103: 359-365.
- Arias, R., Lee, T.C., Logendra, L. y Janes, H. 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1697-1702.
- Artigas, J.M. 2002. En P. Capilla, Artigas, J.M. y Pujol, J. (eds.). *Fundamentos de colorimetría*. Valencia: Universidad de Valencia, 119-131.
- Bao, B. y Chang, K.C. 1994. *Journal of Food Science* 59: 1155-1158.
- Beltrán González, F., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. y Carbonell-Barrachina, A.A. 2008. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1731-1738.
- Ben Dor, A., Steiner, M., Gheber, L., anilenko, M.D, Dubi, N., Linnewiel, K., Zick, A., Sharoni, Y. y Levy, J. 2005. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 177-186.
- Berzelius, J.J. 1837. *Ann der Pharm* 21: 257-262.
- Britton, G. 1983. *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Britton, G. 1991. En P.M. Dey y Harborne, J.B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press.
- Britton, G. 1992. En G.A.F. Hendry y Houghton, J.D. (eds.). *Natural Food Colorants*. Glasgow y Londres: Blackie.
- Britton, G. 1995. En G. Britton, Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (eds.). *Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. y Young, A. 1993. En A. Young y Britton, G. (eds.). *Carotenoids in Photosynthesis*. Londres: Chapman and Hall.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2004. *Handbook of Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2008. *Carotenoids. Vol. 4: Natural functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2009. *Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and Health*. Basilea: Birkhäuser.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. y Noziere, P. 2007. *Journal of Dairy Science* 90: 2335-2346.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Pradel, P., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. y Noziere, P. 2007a. *Journal of Dairy Science* 90: 5651-5664.
- Calvo, C., Salvador, A. y Fiszman, S.M. 2001. *European Food Research and Technology* 213: 99-103.
- Cano, M P., De Ancos, B., Lobo, M.G. y Monreal, M. 1996.

## REFERENCIAS

- Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 351-358.
- Chen, B.H., Peng, H.Y., y Chen, H.E. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1912-1918.
  - Chen, B.H. y Tang, Y.C. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2312-2318.
  - CIE. 1978. *Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, Psychometric Color Terms*. CIE Publication núm. 15 (E-1.3.1), suplemento 2. Viena: CIE.
  - Clydesdale, F.M. 1993. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 83-101.
  - Cortés, C., Esteve, M.J., Rodrigo, D., Torregrosa, F. y Frígola, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1932-1939.
  - Cortés, C., Torregrosa, F., Esteve, M.J. y Frígola, A. 2006a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6247-6254.
  - D'Souza, M.C., Singha, S. y Ingle, M. 1992. *Hortscience* 27: 465-466.
  - Davies, B.H. 1976. En Goodwin, T.W. (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Londres y Nueva York: Academic Press.
  - Davis, W.B. 1949. *Analytical Chemistry* 21: 1500-1503.
  - De Ritter, E. y Purcell, A.E. 1981. En Baverfend, J.C. (ed.). *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Nueva York: Academic Press.
  - Faulks, R.M. y Southon, S. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 95-100.
  - Fernández-Ruiz, V., Torrecilla, J.S., Cámara, M., Sánchez Mata, M.C. y Shoemaker, C. 2010. *Talanta* 83: 9-13.
  - Fernández-Vázquez, R., Hewson, L., Fisk, I., Hernanz-Vila, M.D., Heredia, F.J., Vicario, I.M., Hort, J. 2014. *Flavour* 3: 1-8.
  - Francis, F.J. 1995. *Food Quality and Preference* 6: 149-155.
  - Gómez-Ladrón de Guevara, R., Pardo-González, J.E., Varón-Castellanos, R. y Navarro-Albaladejo, F. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2049-2052.
  - Gurak, P., Mercadante, A.Z., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. 2014. *Food Chemistry* 147: 160-169.
  - Hatlen, B., Jobling, M. y Bjerkgeng, B. 1998. *Aquaculture Research* 29: 191-202.
  - Heredia, A., Peinado, I., Barrera, C. y Grau, A.A. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 285-294.
  - Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2001.

## REFERENCIAS

- Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3584-3588.
- Huang, A.S., Tanudjaja, L. y Lum, D. 1999. *Journal of Food Composition and Analysis* 12: 147-151.
  - Huggart, R.L. y Wenzel, F.W. 1954. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 67: 216.
  - Humphries, J.M., Graham, R.D. y Mares, D.J. 2004. *Journal of Cereal Science* 40: 151-159.
  - Hunt, R.W.G. 1998. *Measuring Colour*. West Sussex: Fountain Press.
  - Hutchings, J.B. 1994. *Food Colour and Appearance*. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
  - Kidmose, U., Christensen, L.P., Agili, S.M. y Thilsted, S.H. 2007. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 399-406.
  - Krinsky, N.I. 2001. *Nutrition* 17: 815-817.
  - Krinsky, N.I. y Yeum, K.J. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305: 754-760.
  - Krinsky, N., Mayne, S.T. y Sies, H. 2004. *Carotenoids in Health and Disease*. Nueva York: Marcel Dekker.
  - Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. 2005. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
  - Lebart, L.A., Morineau, A. y Fenelon, J.P. 1985. *Tratamiento estadístico*. Barcelona: Marcombo.
  - Lee, H.S. y Coates, G.A. 1999. *Journal of Food Science* 64: 663-666.
  - Lee, H.S. y Castle, W.S. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 877-882.
  - Lee, H.S. y Coates, G.A. 2003. *LWT. Food Science and Technology* 36: 153-156.
  - Lian, F.Z. y Wang, X.D. 2008. *International Journal of Cancer* 123: 1262-1268.
  - MacDougall, D.B. 2002. *Colour in Food, Improving Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing.
  - Meléndez-Martínez, A.J. 2005. "Estudio de los carotenoides y del color de zumos de naranja. Tesis doctoral". Universidad de Sevilla.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7266-7270.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2005. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 894-901.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Food Chemistry* 101: 1145-1150.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007.

## REFERENCIAS

- Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1347-1355.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2808-2815.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 638-649.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 295-302.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I., Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *Food Chemistry* 126: 1862-1869.
  - Meléndez-Martínez, A.J., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *Food Research International* 43: 1289-1296
  - Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2010. *Phytochemistry* 71: 1104-1114.
  - Meléndez-Martínez, A., Escudero-Gilete, M., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *European Food Research and Technology* 230: 527-532.
  - Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., Moyano, M.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2000. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 1093-1099.
  - Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., Heredia, F.J., Alba, J. y Moyano, M.J. 2001. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 265-270.
  - Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A.H. y Garrido-Fernández, J. 1991. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 332-336.
  - Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de los alimentos*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
  - Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2008. *Food Research International* 41: 505-512.
  - Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2008a. *Food Research International* 41: 513-521.
  - Moyano, M.J., Melgosa, M., Alba, J., Hita, E. y Heredia, F.J. 1999. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76: 687-692.
  - Moyano, M.J., Heredia, F.J. y Meléndez-Martínez, A.J. 2010. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 278-291.
  - Nagy, S., Chen, C.S. y Shaw, P.E. 1993. *Fruit Juice Processing Technology*. Auburndale, Agscience.
  - Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M. y Gardea, A.A. 2008. *Postharvest Biology and Technology* 50: 145-152.
  - Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., Núñez-Delicado,

## REFERENCIAS

- E., Amor, F.M. y Carbonell-Barrachina, A. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8158-8164.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.
  - Ronsholdt, B. y McLean, E. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 345-357.
  - Roth, H.A., Radle, L., Gifford, S.R. y Clydesdale, F.M. 1988. *Journal of Food Science* 53: 1116-1162.
  - Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F.A. y Gil, M.I. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6368-6374.
  - Ruiz, D., Reich, M., Bureau, S., Renard, C.M.G.C. y Audergon, J.M. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4916-4922.
  - Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basilea: Birkhäuser.
  - Shim, S.M. y Kim, G.H. 2002. *Food Science and Technology Research* 8: 244-246.
  - Skrede, G. y Storebakken, T. 1986. *Journal of Food Science* 51: 804-808.
  - Skrede, G., Storebakken, T. y Nås, T. 1990. *Journal of Food Science* 55: 1574-1578.
  - Stinco, C.M., Vicario, I.M., Heredia, F.J. y Meléndez-Martínez, A.J. 2010. Budapest: 6th *International Congress on Pigments in Food*: 326-328.
  - Stinco, C., Rodríguez-Pulido, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Gordillo, B., Vicario, I., Meléndez-Martínez, A.J. 2013. *Food Research International* 50: 111-120.
  - Takahata, Y., Noda, T. y Nagata, T. 1993. *Japanese Journal of Breeding* 43: 421-427.
  - Thompson, K.A., Marshall, M.R., Sims, C.A., Wei, C.I., Sargent, S.A. y Scott, J.W. 2000. *Journal of Food Science* 65: 791-795.
  - Tswett, M. 1906. *Ber Deutsch Botan Ges* 24: 384-393.
  - Van Jaarsveld, P.J., Wet Marais, D., Harmse, E., Nestel, P. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2006. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 321-329.
  - Van Wyk, A.A., Huysamer, M. y Barry, G.H. 2009. *Postharvest Biology and Technology* 53: 109-116.
  - Vásquez-Caicedo, A.L., Shruamsiri, P., Carle, R. y Neidhart, S. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4827-4835.
  - Wackenroder, H.W. F. 1831. *Geigers Magazin der Pharmazie* 33: 144-172.
  - Wenzel, F.W. y Huggart, R.L. 1962. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 75: 331-336.

## REFERENCIAS

- Woodall, A.A., Britton, G. y Jackson, M.J. 1997. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336: 575-586.
- Woodall, A.A., Lee, S.W.M., Weesie, R.J., Jackson, M.J. y Britton, G. 1997. *Biochimica et Bio physica Acta* 1336: 33-42.
- Wyszecki, G. y Stiles, W.S. 2000. *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Yeum, K.J. y Russell, R.M. 2002. *Annual Review of Nutrition* 22: 483-504.
- Zepka, L.Q., Borsarelli, C.D., Azevedo Pereira da Silva, M.A. y Mercadante, A.Z. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7841-7845.
- Zepka, L.Q. y Mercadante, A.Z. 2009. *Food Chemistry* 117: 28-34.
- Zulueta, A., Esteve, M.J. y Frígola, A. 2007. *Journal of Food Science* 72: 457-463.

# ANÁLISIS SENSORIAL DE COLOR

Adriana Gámbaro



## INTRODUCCIÓN

La calidad de un producto y la satisfacción del consumidor son fundamentales para la comercialización exitosa de los alimentos. Kramer y Twigg (1970) consideran que la calidad es “el conjunto de características de un producto que sirven para diferenciar unas unidades de otras y que tiene significado en la aceptación del mismo por el consumidor”. O sea que la calidad es aquella combinación de atributos del alimento que determina el grado de aceptación del producto por el consumidor y que, a la vez, condiciona su valor comercial (Calvo y Duran, 1979).

La textura, el sabor, el olor y el aspecto configuran lo que se define como calidad sensorial de los alimentos. La importancia tecnológica y económica de ese aspecto es evidente porque influye directamente en su aceptación, aunque no la determine totalmente. Cuando se quiere evaluar la calidad sensorial de un alimento, es decir, el resultado de las sensaciones que el hombre experimenta al ingerirlo, el único camino

es preguntárselo a éste, porque esta no es una característica intrínseca del alimento sino el resultado de la interacción entre el alimento y el hombre. El análisis de la composición química y de las propiedades físicas de un alimento aporta información sobre la naturaleza del estímulo que percibe el consumidor, pero no sobre la sensación que éste experimenta al ingerirlo (Costell y Durán, 1981).

La importancia del color es decisiva en la evaluación sensorial de los alimentos, puesto que, según los psicólogos, con el sentido de la vista captamos 83% de nuestro entorno, quedando sólo 17% para lo que captamos con los restantes sentidos (Calvo, 1992). La primera impresión que un consumidor recibe de un alimento llega por la vista y entre las propiedades que observa destaca el color, hasta el punto en que el alimento puede ser rechazado por ese atributo, sin necesidad de tener que valorar otras propiedades, como sabor o textura (Durán, 1971; Hutchings, 1977). Si un alimento ya es rechazado en el examen visual, no se llega a evaluar el resto de sus parámetros de calidad, por excelentes que éstos puedan ser. En los zumos o jugos de naranja, por ejemplo, el color naranja brillante natural es considerado como una ventaja sobre otros zumos (Barron, Maraulja y Huggart, 1967). Algunos estudios han demostrado que éste puede influir en la percepción del sabor y otros atributos de calidad (Fernández-Vázquez *et al.*, 2012; Tepper, 1993).

## EL SISTEMA VISUAL HUMANO

La retina, en la parte posterior del ojo humano, es la superficie sobre la cual se centran las imágenes. La capa más externa de la retina contiene alrededor de 120 millones de receptores fotosensibles. Éstos se llaman conos y bastones debido a su

aparición morfológica bajo un microscopio y son de tamaño muy pequeño: alrededor de un 1/500 mm de diámetro y unos 1/25 mm de longitud. Los bastones y conos trabajan en cooperación para realizar la visión, que responde a una amplia gama de brillo y color (Ohta y Robertson, 2005). Los bastones detectan niveles de luz, pero no los colores, mientras que los conos detectan colores.

Hay tres tipos de conos que son sensibles a la luz roja, verde y azul, respectivamente, lo que sugiere que nuestra visión del color es similar a las cámaras de video y pantallas de computadora, que detectan o proyectan una amplia variedad de colores a través de combinaciones de rojo, verde y azul (Johnson, 2014). Los tres tipos de conos son universal y popularmente conocido como conos R, G, y B, por el nombre de los colores en inglés. Aunque los tres tipos de conos son sensibles al rojo, verde y azul, los picos de sus curvas de sensibilidad hacen que en realidad no correspondan a esos colores del espectro. Por lo tanto, es más preciso describir los tres tipos de conos como fotorreceptores de larga, media y baja longitud de onda corta (L, M, S, por las letras de esas palabras en inglés). Los picos de las sensibilidades de los tres tipos de conos se superponen considerablemente y corresponden a 420-440 nm (tipo S), 534 a 555 nm (tipo M) y 564 a 580 nm (tipo L) (Kumar, 2014). Además, la sensibilidad global de los tres tipos de conos difiere en gran medida, ocasionando que nuestros ojos sean mucho menos sensibles a los azules y violetas que a otros colores (Johnson, 2014).

La sensibilidad de la visión normal del color, en realidad, depende de la superposición entre los espectros de absorción y se identifican diversos colores cuando los distintos tipos de conos son estimulados a diversos niveles. La luz roja, por ejemplo, estimula los conos de longitud de onda larga mucho

más que cualquiera de los otros; la reducción de la longitud de onda hace que se estimulen los otros dos sistemas de conos, provocando un cambio gradual en el tono percibido. Los bastones son responsables de la visión con un bajo nivel de iluminación, mientras que los conos son responsables de la sensación de color y los detalles finos de la visión con un alto nivel de iluminación (Kumar, 2014).

## ¿QUÉ VEMOS CUANDO VEMOS?

En 1922 el Comité de colorimetría de la Optical Society of America (OSA) definió el color como el nombre general para todas las sensaciones que surgen de la actividad de la retina del ojo y sus mecanismos nerviosos adjuntos. En un individuo normal esta actividad es una respuesta específica a la energía radiante de cierta longitud de onda e intensidad (OSA, 1953) y, por lo tanto, es una respuesta psicológica a un estímulo físico. El color es una respuesta perceptual a la luz que entra en el ojo, ya sea directamente de una fuente con luz propia o indirectamente reflejada o refractada por los objetos iluminados. La sensación es un concepto puramente subjetivo que denota un estado de conciencia como una respuesta inmediata a la entrada de los nervios en el cerebro (James, 1893). Las características del color percibidas por el ser humano se detallan en el capítulo 6.

## MEDIDA DEL COLOR

La medida del color puede realizarse de forma subjetiva por apreciación visual, u objetivamente mediante el empleo de diversos instrumentos (capítulo 6) o incluso, en algún caso, determinando químicamente la proporción de sustancias

colorantes. Una notable propiedad del ojo humano y de los procesos visuales está en percibir múltiples características de los objetos de forma simultánea, es decir, tamaño, forma, textura, brillo, transparencia y color (Judd y Wyszecki, 1963).

El ojo humano es muy eficiente en la percepción de detalles de objetos geométricos finos y coloridos, incluso en presencia de una iluminación multidireccional y multivariada. En un escenario teatral puede haber un gran número de fuentes primarias de luz (es decir, lámparas) y una serie continua de fuentes secundarias, como reflejos de las paredes, el techo, los paneles, los bancos, el piso, etc. Tal enorme cantidad de información, apenas posible de calcular, la procesa instantáneamente el ojo humano sin dificultad (Kumar, 2014).

Sin embargo, la apreciación del color por el ojo humano tiene graves inconvenientes para su empleo en la medida del color (Durán, 1971; Johnson, 2014) porque:

- a) No es reproducible: el mismo alimento presentado al mismo evaluador en distintos momentos puede merecer calificaciones diferentes, debido a que el ser humano no tiene buena “memoria del color”, es decir, le es difícil recordarlo cuando no lo está viendo.
- b) la nomenclatura es poco concreta y a menudo confusa; en promedio, una persona puede distinguir aproximadamente 350 mil colores diferentes, pero el número de términos básicos de color que puede emplear está confinado a no más de once expresiones, dependiendo de la cultura o el lenguaje (Dember y Warm, 1979).
- c) La forma, el tamaño y las características superficiales del alimento, así como el color del fondo sobre el que se coloca

y otros factores ambientales, modifican la sensación que sobre el observador produce un determinado color, por lo que es necesario el entrenamiento de los evaluadores y la estandarización de las condiciones de medida.

d) La capacidad para detectar diferencias entre los colores es limitada; debido a cómo funciona nuestro sistema visual, tres factores afectan nuestra capacidad de distinguir los colores entre sí: *i)* palidez: cuanto más pálidos son los colores (menos saturados), más difíciles son de distinguir, *ii)* el tamaño del objeto: los colores de los objetos más pequeños o más delgados son más difíciles de distinguir y *iii)* la separación: en los objetos más separados es más difícil distinguir sus colores, especialmente si la separación es lo suficientemente grande como para requerir el movimiento del ojo entre los objetos.

Todo esto apunta claramente a la necesidad de disponer de métodos objetivos y precisos que permitan cuantificar los colores para definirlos, interpretarlos y compararlos entre sí. Lamentablemente, estos métodos no son totalmente representativos de la apreciación visual que realiza el consumidor. Por muy sofisticado que sea un colorímetro, no llega a alcanzar la capacidad integradora y analizadora del cerebro humano. La heterogeneidad del color de la mayoría de los alimentos, apreciables por un observador en forma instantánea y completa, difícilmente se puede representar por una medida instrumental o por una medida química. Ambos procedimientos, subjetivo y objetivo, son incompletos y el método a elegir dependerá del alimento, de acuerdo con la finalidad específica de la medida (Durán, 1979).

Para el elaborador de alimentos, el grado de variación aceptado en este atributo estaría limitado por un criterio de calidad que establece las tolerancias de la variación de

color permitidas (Gould y Gould, 1988). Por otro lado, la cuantificación de colorantes requiere habitualmente técnicas complejas o instrumental específico y costoso, no siempre disponible en pequeñas y medianas empresas. Éste podría ser fácilmente sustituible por un panel de jueces entrenados en la evaluación del atributo color (Durán, 1971).

## RELACIÓN ENTRE COLOR Y OTROS ATRIBUTOS SENSORIALES

Al percibir el color de un alimento, el consumidor, de manera espontánea, lo relaciona con otras características —grado de madurez de frutas, proporción o calidad de la fruta en una bebida, frescura de la carne, tipo o calidad del vino, etc.— y basta su primera reacción en lo que deduce de esta relación (Durán y Costell, 1999). El color es un atributo tan importante en la mayoría de los alimentos que no solamente influye en el primer juicio del consumidor sino también provee información sensorial que le permite interactuar con el gusto, el olfato y la textura para determinar su aceptabilidad total (Dubose, Cardello y Maller, 1980).

Este fenómeno psicológico se manifiesta, sobre todo, en la percepción del gusto. Los resultados obtenidos por diferentes autores en cuanto al efecto del color sobre el gusto son contradictorios, en parte debido a que las investigaciones se realizaron unas veces en sistemas modelo y otras en alimentos reales, generalmente bebidas de frutas a las que se han añadido colorantes. En la mayoría de los casos la atención se ha centrado sobre el efecto del color en la identificación o en la intensidad del sabor típico de la fruta en estudio (Dubose, Cardello y Maller, 1980; Johnson *et al.* 1982; Stillman, 1993).

Otros trabajos publicados confirman el importante papel del color en el reconocimiento de un gusto y en la percepción de su intensidad. En este sentido, algunos estudios revelaron que el color de bebidas cítricas, en general, está relacionado con la percepción de sabor, dulzor y otras características vinculadas con la calidad de estos productos (Tepper, 1993). Consumidores uruguayos relacionaron el color amarillo de muestras de aceite de oliva con el gusto suave, mientras que los aceites de color más verde, fueron descritos como sabrosos, aromáticos, con gusto fuerte y con sabor a hierba (Gámbaro *et al.* 2014).

## EVALUACIÓN DEL COLOR DE ALIMENTOS

### Requisitos físicos

Existen directrices detalladas en distintas normas para el diseño general de los laboratorios de evaluación sensorial (ASTM, 1986; ISO 8589, 1988). Una de las recomendaciones más importantes es que toda área de evaluación, como cabinas sensoriales y salas de reuniones (para entrenamiento y discusión de resultados), deberían proporcionar un ambiente cómodo, neutral, sin distracciones. No debe haber objetos brillantes o de color en los alrededores que puedan generar distracciones; hasta se sugiere cubrir las ropas de colores brillantes o muy intensos con batas de laboratorio blancas o grises.

En particular, para el análisis sensorial de color, la norma ISO 11037 (1999) especifica que las paredes, tanto del lugar de evaluación como de las cabinas individuales, deberían estar pintadas de un color neutro (blanco, gris, etc.), con una reflectancia de 0.3 a 0.5. La luminancia óptima de las paredes

(medida de la intensidad luminosa por unidad de área) debería ser aproximadamente  $100 \text{ cd/m}^2$  (cd: candela, unidad básica de intensidad luminosa del Sistema Internacional) y no debería disminuir en ninguna zona de visión por debajo de  $15 \text{ cd/m}^2$ .

En muchos laboratorios sensoriales se utilizan cabinas portátiles para la evaluación de colores, equipadas con iluminantes adecuados de forma que la luz procedente de esa fuente se proyecte verticalmente sobre la muestra y se observe con un ángulo de  $45^\circ$  (Fernández-Vázquez *et al.*, 2013; Tárrega y Costell, 2007).

### Requisitos de iluminación

La luz con que vemos los alimentos es fundamental para la evaluación de su color. Se pueden encontrar muchos tipos de iluminaciones que operan a través de una amplia gama de intensidades. Para obtener resultados confiables y reproducibles en las evaluaciones, es esencial una fuente de luz apropiada y niveles de intensidad adecuados.

En el área general, se recomienda utilizar luces incandescentes para proporcionar una iluminación uniforme y libre de sombras, con luminancia similar o ligeramente inferior a la de las cabinas de evaluación. Dentro de una cabina sensorial se debe evitar la reflexión especular de la fuente (cuando los ángulos de incidencia y de reflexión son aproximadamente los mismos), lo que se logra con una fuente de luz vertical sobre el objeto y donde la visualización se produzca a aproximadamente  $45$  grados respecto a la muestra (ISO, 1999; Hutchings, 2002).

Para iluminar las muestras a evaluar se debería usar luz uniforme difusa, lo que se logra con los siguientes tipos de iluminación: a) una fuente artificial de luz que represente la luz

del día promedio, como el iluminante D65 de la CIE (2007) y *b*) el cuadrante norte de cielo como una fuente natural de luz difusa (ISO, 1999).

## FORMACIÓN DE UN PANEL DE JUECES SENSORIALES

### Selección de candidatos

Con el fin de seleccionar a los candidatos para formar un panel de jueces sensoriales que evalúen color se deben seguir los lineamientos de la norma ISO 11037 (1999). La determinación de la visión normal de los candidatos se puede realizar por medio del Farnsworth-Munsell 100 Hue Test, lo que también permite examinar la capacidad de discriminación visual de los candidatos (Farnsworth, 1957). La visión normal también se puede verificar usando tablas policromáticas como las de Ishihara, Stilling, Rjabkin o Velhagen (ISO, 1999). Se deben identificar y eliminar del panel los candidatos con visión de color anómala.

Con excepción de estos métodos normalizados y aunque la evaluación del color se incluye en muchos estudios sensoriales (Calvo, Salvador y Fiszman, 2001; Frata, Valim y Monteiro, 2006; Poelman y Delahunty, 2011), hay muy poca información sobre pruebas sensoriales que se puedan llevar a cabo para seleccionar y entrenar a los integrantes de un panel de jueces sensoriales para este tipo de evaluación.

Una alternativa de bajo costo para el Farnsworth-Munsell 100 Hue Test es el test de sensibilidad de la vista desarrollado por el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia de Cuba, cuyo fin es determinar la aptitud de un candidato para

distinguir pequeñas diferencias de los colores verde, amarillo y rojo (Torricella, Zamora y Pulido, 1989). La prueba consiste en partir de soluciones madres concentradas de tres colorantes: amaranto (E-123), tartracina (E-102) y verde sólido (E-143). Estas soluciones madre se obtienen disolviendo 1.0 g de cada colorante en 100 mL de agua destilada. Las soluciones para la prueba se preparan a partir de una alícuota de la solución madre, la que se diluye a 100 mL con agua destilada, de acuerdo con la tabla 1.

**TABLA 1.** Preparación de soluciones para la prueba de sensibilidad de la vista

Número de solución	Volumen de la alícuota (mL)
1	0.10
2	0.20
3	0.26
4	0.33
5	0.43
6	0.55
7	0.70
8	0.90
9	1.49
10	1.92

**Fuente:** Datos de Torricella, Zamora y Pulido (1989).

Las 30 soluciones (10 de cada color) se vierten en tubos de ensayo codificados con números aleatorios de tres cifras, de forma que el líquido tenga la misma altura en todos los tubos. Se les entregan a los candidatos los 30 tubos mezclados aleatoriamente y se les da, en primer lugar, la tarea de separarlos según el color. Posteriormente, deben ordenar

los 10 tubos de ensayo de cada color de menor a mayor intensidad. La prueba se debe realizar con los tubos sobre un fondo blanco y con iluminación adecuada. Para ser aprobados, los candidatos deberán identificar, sin error, los colores verde amarillo y rojo. Para evaluar el ordenamiento, se otorga un punto por cada respuesta correcta; los candidatos deben alcanzar un mínimo de 25 puntos para ser considerados aptos (Torricela, Zamora y Pulido, 1989).

Con base en la prueba de Torricela, Zamora y Pulido (1989), Gámbaro, Giménez y BURGUEÑO, (2001) propusieron una prueba específica para seleccionar panelistas para la evaluación del color rojo en yogur de frutilla o fresa, que se puede realizar a continuación de las pruebas mencionadas antes. Ésta consiste en la preparación de tres soluciones acuosas usando tres diferentes colorantes rojos: rojo ponceau 4R (E-124), eritrosina (E-127) y rojo carmín (E-120). El objetivo de la prueba es determinar la habilidad de los candidatos para discriminar entre diferencias de tono e intensidades en color rojo. Se preparan 10 soluciones acuosas de cada colorante con 10, 20, 26, 33, 43, 55, 70, 90, 49 y 192 mg/L (30 en total). Las soluciones se colocan en tubos de ensayo codificados con números aleatorios de tres cifras. Se les entregan a los candidatos los 30 tubos mezclados aleatoriamente y se les da, en primer lugar, la tarea de separarlos según el tono de color rojo. Posteriormente, deben ordenar los 10 tubos de ensayo de menor a mayor intensidad. La prueba se debe realizar en una cabina con buena iluminación y fondo blanco. Para seleccionar a los candidatos, se usan los siguientes criterios: *a)* rechazo de aquellos candidatos que no separan correctamente los tubos en los tres tonos de color rojo, *b)* rechazo de aquellos candidatos cuyo coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) para la ordenación de alguno de los tres tonos no es significativo ( $p > 0.05$ ) (O'Mahony, 1986). Esta misma prueba se puede volver

a repetir preparando las soluciones de cada uno de los tres colorantes en una base de yogur natural bebible y utilizando la misma metodología y criterio para rechazar a los candidatos.

Con base en este trabajo, Fernández-Vázquez *et al.* (2013) seleccionaron a un grupo de individuos para evaluar el color de zumos de naranja de la siguiente manera: se prepararon soluciones de color naranja utilizando dos colorantes alimentarios (rojo y amarillo) mezclados en diferentes proporciones: *a)* 500 de colorante rojo y 12.000  $\mu\text{L/L}$  de colorante amarillo para las soluciones más amarillas, *b)* 1250 de colorante rojo y 12 000  $\mu\text{L/L}$  de colorante amarillo para las soluciones naranjas y *c)* 3 000 de colorante rojo y 12 000  $\mu\text{L/L}$  de colorante amarillo para las soluciones más rojas. De cada mezcla de colorantes se prepararon 10 soluciones acuosas al 100, 78, 47, 36, 29, 22, 17, 14, 10 y 5%. Se colocaron 75 mL de cada una de estas soluciones en botellas de plástico transparente codificadas con números aleatorios de dos dígitos.

Las sesiones de evaluación se organizaron de la siguiente manera: en la primera etapa, se entregaron a los candidatos tres muestras correspondientes al mismo nivel de dilución de cada mezcla de colorantes y se les pidió que las ordenaran de las más amarillas a las más rojas (en total 10 evaluaciones). En la segunda etapa, se entregaron a los candidatos las 10 diluciones de cada mezcla de colorantes por separado y se les pidió que las ordenaran de acuerdo con la intensidad creciente. Para seleccionar a los evaluadores, los criterios utilizados fueron: *a)* rechazar a aquellos que no pudieron llevar a cabo la clasificación de los tubos en los tres grupos de tonos y *b)* rechazar a aquellos candidatos cuyos coeficientes de correlación de Spearman ( $\rho$ ) para la ordenación de alguno de los tres tonos fuera no significativo ( $p > 0.05$ ) (O'Mahony, 1986).

**TABLA 2.** Muestras para el entrenamiento de los jueces sensoriales en color rojo de yogur de frutilla

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentración (mg/L)	10.2	43.0	2.0	90.0	26.0	70.0	55.0	5.0

La sensibilidad a las diferencias de color de alimentos también se puede determinar usando otros alimentos, en función del objetivo del proyecto. Por ejemplo, cuando la calidad de un producto particular depende del amarronamiento, se puede seleccionar a los panelistas pidiéndoles que ordenen soluciones de caramelo o leche tratada térmicamente (Jellinek, 1985).

### Entrenamiento

Aunque la evaluación del color se incluye en muchos estudios sensoriales hay muy pocos estudios que informen sobre cómo capacitar especialmente a los panelistas para hacer la evaluación visual de los alimentos.

Gámbaro, Giménez y Burgueño, (2001), en el mismo estudio sobre evaluación sensorial de color rojo en yogur de frutilla, propusieron la siguiente metodología de entrenamiento: se preparan ocho soluciones de colorante rojo ponceau 4R (E-124) utilizando yogur natural bebible como base; las concentraciones utilizadas se indican en la tabla 2.

Se cita a los jueces sensoriales a tres sesiones de trabajo, las que deben estar separadas entre sí por lo menos por dos horas, para evitar la fatiga de los evaluadores. En la primera sesión se entrega a los jueces sensoriales seis muestras (las A y B por duplicado y las C y D) para que evalúen la intensidad del color con una escala no estructurada de 10 cm con los extremos nada-mucho, siguiendo el diseño que se observa en la tabla 13. Todos los jueces sensoriales reciben las muestras en el mismo orden en cada sesión. Es importante presentar las muestras en forma monádica (o sea en forma individual) y retirar la muestra anterior antes de entregar la siguiente. En la segunda sesión se entregan para su evaluación con la misma escala las muestras A y B (por duplicado) y las E y F. En la tercera sesión se entregan las muestras A y B (por duplicado) y las G y H, siempre siguiendo el diseño de la tabla 13.

Esta forma de presentar las muestras permite el entrenamiento de los jueces en la cuantificación de la intensidad de color rojo y permite determinar la reproducibilidad del juicio individual de cada juez (en la misma sesión y en sesiones diferentes)

**TABLA 3.** Muestras y orden de presentación de las mismas en cada sesión de entrenamiento.

Sesión	Muestras y orden de presentación					
1	A	C	B	D	A	B
2	B	A	E	F	A	B
3	A	B	G	H	B	A

y la homogeneidad de juicios del panel. Para eso se realiza un análisis de varianza para los juicios obtenidos para las muestras A y B utilizando juez, muestra, sesión, repetición y sus interacciones como factores de variación. Este análisis permite identificar a los jueces con mayor varianza y mayor dispersión en sus juicios. El trabajo se puede repetir utilizando otros colorantes, hasta lograr un panel consistente en sus juicios.

Fernández-Vázquez *et al.* (2013), en el mismo estudio sobre evaluación sensorial de color de zumo de naranja, utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm de longitud para entrenar a los jueces en la evaluación de tonalidad (extremos amarillento-rojizo) e intensidad de color (extremos bajo a alto). Seleccionaron muestras para abarcar la gama de intensidad de color y el matiz en zumo de naranja comercial. Para eso utilizaron dos muestras comerciales de zumo de naranja y seis muestras preparadas a partir de diluciones de una de las muestras comerciales (6, 10, 30, 50, 60 y 80% respectivamente). Estas muestras fueron evaluadas en sesiones de quince minutos de duración. Al final de cada sesión se realizó una reunión de treinta minutos del líder con todos los miembros del grupo para unificar los criterios de evaluación. En cada sesión, los evaluadores evaluaron las muestras comerciales por duplicado y un par de las muestras diluidas. Las muestras evaluadas en cada sesión fueron las mismas para todos los evaluadores, pero el orden de

presentación a cada juez fue aleatorio. Sobre los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza de tres factores (juez, muestra y repetición) para las dos muestras comerciales y un análisis de varianza de dos factores (juez y muestra) para estas dos muestras y todas las diluciones (O'Mahony, 1986). Según los resultados obtenidos, los evaluadores con varianza más alta y mayor dispersión de juicio fueron retiraron del panel.

## CONCLUSIONES

La percepción humana del color tiene puntos fuertes y limitaciones y, si bien existen hoy métodos objetivos y precisos para cuantificar, definir, interpretar y comparar entre sí los colores, estos métodos no son totalmente representativos de la apreciación visual que realiza el ser humano.

Por otro lado, un panel de jueces entrenados en la evaluación del atributo color es una herramienta económica y sencilla de obtener (aunque costosa en tiempo y mano de obra), que podría constituirse en una alternativa para las pequeñas y medianas empresas que no siempre tienen disponibles instrumentos para la medición y el control de calidad del color. En ese caso, una adecuada selección y formación de los panelistas es esencial para un desempeño eficaz y eficiente del panel.

## REFERENCIAS

- ASTM. 1986. J. Eggert y K. Zook (eds.). *Physical Requirement Guidelines for Sensory Evaluation Laboratories*. American Section of the International Association for Testing Materials (ASTM) PCN 04-913000-36.
- Barron, R.W., Maraulja, M.D. y Huggart, R.L. 1967. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 80: 308-311.
- Calvo, C. 1992. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32: 589-602.
- Calvo, C., Durán, L. 1979. *Revista del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 19: 141-152.
- Calvo, C., Salvador, A. y Fiszman, S. 2001. *European Food Research and Technology* 213: 99-103.
- CIE. 2007. Commission Internationale de l'Eclairage. Standard Illuminants for Colorimetry. ISO, 11664-2.
- Costell, E., Durán, L. 1981. *Revista del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 21: 454-470.
- Dember, W.M. y Warm, J.S. 1979. *Psychology of Perception*. Austin: Holt, Rinehart & Winston.
- Dubose, C.N., Cardelloy, A.V., Maller, O. 1980. *Journal of Food Science* 45: 1393-1399.
- Durán, L. 1971. *Revista del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 11: 168-171.
- Durán, L., Costell, E. 1999. *Food Science Technology International* 5: 299-309.
- Farnsworth, D. 1957. *The Farnsworth-Munsell 100-Hue Test for the Examination of Color Discrimination*. Grand Rapids: Munsell Color Co.
- Fernández-Vázquez, R., Fisk, I., Hort, J., Hewson, L., Hernanz Vila, D., Heredia, F.J. et al. 2012. *Proceedings of 5th European Conference on Sensory and Consumer Research*. Berna.
- Fernández-Vázquez, R., Stinco, C.M., Hernanz, D., Heredia, F.J., Vicario, I.M. 2013. *Food Quality and Preference* 30: 320-327.
- Frata, M., Valim, M.F. y Monteiro, M. 2006. *Fruit Processing* 2: 116-121.
- Gámbaro, A., Giménez, A. y Burgueño, J. 2001. *Journal of Sensory Studies* 16: 11-22.
- Gámbaro, A., Raggio, L., Ellis, A.C., Amarillo, M. 2014. *Grasas y Aceites*. 65: 1-8.
- Gould, W. y Gould, R. 1988. *Total Quality Assurance for the Food Industries*. Houston: CTI Publications.
- Hutchings, J.B. 1977. *En Sensory Properties of Foods*. Barking: Applied Science Publishers.

## REFERENCIAS

- Hutchings, J. 2002. En D.B. MacDougall (ed.). *Colour in Food. Improving Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited/CRC Press LLC.
- ISO 8589. 1988. *Sensory Analysis. General Guidance for the Design of Test Rooms*. Ginebra: International Standards Organization (ISO).
- ISO 11037. 1999. *Sensory Analysis. General Guidance and Test Method for the Assessment of Color of Foods*. Ginebra: International Standards Organization (ISO).
- James W. 1893. *Psychology*. Nueva York: Henry Holt Company.
- Jellinek, G. 1985. *Sensory Evaluation of Food. Theory and Practice*. Chichester: Ellis Horwood.
- Johnson, J. 2014. *Designing With the Mind in Mind*. San Francisco: Morgan Kauffmann. ISBN: 978-0-12-407914-4.
- Johnson, J., Dzendolet, E., Damon, R., Sawyer, M., Clydesdale, F.M. 1982. *Journal of Food Protection* 45: 601-606
- Judd D.B. y Wyszecki, G. 1963. *Color in Business, Science and Industry*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Kramer, A. y Twigg, B.A. 1970. *Fundamentals of Quality Control for the Food Industry*. Nueva Delhi: Avi Pub.
- Kuehni, R.G. 2003. *Color Space and its Divisions: Color Order from Antiquity to the Present*. New Jersey: Wiley Interscience.
- Kumar, A. 2014. *En Principles of Colour and Appearance Measurement*. Cambridge: Woodhead Publishing. ISBN: 978-0-85709-229-8.
- Ohta, N. y Robertson, A.R. 2005. *Colorimetry: Fundamentals and Application*. Chichester: John Wiley.
- O'Mahony, M. 1986. *Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures*. Nueva York: Marcel Dekker.
- OSA. 1953. *The Science of Color*. Committee on Colorimetry of the Optical Society of America. Nueva York: Thomas Y. Cromwell.
- Poelman, A.A.M. y Delahunty, C.M. 2011. *Food Quality and Preference* 22: 355-364.
- Sancho, J., Bota, E. y De Castro, J.J. 1999. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
- Stillman, J.A. 1993. *Journal of Food Science* 58: 810-812.
- Tárrega, A. y Costell, E. 2007. *Journal of Food Engineering* 78: 655-661.
- Tepper, B.J. 1993. *Journal of Sensory Studies* 8: 145-154.
- Torricella, R.G., Zamora, E. y Pulido, H. 1989. *Evaluación sensorial en la industria alimentaria*. La Habana:

## REFERENCIAS

Centro de Información y Documentación Científico  
Técnica-Instituto de Investigaciones para la Industria  
Alimentaria (IIIA)/Ministerio de la Industria Alimentaria.

## CAPÍTULO 8

# ESTRATEGIAS COMPUTACIONALES PARA EVALUAR MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIRRADICAL DE CAROTENOIDES

Ana Martínez Vázquez



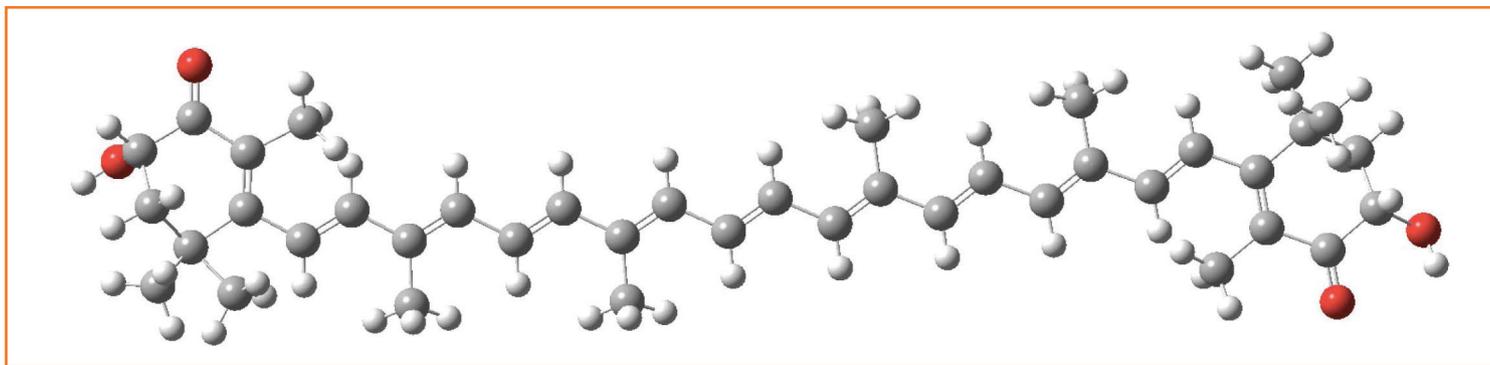
### INTRODUCCIÓN

#### Química computacional. Una descripción práctica

La química es el estudio de las transformaciones de la materia. La computación es la herramienta que utilizamos para hacer química a través de modelos matemáticos. Así, lo que nos distingue a los que hacemos química computacional no es lo que estudiamos sino las herramientas que utilizamos para nuestra investigación. Al principio, cuando los ordenadores o computadoras eran rudimentarias y solamente sumaban y restaban, no había forma de hacer química computacional, porque para eso necesitamos realizar muchas operaciones matemáticas y no éramos capaces de hacerlo en un tiempo razonable. Cuando la tecnología mejoró y con los ordenadores se pudieron hacer otras operaciones, se comenzaron a estudiar los átomos. Así, los primeros cálculos los hicieron los físicos y se refirieron al estudio del átomo de hidrógeno y del átomo de helio. Después, con el avance de la tecnología se pudieron estudiar átomos y moléculas de mayor tamaño, y hoy podemos investigar incluso sistemas como las proteínas.

Para la química computacional se requieren dos cosas fundamentalmente: un modelo matemático que te permita estudiar las reacciones químicas y una computadora que permita calcularlas (Cuevas y Cortés, 2003). El modelo matemático comenzó en 1900 cuando Max Planck señaló que la energía está cuantizada (Planck, en Kangro, 1972). El que la energía esté cuantizada significa que no puede tomar cualquier valor, que todos los valores son múltiplos de uno, es decir, tenemos un valor base y todos los demás son ese valor base una vez, dos veces, tres o más. Para entender esto de la energía cuantizada podemos utilizar una analogía. La energía está cuantizada igual que está cuantizada la moneda de un país. Pensemos en España: la moneda oficial es el euro; la menor denominación de la moneda es un céntimo y todo lo demás es múltiplo de ese céntimo. No puede haber precios que incluyan medio céntimo porque no existe. En México la moneda oficial es el peso: la menor denominación son diez centavos, no existen el centavo ni los cinco centavos. Todos los precios tienen que ser múltiplos de diez centavos, porque los cinco centavos no existen. No te pueden cobrar un peso con cinco centavos. Así, mientras que el euro está “cuantizado” y su mínima cantidad es un céntimo, el peso mexicano está “cuantizado” y su mínima cantidad es diez centavos. Lo mismo sucede con la energía. Al mínimo valor de energía se le llama *quanto*, y ese quanto depende del sistema en cuestión. Cabe señalar que la idea de que la energía está cuantizada es un modelo, es una representación de la realidad lo mismo que cuando decimos que la energía se conserva. Con estos modelos se pueden explicar muchas cosas, si no es que todas hasta el momento, pero no debemos de perder de vista que son eso, modelos, representaciones de la realidad, y que por lo tanto se pueden cambiar y modificar por otros que pensemos que pueden ser mejores (Martínez, Galano y Ortiz, 2013).

Con base en la cuantización de la energía se desarrolló la química cuántica, cuya ecuación fundamental es la ecuación de Shrödinger. En esta ecuación la variable fundamental es la función de onda que describe la posición de cada electrón. A la función de onda los químicos la llamamos “orbital”. Así, un orbital es una función matemática, igual que lo es la ecuación de una línea recta, que describe la posición más probable en la que se pueden encontrar los electrones. No es la “casita” del electrón, no es un “lugar en el espacio”. Es una función matemática un poco complicada. Todos los métodos que se encuentran en la bibliografía que se llaman *Hartree-Fock* o *post Hartree-Fock* basan sus cálculos en la ecuación de Shrödinger, para lo cual se utilizan muchas aproximaciones, porque la solución exacta para esta ecuación sólo se puede tener para el átomo de hidrógeno. Esto es porque la descripción de los sistemas es complicada cuando hay más de un electrón y un protón, ya que entonces tenemos lo que llamamos el “problema de muchos cuerpos”. El problema de muchos cuerpos surge cuando hay más de dos cuerpos (más de un electrón y un protón) y se refiere a que la descripción del movimiento se complica, ya que el movimiento de un cuerpo influye en los otros. Los electrones se repelen. Los protones atraen a los electrones y cualquier movimiento de ellos genera un efecto en los demás. Si queremos describir electrón por electrón, la resolución del modelo matemático es muy complicada. Sabiendo esto, en 1964 dos investigadores inventaron el modelo de Hohenberg y Kohn (1964)] (llamado así por los apellidos de estos dos científicos). Este nuevo modelo matemático se basa en la densidad electrónica. La densidad electrónica se refiere al número de electrones en un cierto volumen. La idea de este modelo es utilizar todos los electrones que se sitúan en un volumen determinado en lugar de describir el sistema considerando electrón por electrón. A este modelo se le llama la “teoría de funcionales de la densidad” y su



**FIGURA 1.** Representación de la estructura de astaxantina antes de la optimización de geometría.

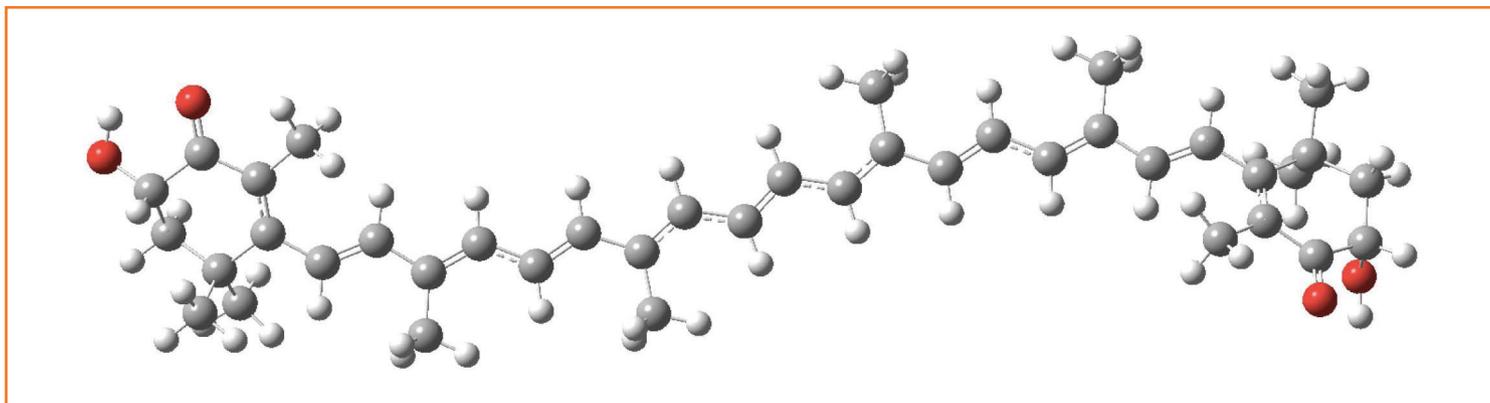
variable fundamental es la densidad electrónica. Por último, la reactividad química se rige principalmente por el movimiento de los electrones, así que basta con describir la densidad electrónica para poder explicar la reactividad química. No es necesario saber dónde está cada uno de los electrones, con saber dónde están la mayoría es suficiente. Como no se calcula electrón por electrón, los cálculos basados en la densidad electrónica toman mucho menos tiempo que los que utilizan la función de onda como variable fundamental. En la teoría de funcionales de la densidad también se utilizan aproximaciones y por eso en la bibliografía se encuentran distintos funcionales: el de Becke-Perdew, el M062X, el híbrido B3LYP, etcétera. Ya sea con los modelos basados en la función de onda o con los modelos basados en la densidad electrónica, la química computacional es posible gracias al desarrollo de la informática. La química teórica ha expandido sus posibilidades gracias a los nuevos ordenadores o computadoras y los nuevos códigos computacionales, que permiten estudiar moléculas con cada vez más átomos.

Los que hacemos química computacional empezamos

construyendo la molécula que vamos a estudiar. Por ejemplo, si vamos a estudiar la astaxantina, un carotenoide de color rojizo, construimos a la molécula sabiendo los átomos que tiene y la estructura más probable. Nos quedaría como se muestra en la figura 1:

Igual que un químico empieza sus investigaciones a partir de una o varias sustancias que va a estudiar poniéndolas a reaccionar, en la química computacional el primer paso es tener una estructura geométrica, un arreglo de los átomos en la molécula, que tenga el menor valor de energía, porque dentro de los modelos de la fisicoquímica sabemos que las cosas tienden a estar en un estado de mínima energía. A este proceso se le conoce como la “optimización de geometría”. Una vez que se tiene la estructura con menos energía, se empieza a estudiar todo lo demás. Si volvemos a la astaxantina, la estructura después de optimizarla se ve como en la figura 2:

La diferencia entre ambas parece ser sutil, pero esta estructura tiene menos energía que la inicial. Es más estable por 577 kcal/mol. Si pensamos que la energía que una mujer



**FIGURA 2.** Representación de la estructura de astaxantina después de la optimización de geometría.

“estándar” tiene que consumir diariamente para sobrevivir es de unas 1500 kcal nos daremos cuenta de que es una gran diferencia. Es importante tener la estructura de menor energía porque si no, no podemos explicar ni reproducir ningún dato experimental.

Una vez que se tiene la estructura más estable se pueden seguir calculando cosas. Podemos obtener el espectro de infrarrojo o de Raman, podemos analizar las cargas y podemos ver la ocupación de los orbitales, la forma de los orbitales para decidir si son de enlace o antienlace y con eso definir la forma en que los átomos están enlazados. Una de las propiedades que calculamos es la energía de ionización, que se refiere a la energía que se requiere para arrancarle un electrón a una molécula. Al quitarle un electrón la molécula queda con carga +1. También podemos calcular la energía necesaria para quitarle un electrón a una especie aniónica, esto es, una especie química que tiene un electrón de más y que por lo tanto tiene carga -1. A esa energía se le llama afinidad electrónica y nos indica, como su nombre lo dice, que tan afín

es una especie por un electrón de más. Estas dos cantidades son las que utilizamos para estudiar los antioxidantes como los carotenoides.

### Mecanismos de reacción: ¿a qué nos referimos cuando decimos antioxidante?

Cuando en el mundo de los alimentos y en la vida cotidiana decimos antioxidante nos referimos a sustancias que son capaces de reducir el estrés oxidativo porque atrapan radicales libres. Los radicales libres que producen el estrés oxidativo son especies químicas que tienen oxígeno en su mayoría, y que se producen como producto de respirar oxígeno. Un radical libre tiene la característica de tener un electrón desapareado, sin pareja. Los electrones se pueden describir en los orbitales acomodándolos por parejas y eso le suele dar estabilidad al sistema. Una especie química que tiene electrones sin pareja suele reaccionar más. En particular los radicales libres asociados con el estrés oxidativo son moléculas con oxígeno

que tienen electrones desapareados y que son muy reactivas. Reaccionan con todo produciendo cambios importantes en las proteínas, en las bases nitrogenadas y en los ácidos grasos, que son moléculas fundamentales para la vida. Para atrapar radicales libres, las sustancias que tienen esta función lo hacen a través de dos mecanismos fundamentales: la transferencia de electrones y la transferencia de átomos de hidrógeno.

Cualquier especie química que atrape radicales libres por estos métodos se conoce como antioxidante. Si analizamos con cuidado cada uno, de lo que se trata es de aparear al electrón. Lo podemos aparear dándole electrones o quitándoselos, o enlazándole un átomo de hidrógeno que solamente tiene un electrón, con lo cual el electrón también queda apareado. El problema es que la palabra antioxidante está muy bien definida en la química y no es la que solemos utilizar para describir la capacidad de atrapar radicales libres.

Para entender lo que es un antioxidante primero hay que ponernos de acuerdo en lo que es un oxidante y antes de eso hay que definir lo que es la oxidación. La oxidación se refiere a la pérdida de electrones. Cuando una especie se oxida es porque pierde electrones. Los electrones no se pierden en la nada. Lo que sucede es que se transfieren de una especie química que los pierde a otra especie química que los gana. La especie que pierde electrones se oxida, la que los gana se reduce. La ganancia y la pérdida de electrones siempre van de la mano, porque cuando una especie química se oxida es porque otra se reduce. Este proceso se conoce como Redox (que viene de juntar las dos palabras "REDucción" y OXIdación").

Oxidación es pérdida de electrones

Reducción es ganancia de electrones

Ahora bien, un oxidante es aquel que oxida a otra especie química. Para oxidarla le quita electrones, es decir, gana electrones, es decir, se reduce. Si seguimos, el antioxidante evita la oxidación de una especie química porque se oxida primero. Todo esto parece un trabalenguas y lo es, porque los químicos somos así. Definimos todo en dos términos: ácido-base, oxidante-reductor, metal-no metal. Pero en resumen un antioxidante va a evitar que una especie química se oxide porque se va a oxidar primero. Para oxidarse primero tiene que perder electrones más fácilmente. En términos de energía, tiene que tener una energía de ionización baja para poder ser un antioxidante. Como vemos con esto, antioxidante solamente se refiere a uno de los mecanismos por los cuales una especie atrapa radicales libres, al de la transferencia de electrones, y solamente al mecanismo en el que el radical libre acepta un electrón de la especie antioxidante. Existen otros mecanismos, porque el radical libre también puede darle electrones al antioxidante, o puede aceptar átomos de hidrógeno (Martínez, Vargas y Galano, 2009). Por eso nos parece que el término antioxidante es limitado, y que es mejor llamar a los atrapadores de radicales libres "antirradicales". En este capítulo así los llamaremos para no confundirnos con los químicos. A continuación encontraremos la forma en que con la química computacional estudiamos los dos mecanismos de acción principales de las sustancias que funcionan como antirradicales.

## ESTUDIOS COMPUTACIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES

La transferencia de electrones se refiere a eso, a que los electrones se pasan de una molécula a otra. Este es un mecanismo de reacción que aparece en muchas reacciones químicas. De hecho se puede ver como el primer paso de muchas interacciones. De manera coloquial podemos decir que al igual que el “contacto visual” entre dos personas puede ser la primera interacción importante, la transferencia de electrones entre dos moléculas puede dar lugar a una reacción química. Como en el proceso de transferencia de electrones no se rompen ni forman enlaces, ni se mueven los átomos de su lugar, se puede pensar que la transferencia de electrones es el proceso más rápido. En las sustancias que actúan como atrapadores de radicales libres, este mecanismo es importante.

### Mapa donador aceptor de electrones

Para estudiar la transferencia de electrones lo que necesitamos es calcular la energía de ionización y la afinidad electrónica, porque estas dos cantidades son las que regulan que los electrones se pasen de una molécula a la otra. Recordemos que la energía de ionización es la energía necesaria para quitarle un electrón a una molécula neutra. Si representamos cualquier molécula con la letra A, la ecuación que describe a la ionización es la siguiente

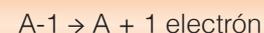


y la energía de ionización (VIE) se calcula como

$$VIE = E(A^+) - E(A) \quad [1]$$

$E(A^+)$  se refiere a la energía de la molécula cuando ya perdió un electrón, y  $E(A)$  es igual a la energía de la molécula neutra, con todos sus electrones. Si la energía de ionización es baja significa que es “fácil” quitarle un electrón a la especie neutra. La molécula será un buen donador de electrones.

La afinidad electrónica (VEA) es igual que la energía de ionización pero referida a una molécula que tiene un electrón de más, es decir, que es un anión. Si representamos el anión como  $A^-$ , entonces la ecuación que describe la ionización del anión es la siguiente



y la afinidad electrónica (VEA) se calcula como

$$VEA = E(A) - E(A^-) \quad [2]$$

En esta ecuación  $E(A)$  es la energía de la molécula neutra y  $E(A^-)$  es la energía de la molécula que tiene un electrón de más (un anión). Una molécula que es muy afín por los electrones los aceptará con “facilidad” y su afinidad electrónica será alta. En resumen, para una buena transferencia de electrones la energía de ionización de la molécula que cede electrones tiene que ser baja y la afinidad electrónica de la molécula que los acepta tiene que ser alta. Estos dos datos, la energía de ionización y la afinidad electrónica, se pueden calcular sin mayor problema para cada molécula de interés, utilizando la química computacional. Una vez que se tienen los valores para cada molécula se pueden utilizar para hacer lo que llamamos un mapa donador aceptor de las moléculas en cuestión (Martínez *et al.*, 2008). Si graficamos en el eje de las X la afinidad electrónica (VEA), y en el eje de las Y la energía de ionización (VIE) podemos clasificar las regiones como se

indica en el figura 3. La localización de cada molécula en el mapa indicará si son buenos donadores o buenos aceptores de electrones. Las moléculas situadas abajo a la izquierda tienen valores bajos de energía de ionización y de afinidad electrónica, por lo que son buenos donadores y malos aceptores de electrones. Las moléculas localizadas arriba a la derecha tienen altos valores de energía de ionización y de afinidad electrónica, por lo que serán buenos aceptores y malos donadores de electrones. Los electrones se transferirán desde un buen donador hacia un buen aceptor como lo indica la flecha, es decir, las moléculas situadas arriba a la derecha le quitarán electrones a las situadas abajo a la izquierda.

Con la ayuda de la química computacional y del mapa donador aceptor de electrones (*full electron donor acceptor map*, FEDAM) podemos clasificar todas las sustancias como donadoras o comoceptoras de electrones. Es importante

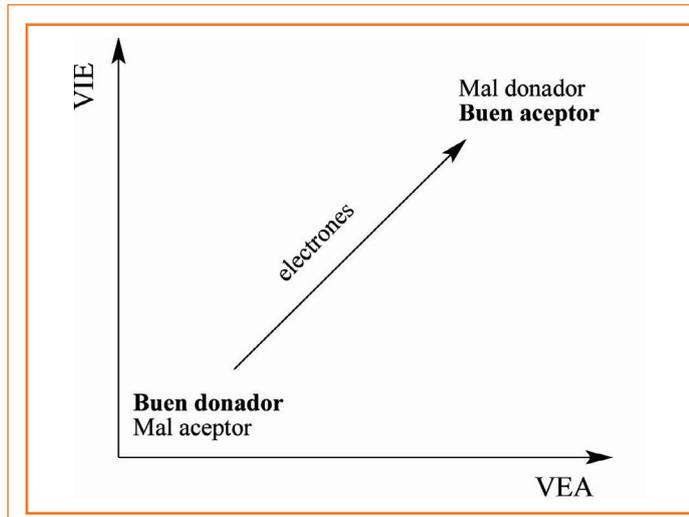
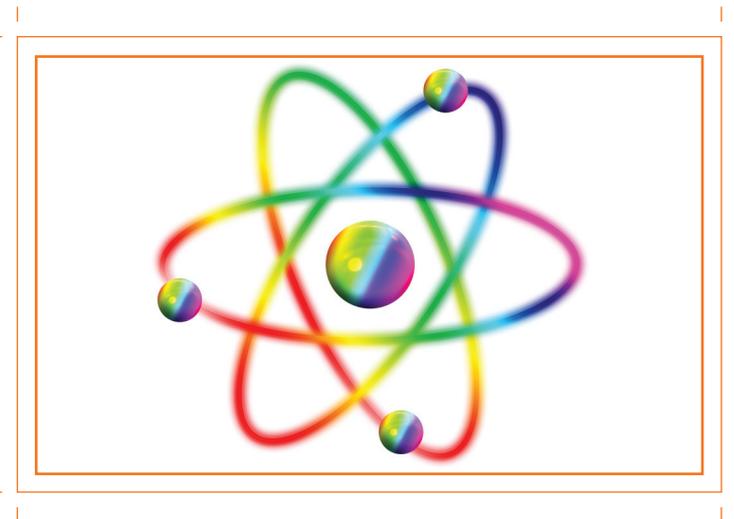


FIGURA 3. Mapa Donador Aceptor de electrones

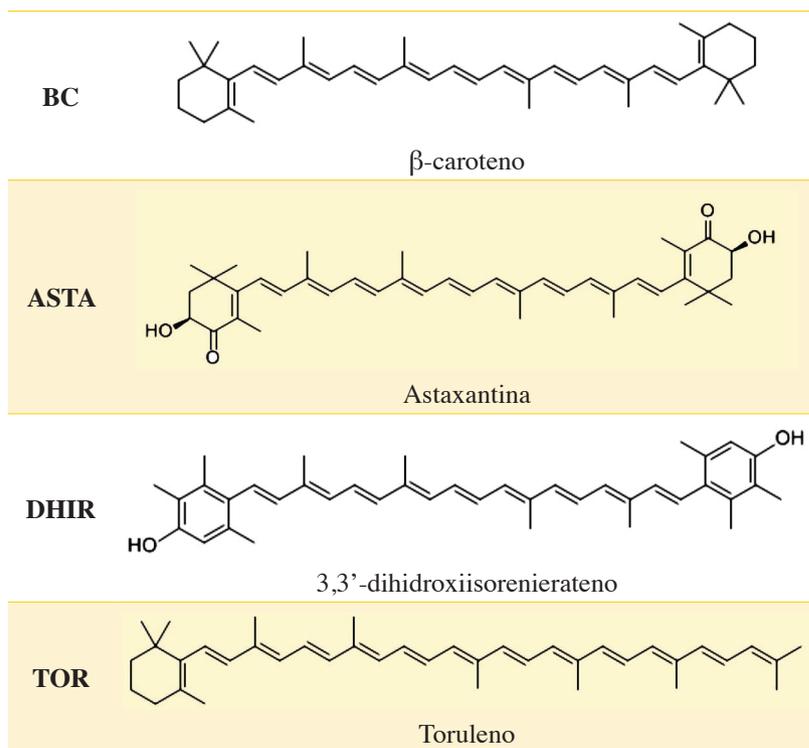


reconocer que estos parámetros son relativos. Una molécula es mejor donadora que otra, no es buena donadora en términos absolutos. Lo mismo sucede con la capacidad de aceptar electrones. Una molécula es mejor aceptando electrones que otra porque su afinidad electrónica es mayor. Al utilizar el FEDAM se pudieron clasificar los carotenoides y comparar frente a diversos radicales libres.

### Carotenoides en el FEDAM

Para estudiar la capacidad antioxidante de diversos carotenoides en función de la transferencia de electrones se calcularon las estructuras de cuatro carotenoides y de distintos radicales libres. Una vez que se encontraron las estructuras más estables se calculó la energía de ionización y la afinidad electrónica de cada una. Con estos valores se localizaron las moléculas en el FEDAM y se pudieron clasificar. En la tabla 1 se presentan las fórmulas moleculares de los carotenoides que se utilizaron como ejemplo.

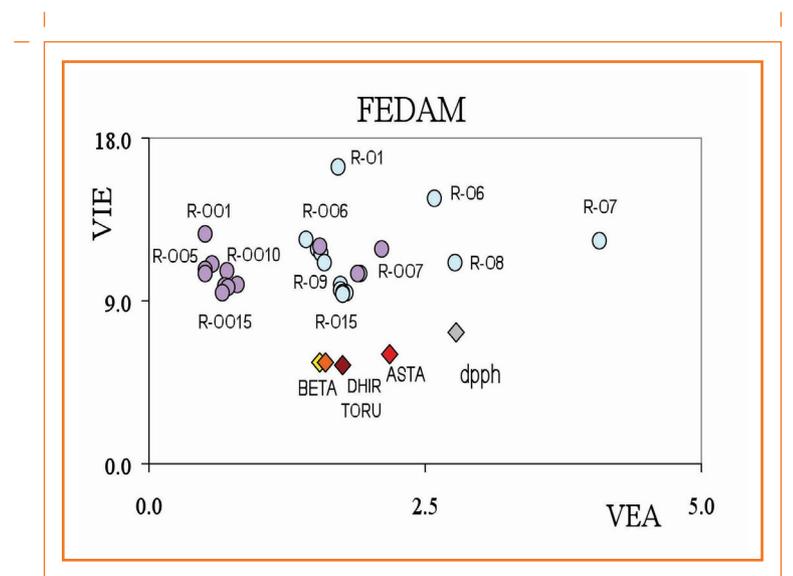
**TABLA 1.** Fórmula molecular de los carotenoides analizados para la elaboración del mapa donador aceptor de electrones



Para comparar se calculó el DPPH (2,2-difenil –1-picrylhydrazil) que es una sustancia muy utilizada en el análisis de la capacidad antirradical de distintas moléculas, y también se estudiaron algunos peroxilos ( $ROO\bullet$ ) y alcoxidos ( $RO\bullet$ ). Estos últimos son ejemplos de radicales libres de los que producen el estrés oxidativo. Utilizando los valores de VEA y VIE se localizaron las moléculas en el mapa como se muestra en la figura 4.

En el FEDAM, lo que se localice arriba a la derecha le podrá quitar electrones a lo que se sitúe abajo a la izquierda sin

un costo energético grande. Así, podemos decir que los radicales libres etiquetados como R-O6, R-O7 y R-O8 le quitarán electrones a los cuatro carotenoides (BETA, DHIR, ASTA y TORU). Los radicales libres peroxilos ( $ROO\bullet$ ) están en su mayoría situados arriba a la izquierda de los carotenoides, con lo cual no podrán quitarles electrones. El DPPH está arriba y a la derecha de los carotenoides y también podrá aceptar electrones de los carotenoides. Hay muchos radicales libres situados arriba de los carotenoides, que tienen más o menos el mismo valor de VEA pero valores de VIE mayores. La transferencia electrónica entre estos radicales libres y los carotenoides tampoco podrá ser sin un gasto de energía considerable. Analizando con más detalle los resultados podemos decir que mientras más separadas estén dos moléculas en su localización en el mapa, mejor será la transferencia de electrones entre ellas. Así, el BETA es el



**FIGURA 4.** FEDAM con los carotenoides de la Tabla 2 y diversos radicales libres.

carotenoide que está más abajo a la izquierda, lo que hace que sea el mejor donador y es la que está más separada de las moléculas situadas arriba a la derecha será la sustancia que done electrones con más "facilidad". La mejor transferencia de electrones que se podrá dar será entre BETA y R-O7, ya que son estas moléculas las que están más separadas. Así, con este FEDAM podemos clasificar cualquier molécula que se nos ocurra.

En general los radicales libres aceptan electrones de las moléculas que funcionan como antirradicales; sin embargo, existe un radical libre que actúa como donador, que es el anión radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Galano, Vargas, Martínez, 2010). En la figura 5 localizamos este radical en el FEDAM y dos de los carotenoides que estudiamos, el BETA y el ASTA. En este caso los carotenoides están arriba a la derecha del radical libre, con lo cual la transferencia de electrones será desde el

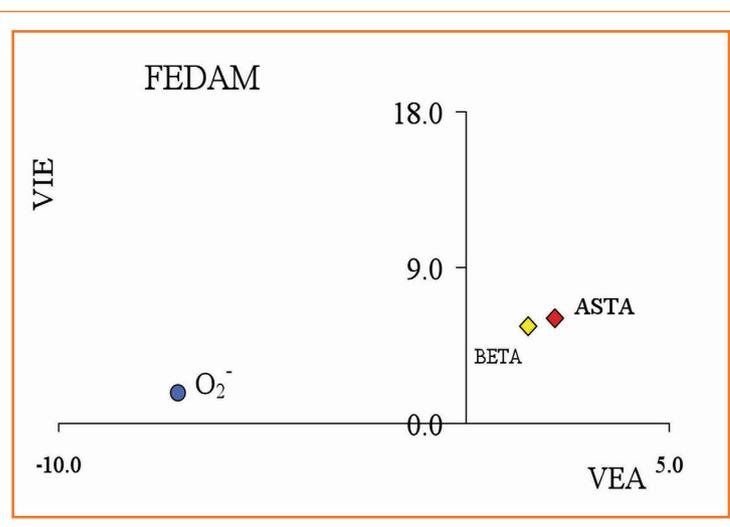


FIGURA 5. FEDAM de astaxantina (ASTA) y  $\beta$ -caroteno (BETA) con  $O_2^-$ .

radical hacia los carotenoides. Como ASTA está más arriba a la derecha, la mejor transferencia será con este carotenoide, y este carotenoide será mejor antirradical frente al  $O_2^-$ .

## ESTUDIOS COMPUTACIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE HIDRÓGENO

En el proceso en el cual un átomo de hidrógeno se transfiere de una molécula a otra se tienen que romper y formar enlaces. Esto hace que este proceso no sea tan rápido como puede ser la transferencia de electrones. Para estudiar este proceso se tiene que considerar la energía de enlace del hidrógeno a la molécula de la que se va a desprender, y la energía de enlace del hidrógeno con la molécula con la que se va a quedar. Tiene que haber una ganancia de energía en el proceso, porque si no la hay, no se lleva a cabo. La energía necesaria para romper el enlace del átomo de hidrógeno tiene que ser menor que la energía que se ganará cuando se forme el nuevo enlace.

Cuando una molécula pierde un átomo de hidrógeno el proceso se conoce como deshidrogenación. El hidrógeno es un átomo que tiene un protón y un electrón. Cuando el átomo de hidrógeno se transfiere a un radical libre, se forma un nuevo compuesto que ya no tiene electrones desapareados. Por ejemplo, si tomamos al radical libre  $OH\bullet$ , que tiene un electrón desapareado, y lo ponemos a reaccionar con el hidrógeno que también tiene un electrón sin pareja, se formará  $H_2O$  que no tiene electrones desapareados. Con esto se estabiliza la situación. Las moléculas que pueden ceder átomos de hidrógeno con un costo de energía bajo son buenas sustancias antirradicales.

## ¿Qué parámetros utilizar para este mecanismo?

La forma de medir qué tan fácil o difícil es que una molécula ceda un átomo de hidrógeno, es decir, se deshidrogene, es calculando la energía necesaria para que eso suceda. Puesto en una ecuación química y tomando como ejemplo de antirradicales los carotenoides (CAR), podemos representar como CAR-H al mismo carotenoide deshidrogenado y como H• al átomo de hidrógeno. Utilizando estos símbolos, la ecuación que representa el primer paso del proceso es la siguiente:



El segundo paso es que el hidrógeno se una con el radical libre (R•), de acuerdo con la siguiente ecuación:



Como lo primero que tiene que suceder es que el hidrógeno se desprenda del CAR, lo que podemos calcular es la energía para que eso suceda, que se conoce como energía de disociación. Aquel antirradical (por ejemplo, cualquier carotenoide) que tenga menor energía de disociación, será mejor sustancia para combatir los radicales libres (Martínez y Barbosa, 2008). Con la química computacional podemos calcular estas energías. Como en general no se sabe cuál de todos los hidrógenos que tiene una molécula se desprende con menor costo energético, hay que calcular una por una todas las moléculas sin hidrógeno y con eso ir calculando cada energía de disociación. Por ejemplo si tomamos el  $\beta$ -caroteno y consideramos la numeración de cada átomo de carbono como se indica a continuación, tenemos que calcular la molécula sin cada hidrógeno, una por una. Como la molécula es simétrica, sólo tenemos que probar con los hidrógenos localizados en los carbonos del uno al 20. Para eso tomamos la molécula, quitamos un hidrógeno, optimizamos su geometría y obtenemos el valor de la energía de la molécula deshidrogenada. Volvemos a tomar la molécula entera, quitamos otro hidrógeno, volvemos a optimizar la geometría

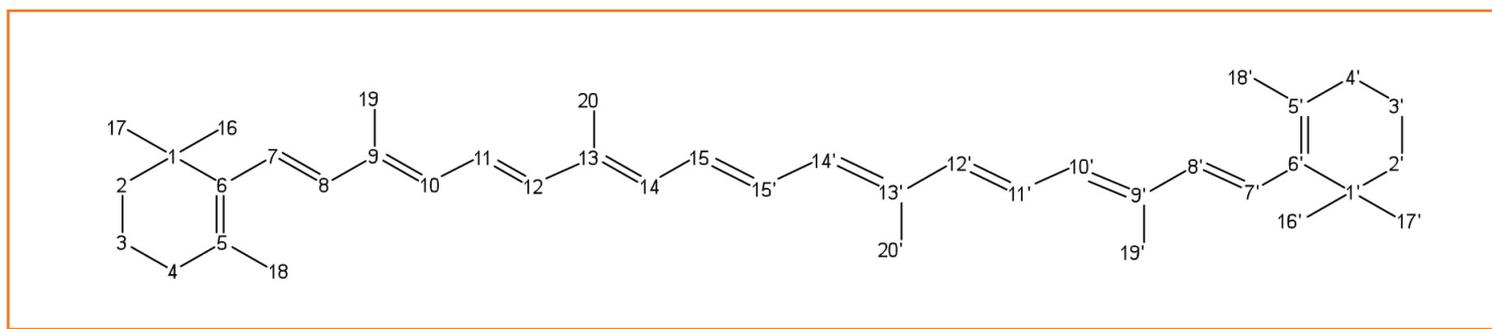


FIGURA 6. Numeración de los átomos de carbono del  $\beta$ -caroteno.

y obtenemos el valor de la energía de esta nueva molécula deshidrogenada. Cuando se calculan todas las opciones de moléculas deshidrogenadas, se comparan los valores de energía y se calculan para cada caso las energías de disociación ( $D_0$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D_0 = [E(\text{CAR-H}) + E(\text{H})] - E(\text{CAR}) \quad [3]$$

donde  $E(\text{CAR-H})$  es la energía de la molécula sin un hidrógeno,  $E(\text{H})$  es la energía del átomo de hidrógeno y  $E(\text{CAR})$  es la energía de la molécula completa. Así tendremos muchas energías de disociación que podemos comparar. La menor representa al hidrógeno, que es menos costoso disociar. La molécula que lo contenga será el mejor antirradical conforme este mecanismo. Con la química computacional podemos calcular la energía de disociación de todas las moléculas que queramos estudiar, y compararlas entre sí para ver cuál es el mejor antirradical.

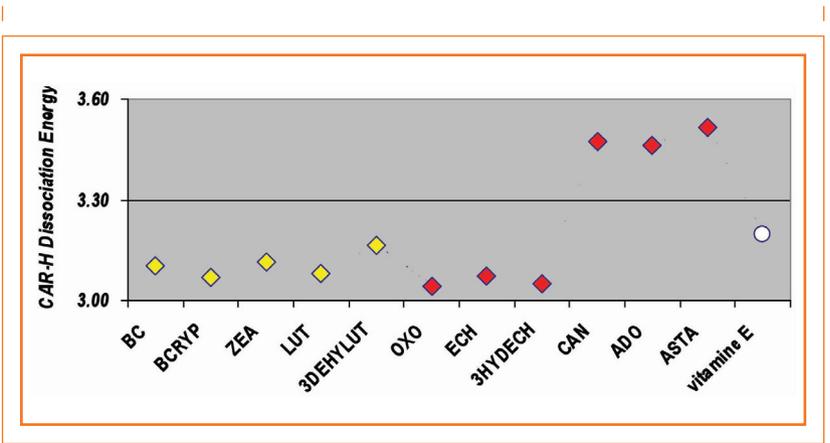


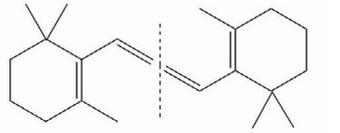
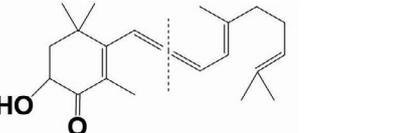
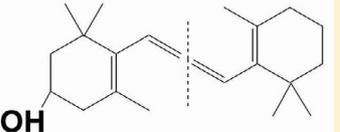
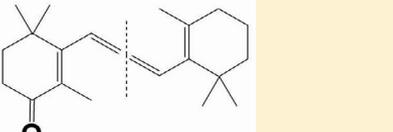
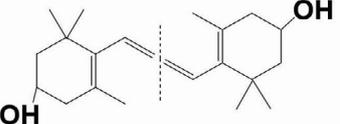
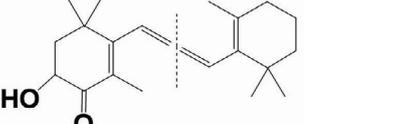
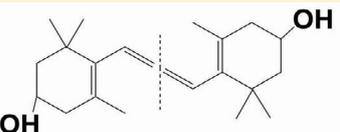
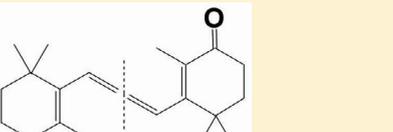
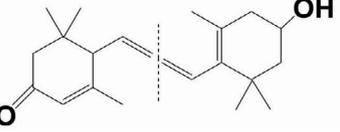
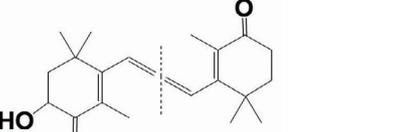
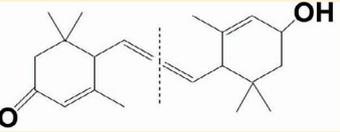
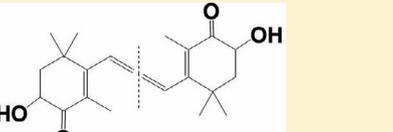
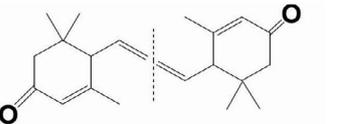
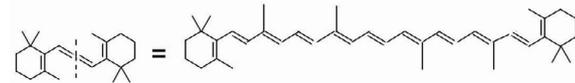
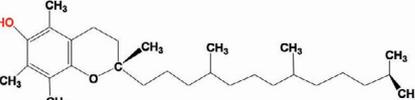
FIGURA 7. Energía de disociación (en eV/mol) del átomo de hidrógeno que se disocia con menor costo energético, de las moléculas de la Tabla 2.

## Carotenoides que participan como antirradicales a través de la transferencia de hidrógeno

Los carotenoides también funcionan como antirradicales a través del mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno. Si tomamos como ejemplo la vitamina E y los carotenoides que se presentan en la tabla 2, podemos calcular la energía de disociación y podremos saber cuál de todos ellos es mejor antirradical. En la figura 7 se presentan los resultados de las energías de disociación para cada molécula de la tabla 2.

En cada caso se incluye la energía correspondiente al hidrógeno que es menos costoso energéticamente disociar. De todas las moléculas graficadas en el figura 7, la 4-oxo-rubixantina (OXO) es la que tiene una energía de disociación menor, y por lo tanto podemos decir que será el mejor antirradical. El que presenta una mayor energía de disociación es la astaxantina (ASTA), por lo que es una sustancia que tiene menos capacidad de atrapar radicales libres con este mecanismo. La vitamina E tiene una energía de disociación del átomo de hidrógeno que la hace ser mejor que algunos carotenoides y peor que otros. Con la energía de disociación podemos clasificar todos los atrapadores de radicales libres como buenos, malos o regulares.

TABLA 2. Fórmula estructural de distintos carotenoides y de la vitamina E

<p><math>\beta</math>-caroteno (BC)</p>		<p>4-oxo-rubixantina (OXO)</p>	
<p><math>\beta</math>-criptoxantina (BCRYP)</p>		<p>Equinenona (ECH)</p>	
<p>Zeaxantina (ZEA)</p>		<p>3-hidroxi-equinenona (3HYDECH)</p>	
<p>Luteína (LUT)</p>		<p>cantaxantina (CAN)</p>	
<p>3-dehydro-lutein (3DEHYDLUT)</p>		<p>adonirubina (ADO)</p>	
<p>3-hidroxi-<math>\epsilon,\epsilon</math>-caroten-3-ona (3HYDCAR)</p>		<p>astaxantina (ASTA)</p>	
<p><math>\epsilon,\epsilon</math>-caroten-3,3'-diona (33CAR)</p>			
<p>Vitamina E</p>			

## QUÍMICA COMPUTACIONAL Y ANTIRRADICALES: UNA CONCLUSIÓN

Todos los seres vivos que respiramos oxígeno sufrimos estrés oxidativo porque al respirar producimos de manera inevitable radicales libres. El estrés se debe a que esos radicales libres son muy reactivos, y van interaccionando con las moléculas de los organismos que son vitales. Por eso, a través de la evolución se han generado mecanismos para protegernos de los radicales libres. Uno de esos mecanismos consiste en tener sustancias que los atrapen para que entonces no nos hagan daño reaccionando con todo lo que se les pone enfrente. Dos de los mecanismos más importantes para atrapar radicales libres son los que se han expuesto en este capítulo: la transferencia de electrones y la transferencia de átomos de hidrógeno. Con la química computacional podemos estudiarlos y entender los mecanismos, así como predecir consecuencias

y resultados que después se corroboran en el laboratorio con los experimentos.

De la química computacional quizá lo más importante que hay que recordar es que todo lo que hacemos se basa en calcular la energía de las sustancias que participan en las distintas reacciones. Con base en la energía nosotros alcanzamos todas las conclusiones y explicamos los fenómenos. Lo que utilizamos son modelos, representaciones de la realidad que nos ayudan a entenderla. La parte fundamental de esos modelos que estudiamos es la que se refiere a que la energía está cuantizada, como la moneda de cualquier país.

Así con la química computacional hemos entendido muchos procesos antirradicales, y estamos seguros que podremos entender muchos más que aún nos faltan por estudiar...

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Instituto de Investigaciones en Materiales y de la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC).

## REFERENCIAS

- Cuevas, G. y Cortés, F. 2003. *Introducción a la química computacional*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Galano, A., Vargas, R. y Martínez, A. 2010. "Carotenoids Can Act as Antioxidants by Oxidizing the Superoxide Radical Anion. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12: 193-200.
- Hohenberg, P. y Kohn, W. 1964. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* 136: B864-B871.
- Kangro, H. 1972. *Planck's Original Papers in Quantum Physics*. Londres: Taylor & Francis. Disponible en: <<https://archive.org/details/PlancksOriginalPapersInQuantumPhysics>>
- Martínez A. y Barbosa, A. 2008. "Antiradical Power of Carotenoids and Vitamin E: Testing the Hydrogen Atom Transfer Mechanism". *Journal of Physical Chemistry B* 112: 16945-16951
- Martínez, A., Rodríguez-Gironés, M.A., Barbosa, A. y Costas, M. 2008. "Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins". *Journal of Physical Chemistry A* 112: 9037-9042.
- Martínez, A., Vargas, R. y Galano, A. 2009. "What is Important to Prevent Oxidative Stress? A Theoretical Study on Electron Transfer Reactions between Carotenoids and Free Radicals". *Journal of Physical Chemistry B* 113: 12113-12120.
- Martínez, A., Galano, A. y Ortiz, J.V. 2013. *Elena y Gerónimo. Libro de divulgación sobre la química computacional*. México: Editorial Terracota.

# BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES: CONSIDERACIONES GENERALES

M. Águila Ruiz-Sola y Manuel Rodríguez-Concepción



## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (incluidas las plantas) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. Con algunas pocas excepciones (Moran y Jarvik, 2010), los animales no pueden sintetizarlos sino que los obtienen a través de la dieta. Los carotenoides desempeñan numerosas y diversas funciones en el mundo vegetal dentro del metabolismo primario y secundario de las plantas. La síntesis de carotenoides en las plantas es ubicua y ocurre en todos los tipos de plastos.

Entre sus funciones, los carotenoides son pigmentos que proporcionan color entre el amarillo y el rojo a flores, frutos y semillas de numerosas especies vegetales, y actúan como señales visibles para los animales que contribuyen a la polinización o la dispersión de las semillas. En estos órganos, los carotenoides se acumulan en plastos especializados en su almacenamiento elevado que se denominan cromoplastos

(Deruère *et al.*, 1994; Simkin *et al.*, 2007). En los cloroplastos de los tejidos verdes (fotosintéticos), la biosíntesis de carotenoides también es elevada pero, a diferencia de los anteriores, el perfil de carotenoides no varía entre distintas especies vegetales sino que se mantiene constante (45% de luteína, 25-30% de  $\beta$ -caroteno y 10-15% de las  $\beta,\beta$ -xantofilas violaxantina y neoxantina) (Britton, 1993), con escasas excepciones. En los cloroplastos, los carotenoides se asocian con las clorofilas y las proteínas que forman los complejos fotosintéticos en las membranas tilacoidales, donde colaboran en la captación de luz y desempeñan un papel fundamental en la fotoprotección contra el exceso lumínico (Demmig-Adams, Gilmore y Adams, 1996). Como consecuencia de la gran acumulación de clorofilas en las hojas, los colores de los carotenoides sólo se hacen visibles cuando éstas se degradan y resultan en los colores otoñales característicos de muchos bosques de las áreas templadas del planeta. Aunque en niveles mucho más reducidos, los carotenoides también se producen en los etioplastos de las plántulas germinadas y crecidas en la oscuridad, donde facilitan la transición al desarrollo fotosintético una vez que emergen a la luz (Park *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón, Gas y Rodríguez-Concepción, 2009). La síntesis de carotenoides también tiene lugar en leucoplastos, como los que se encuentran en las raíces. En la mayoría de las especies vegetales, la presencia de carotenoides es tan baja que las raíces permanecen incoloras al ojo humano (Howitt y Pogson, 2006). Sin embargo, algunas especies vegetales, como la zanahoria y la yuca, presentan variedades que acumulan grandes cantidades de carotenoides en cromoplastos que se diferencian en estos órganos. En todos los tipos de plastos, los carotenoides son precursores de importantes hormonas, como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas (SL), responsables de la regulación de numerosos aspectos del desarrollo vegetal y de la interacción

de las plantas con su medio (Nambara y Marion-Poll, 2005; Ruyter-Spira *et al.*, 2013).

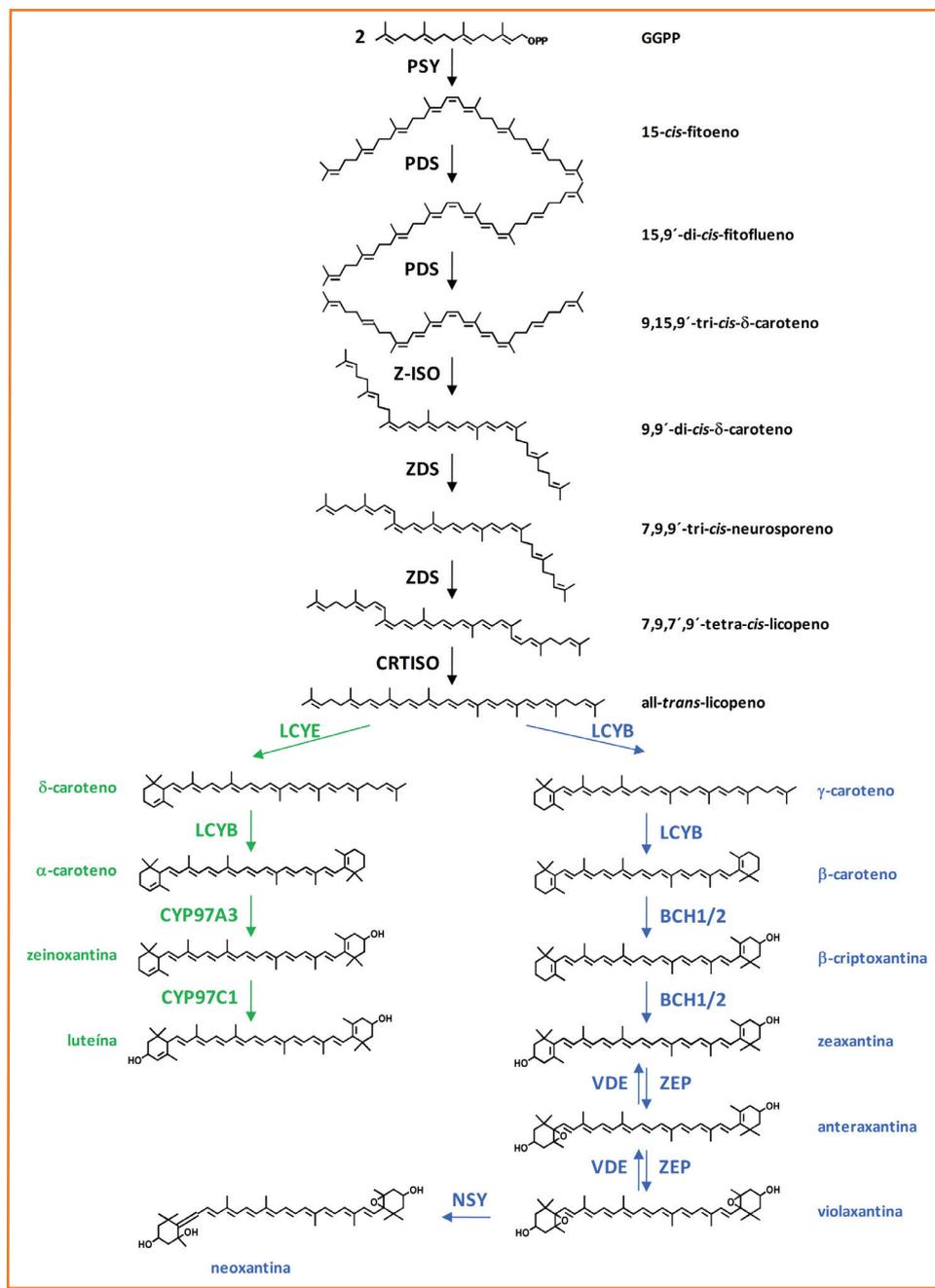
## BIOSÍNTESIS

Los carotenoides son isoprenoides plastídicos derivados del geranylgeranyl difosfato (GGPP). En los plastos vegetales, el GGPP se produce fundamentalmente en la ruta del metileritritol 4-fosfato o vía del MEP (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En este capítulo nos centramos en detallar las etapas biosintéticas de la ruta general de carotenoides en sí, es decir, a partir del GGPP. Algunas variantes y ramificaciones de esta vía troncal se tratarán en otros capítulos de este volumen.

### Del GGPP al fitoeno: fitoeno sintasa.

El primer paso en la biosíntesis de carotenoides es la producción de la molécula de 40C fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (figura 1). PSY es la enzima probablemente más estudiada de toda la ruta. Cataliza una reacción de dos pasos: la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de GGPP para formar el intermediario de reacción pre-fitoeno difosfato, seguida de la eliminación del grupo fosfato mediante un reordenamiento complejo vía la neutralización de un carbocatión para formar el fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- $\Psi,\Psi$ -caroteno) (Dogbo *et al.*, 1988). Las enzimas PSY de plantas utilizan normalmente *trans*-GGPP como sustrato para generar 15-*cis*-fitoeno.

En numerosas especies la actividad PSY está codificada por pequeñas familias génicas, como es el caso del tomate, el maíz, el arroz y la zanahoria entre otras (Giorio, Stigliani y



D'Ambrosio, 2008; Fantini *et al.*, 2013; Welsch *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008a, Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013). Por el contrario, la planta modelo *Arabidopsis thaliana* sólo presenta un único gen codificante para PSY (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). En los casos donde existen varias isoformas, se ha observado una especialización funcional entre ellas. Algunas están involucradas en la producción de carotenoides en tejido fotosintético rico en cloroplastos mientras que otras participan en la síntesis de estos compuestos en tejidos no fotosintéticos del fruto (PSY1 de tomate), el endospermo de la semilla (PSY1 de maíz) o la raíz (PSY3 de tomate, maíz y arroz). Además de esta expresión diferencial, fenómenos de *splicing* alternativo, así como variaciones alélicas sobre algunas isoformas de PSY en trigo, cebada, maíz y yuca constituyen mecanismos responsables de la síntesis de carotenoides, característica acentuada de algunas variedades de estas especies (Howitt *et al.*, 2009; Rodríguez-Suárez, Atiienza y Pistón, 2011; Shumskaya *et al.*, 2012;

**FIGURA 1.** Biosíntesis de carotenoides en *Arabidopsis*. Los nombres de enzimas e intermediarios de la rama β,ε están señalados en verde y los de la rama β,β en azul. GGPP, geranylgeranyl difosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, 15-*cis*-δ-caroteno isomerasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; BCH1/2, β-caroteno hidroxilasa 1/2; VDE, violaxantina de-epoxidasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa.

Welsch *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, el único gen que codifica para PSY presenta una expresión ubicua incluyendo tejido fotosintético y no fotosintético (Welsch *et al.*, 2003; Ruiz-Sola *et al.*, 2014) y se coexpresa con la mayoría de los genes de la ruta carotenogénica y de la vía del MEP y el metabolismo fotosintético (Meier *et al.*, 2011).

La actividad PSY se encuentra asociada con membranas en todos los tipos de plastos, como por ejemplo en amiloplastos de maíz (Li *et al.*, 2008b). En un estudio detallado sobre *Sinapis alba*, se estimaron los niveles de proteína y actividad PSY en distintas fracciones plastídicas (membrana externa, estroma y pellet membranoso que incluía los tilacoides) de plántulas en desetiología, donde la producción de carotenoides está activada (Welsch *et al.*, 2000). En este estudio se detectó la proteína PSY en estroma y pellet membranoso mientras que la actividad PSY sólo se detectó en esta última fracción, siendo mucho más alta en cloroplastos que en etioplastos, lo que confirma que la asociación con membranas es esencial para la actividad de esta enzima (Welsch *et al.*, 2000). Shumskaya *et al.* (2012) han demostrado recientemente que las proteínas de *Arabidopsis*, arroz y maíz (excepto la isoforma PSY1 de maíz) se localizan en plastoglóbulos, estructuras lipoproteicas que se asocian con los tilacoides y que participan en la biosíntesis y el almacenaje de isoprenoides, entre ellos los carotenoides y otros lípidos (Bréhélin, Kessler y Van Wijk, 2007; Austin *et al.*, 2006). En otros trabajos se ha demostrado que PSY se encuentra integrada en un complejo multiproteico de unos 200 kDa que alberga otras enzimas para la síntesis de GGPP en el cromoplasto de pimiento y tomate (Camara, 1993; Fraser, Schuch y Bramley, 2000). La función de este complejo asociado con membrana podría ser la de canalizar los precursores isoprenoides producidos por la vía del MEP en el estroma hacia la biosíntesis de carotenoides en las membranas plastídicas.

## Del fitoeno al licopeno: desaturasas e isomerasas

En los siguientes pasos de la ruta biosintética el isómero 15-*cis*-fitoeno se transforma en *trans*-licopeno mediante una serie de cuatro desaturaciones y dos isomerizaciones. Estas reacciones van aumentando el número de dobles enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada que se traduce en un cambio de la absorción de luz hacia longitudes de onda mayores y, por lo tanto, en la aparición del color rojo característico del licopeno. Para la desaturación del fitoeno se han descrito dos tipos de enzimas desaturasas totalmente diferentes. En bacterias (excepto cianobacterias) y hongos, una sola enzima CrtI cataliza el proceso completo de desaturación (Sandmann, 2009). Sin embargo, en plantas y cianobacterias, las cuatro desaturaciones se realizan en dos pasos catalizados por dos enzimas filogenéticamente relacionadas: la fitoeno desaturasa (PDS) que reduce el fitoeno a  $\zeta$ -caroteno pasando por el intermediario fitoflueno y la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) que produce *cis*-licopeno vía neurosporeno (figura 1). Cada una de estas desaturasas están codificadas por un único gen en *Arabidopsis* y en la mayoría de plantas (Dong *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2010); al igual que PSY, son activas en asociación con membranas. En *Arabidopsis* se han identificado en la membrana externa del cloroplasto, si bien PDS se ha detectado también en fracciones tilacoides y ZDS en el estroma (Joyard *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2000; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Formas inactivas de PDS también se han encontrado asociadas con chaperonas moleculares en fracciones solubles de diferentes tipos de plastos (Al-Babili *et al.*, 1996; Bonk *et al.*, 1997), lo que sugiere que la formación de estos complejos es necesaria para anclarla a las membranas plastídicas y por lo tanto para su actividad. La PDS se ha encontrado asociada con un gran

complejo molecular de unos 350 KDa, lo que es consistente con la existencia de un hipotético complejo multienzimático asociado con membrana que contiene las enzimas PDS, ZDS y otras necesarias para la formación de carotenoides cíclicos a partir de fitoeno (López *et al.*, 2008).

Además de la asociación con membranas, estas desaturasas necesitan diferentes cofactores para ejercer su actividad en el plasto. Entre ellos, las plastoquinonas se han descrito como las moléculas responsables de aceptar los electrones generados durante las reacciones de oxidación catalizadas por las enzimas PDS y ZDS (Norris, Barrette y DellaPenna, 1995). La reoxidación de estas quinonas está controlada por la enzima oxidasa plastídica terminal PTOX, que utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones con la consecuente formación de agua (Carol y Kuntz, 2001). La falta de función PTOX en el mutante de tomate ghost genera defectos en la acumulación de carotenoides en hojas (cloroplastos) y frutos (cromoplastos), lo que indica la importancia de PTOX en la desaturación del fitoeno en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. Sin embargo, estudios más recientes demuestran que la actividad PTOX no es indispensable en tejido verde y por lo tanto deben existir otros mecanismos independientes de PTOX responsables de la reoxidación del plastoquinol (Shahbazi *et al.*, 2007). Entre ellos, el complejo NADH deshidrogenasa también puede catalizar esta oxidación (Endo *et al.*, 2008; Nashlevitz *et al.*, 2010).

Si bien la enzima bacteriana CrtI es capaz de catalizar la conversión de 15-*cis*-fitoeno en *trans*-licopeno, en las plantas son necesarias dos actividades isomerasas extra para conseguir el mismo resultado. Como se observa en la figura 1, la actividad PDS produce el isómero 9,15,9'-*tri-cis*- $\zeta$ -caroteno pero el sustrato de la ZDS presenta una configuración del doble enlace 15-*trans*. La enzima responsable de esta

conversión se denomina 15-*cis*- $\delta$ -caroteno isomerasa (Z-ISO), una proteína de membrana cuya actividad se requiere incluso en presencia de luz (Chen, Li y Wurtzel, 2010). Por otro lado, la enzima responsable de la isomerización del producto de ZDS (7,9,7',9'-*tetra-cis*- $\zeta$ -licopeno o pro-licopeno) al *trans*-licopeno se denomina carotenoide isomerasa (CRTISO) (Isacson *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002). Esta actividad también necesita la presencia de membranas y, de hecho, se ha identificado en la membrana externa del cloroplasto en *Arabidopsis* (Joyard *et al.*, 2009). También requiere un cofactor de flavina adenina (FAD) aunque la reacción no parece implicar cambios redox (Yu *et al.*, 2011).

## Del licopeno a los carotenoides cíclicos: ciclasas

El primer punto de ramificación de la ruta de biosíntesis de carotenoides consiste en la ciclación de uno o ambos extremos de la cadena de C40 del todo-*trans*-licopeno. Una rama da lugar a carotenoides con dos anillos  $\beta$  ( $\beta$ -caroteno y sus xantofilas derivadas zeaxantina, violaxantina y neoxantina) mientras que en la otra se producen carotenoides con un anillo  $\beta$  y otro  $\epsilon$  ( $\alpha$ -caroteno y la xantofila luteína) (figura 42). La producción de carotenoides con dos anillos  $\epsilon$  no es común en plantas con la excepción de la lactucaxantina, una  $\epsilon,\epsilon$ -xantofila que se acumula en la lechuga (Phillip y Young, 1995). Los anillos  $\beta$  y  $\epsilon$  se diferencian únicamente en la posición del doble enlace. En el anillo  $\beta$  el doble enlace está conjugado con la cadena de polieno lo que resulta en una estructura rígida y una sola conformación posible. En el anillo  $\epsilon$  por el contrario, el doble enlace no está conjugado y permite cierta rotación del anillo (figura 2). Mientras que los anillos  $\beta$  se encuentran en todos los organismos capaces de sintetizar carotenoides, la distribución de los anillos  $\epsilon$  está mucho más restringida

a plantas, algas y cianobacterias, lo que sugiere que su formación ha evolucionado de forma independiente en estos organismos (Kim y DellaPenna, 2006).

Las plantas presentan dos enzimas licopeno ciclasa diferentes que catalizan la producción de los anillos terminales  $\beta$  y  $\epsilon$ , la  $\beta$  ciclasa (LCYB/CRTL-B) (Pecker *et al.*, 1996) y la  $\epsilon$ -ciclasa (LCYE/CRTL-E) (Cunningham y Gantt, 2001) respectivamente. Al igual que CRTISO, estas enzimas necesitan un cofactor de flavina adenina (FAD) aunque la reacción no parece requerir cambios redox (Mialoundama *et al.*, 2010; Chen, Li y Wurtzel, 2010). En la mayoría de las plantas, la actividad LCYE viene codificada normalmente por un solo gen mientras que LCYB se codifica por un solo gen en algunas plantas, incluidas *Arabidopsis*, arroz y maíz o por pequeñas familias génicas en otras (Cunningham *et al.*, 1996). Por ejemplo, en tomate se distinguen dos isoformas LCYB, mientras que la isoforma LCYB1 es activa en tejido verde, LCYB2 sólo funciona en tejido rico en cromoplastos como el fruto (Ronen *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis*, la actividad LCYB cataliza una reacción en dos pasos que introduce un anillo  $\beta$  en cada extremo de la molécula de licopeno ( $\Psi$ , $\Psi$ -caroteno) para producir  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ , $\beta$ -caroteno) vía  $\gamma$ -caroteno ( $\Psi$ , $\beta$ -caroteno). En la otra rama de la ruta, LCYE añade sólo un anillo  $\epsilon$  en un extremo de la molécula de licopeno formando  $\delta$ -caroteno ( $\Psi$ , $\epsilon$ -caroteno) y a continuación  $\delta$ -caroteno se transforma en  $\alpha$ -caroteno ( $\beta$ , $\epsilon$ -caroteno) mediante la actividad LCYB (figura 3). A diferencia de la proteína de *Arabidopsis*, la actividad LCYE de lechuga es capaz de crear dos anillos  $\epsilon$  dando lugar al  $\epsilon$ -caroteno ( $\epsilon$ , $\epsilon$ -caroteno), el precursor de la lactucaxantina (figura 4). De la misma manera, cuando no hay actividad LCYB, la enzima de maíz LCYE es capaz de catalizar la síntesis de  $\epsilon$ -caroteno a partir de licopeno (Bai *et al.*, 2009). En las plantas parece

que la proporción de  $\beta$ , $\beta$ -carotenoides y  $\beta$ , $\epsilon$ -carotenoides depende de la cantidad relativa y la actividad de las enzimas LCYB y LCYE (Ronen *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2009). Se ha postulado la existencia de complejos con LCYB sola o con ambas actividades LCYB y LCYE para justificar la ausencia de  $\epsilon$ , $\epsilon$ -carotenoides en la mayoría de las plantas (Cunningham y Gantt, 1998; Bai *et al.*, 2009). Aunque aún no hay evidencias experimentales de la existencia de estos complejos, en *Arabidopsis*, la proteína LCYB se ha encontrado en la membrana externa del cloroplasto donde también se localizan las enzimas anteriores y posteriores en la ruta (Joyard *et al.*, 2009).

### De los carotenos a las xantofilas: hidroxilasas, epoxidadas y más

Los carotenos cíclicos pueden modificarse posteriormente mediante reacciones de hidroxilación para generar las xantofilas, el nombre genérico que reciben los derivados oxigenados de los carotenos. La hidroxilación en las posiciones C-3 y C-3' de cada anillo de las moléculas de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno da origen a las xantofilas luteína y zeaxantina respectivamente. Consecutivas epoxidaciones en las posiciones C-5,6 y C-5'6' de los anillos 3-hidroxi  $\beta$  de la zeaxantina producen la violaxantina vía el intermediario monoepoxidado anteraxantina. La violaxantina puede ser de-epoxidada para volver a la zeaxantina, lo que se conoce como el ciclo de las xantofilas, o por el contrario sufrir una abertura de uno de los epóxidos cíclicos y formar neoxantina (figura 3).

Las enzimas encargadas de los primeros pasos oxidativos reciben el nombre de hidroxilasas. Se han encontrado dos tipos diferentes en plantas: las enzimas no-hemo di-hierro (BCH) que catalizan la hidroxilación de los anillos  $\beta$  y las enzimas

citocromo P450 (CYP97) que catalizan fundamentalmente la hidroxilación de ambos anillos  $\beta$  y  $\epsilon$ . La especificidad y grado de solapamiento funcional de estas enzimas se ha estudiado ampliamente en *Arabidopsis*. Al menos existen cuatro genes codificantes para estas actividades en esta planta modelo: BCH1/CHYB1/CHY1 (Sun, Gantt y Cunningham, 1996), BCH2/CHYB2/CHY2 (Tian y DellaPenna, 2001), CYP97A3/LUT5 (Kim y DellaPenna, 2006) y CYP97C1/CHYE/LUT1 (Tian *et al.*, 2004). Las enzimas BCH son más activas hacia la hidroxilación de los anillos  $\beta$  del  $\beta$ -caroteno (aunque también pueden actuar sobre el del  $\alpha$ -caroteno) y presentan una actividad muy reducida hacia los anillos  $\epsilon$ . Las CYP97, por el contrario, prefieren el  $\alpha$ -caroteno como sustrato. CYP97A3 es más activa hacia los anillos  $\beta$  que hacia los  $\epsilon$  del  $\alpha$ -caroteno mientras que CYP97C1 puede hidroxilar de manera eficiente ambos tipos de anillos (Kim *et al.*, 2009; 2010). Además de esta especialización funcional, las enzimas BCH están codificadas por pequeñas familias génicas en la mayoría de las especies vegetales. Las isoformas BCH muestran normalmente patrones de expresión específicos y en plantas ricas en xantofilas al menos un parólogo se expresa con preferencia en los tejidos cromoplastídicos donde estos compuestos se acumulan (Bouvier *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis*, todas las enzimas CYP97 involucradas en la hidroxilación de carotenoides se han identificado en las membranas externas del cloroplasto (Joyard *et al.*, 2009); sin embargo, no se conoce la localización de las proteínas BCH aunque la presencia de cuatro hélices transmembrana en su secuencia proteica sugiere que podrían encontrarse en las membranas externas o tilacoidales (Cunningham y Gantt, 1998). Recientemente se ha descrito la interacción entre las enzimas CYP97A y CYP97C en maíz, para convertir de forma sinérgica  $\alpha$ -caroteno en luteína (Quinlan *et al.*, 2012).

AL bajar en la ruta, en el ciclo de las xantofilas están involucradas las enzimas zeaxantina epoxidasa (ZEP) que controla una reacción en dos pasos para producir violaxantina y la violaxantina de-epoxidasa (VDE) que la convierte de vuelta en zeaxantina (figura 3) (Demmig-Adams, Gilmore y Adams, 1996; Cunningham y Gantt, 1998). Según se han descrito, en *Arabidopsis* estas dos actividades funcionan separadas por la membrana tilacoidal. En concordancia, la enzima ZEP se ha identificado en las membranas tilacoidales y externas del cloroplasto mientras que la enzima VDE sólo se ha encontrado en los tilacoides (Joyard *et al.*, 2009). Por último, la violaxantina se convierte en neoxantina mediante la acción de la neoxantina sintasa (NSY) (figura 3) (North *et al.*, 2007) que al igual que las anteriores se ha identificado en las membranas externas del cloroplasto (Joyard *et al.*, 2009). En un trabajo reciente se ha identificado otro gen que es absolutamente necesario para la síntesis de neoxantina en *Arabidopsis* y tomate, aunque su función específica no está aún determinada (Neuman *et al.*, 2014).

## Apocarotenoides y otros derivados formados por rotura oxidativa

Mediante rotura oxidativa de carotenoides pueden obtenerse apocarotenoides (que también son carotenoides, aunque con menos de 40 átomos de carbono, como ya se ha indicado en el capítulo 1) y otros derivados. Estos compuestos pueden actuar como hormonas, pigmentos, aromas y sabores, compuestos de defensa y moléculas señalizadoras. Su síntesis está principalmente controlada por una familia de enzimas oxidativas que cortan específicamente dobles enlaces y tienen en común el requerimiento de un cofactor de hierro no hemo (Kloer y Schulz, 2006). En las plantas estas enzimas actúan como dioxigenasas y por lo tanto reciben el nombre en inglés de *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCD).

Las hormonas ácido abscísico ABA y SL son quizá los derivados resultantes de la rotura oxidativa de carotenoides vegetales más estudiados. El ABA se produce a partir de las xantofilas violaxantina y neoxantina. Las enzimas encargadas de esta reacción se denominan *cis*-epoxicarotenoide dioxigenasas (NCED), las cuales son capaces de romper los isómeros *cis* de la violaxantina y la neoxantina. Hasta el momento, se desconocen las enzimas encargadas de la isomerización de estas xantofilas para generar los sustratos con configuración *cis* de las enzimas NCED. Los genomas vegetales contienen familias génicas codificantes para estas proteínas. En *Arabidopsis*, se ha descrito una familia de nueve miembros de los cuales cinco (NCED2, 3, 5, 6 y 9) parecen estar relacionados con la biosíntesis de ABA (Schwartz, Qin y Zeevaart, 2003; Iuchi *et al.*, 2001). Entre ellas, NCED3 juega un papel esencial en la biosíntesis de la hormona bajo condiciones de estrés abiótico (Jia, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005). La síntesis de las SL ocurre a partir del isómero 9-*cis*- $\beta$ -caroteno por la acción de las dioxigenasas CCD7 y CCD8 y otros pasos de isomerización, oxidación y reordenamiento todavía por determinar (Alder *et al.*, 2012; Ruyter-Spira *et al.*, 2013).

Recientemente, la investigación en *Arabidopsis* está permitiendo descubrir otras moléculas derivadas de la rotura oxidativa de los carotenoides con funciones de señalización muy importantes. Se ha demostrado que la falta de función del gen BYPASS1 genera una señal en la raíz que se transmite al tejido aéreo provocando graves defectos en el desarrollo de la raíz y la parte aérea (Van Norman, Frederick y Sieburth, 2004). Aunque la identidad de esta señal no se ha determinado, se ha demostrado que tiene origen carotenoide y que su producción requiere la síntesis de  $\beta$ -caroteno y sus derivados, pero no está relacionada con las hormonas ABA ni SL (Van Norman y Sieburth, 2007). El  $\beta$ -ciclocitral, un derivado también del

$\beta$ -caroteno, es capaz de inducir cambios en la expresión de genes nucleares bajo situaciones de estrés oxidativo (Ramel *et al.*, 2012). Otros derivados de carotenoides aún por identificar se han descrito como esenciales para la formación de raíces laterales en *Arabidopsis* (Van Norman *et al.*, 2014).

La síntesis de otros derivados de carotenoides, como el pigmento amarillo microrradicina y la blumenina, con propiedades antifúngicas que secretan las raíces de numerosas plantas, el aroma  $\beta$ -ionona que favorece la atracción de animales polinizadores y los apocarotenoides colorantes bixina y crocina de las especias annatto y azafrán también está controlada por enzimas de la familia CCD y ampliamente revisada en (Walter y Strack, 2011).

## REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES

En las plantas existen múltiples niveles de regulación de la síntesis de carotenoides, desde el control de la expresión de los genes que codifican enzimas biosintéticas hasta la regulación de la actividad de dichas enzimas, la capacidad de los plastos para almacenar carotenoides, o la presencia de procesos de degradación de estos metabolitos. En esta sección revisaremos brevemente algunos ejemplos ilustrativos de estos distintos niveles de regulación.

### Control de la expresión génica

La expresión de los genes codificantes para enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides responde en gran medida al estado de desarrollo de las plantas, que a su vez establece un estrecho vínculo con las condiciones

ambientales a las que se ven sometidas. Uno de los mejores ejemplos de este tipo de regulación y de la dificultad de separar los distintos factores que regulan la carotenogénesis es la maduración del fruto de tomate. Durante la maduración del fruto, la acumulación de carotenoides está determinada por un programa de desarrollo que controla la expresión de los genes responsables de la síntesis de estos compuestos, pero también de la diferenciación plastídica (y, por lo tanto, la actividad de las enzimas y la capacidad de almacenamiento). Además, este programa se puede alterar en función de estímulos ambientales como la luz y la temperatura (Alba, Cordonnier-Pratt y Pratt, 2000; Neta-Sharir *et al.*, 2005). En este apartado nos centraremos en revisar el control transcripcional de la carotenogénesis en tomate y en otros sistemas en respuesta a señales de desarrollo y estímulos ambientales.

### Señales de desarrollo

La maduración del fruto de tomate implica la degradación de las clorofilas en el fruto verde a la vez que una acumulación masiva de carotenoides (sobre todo licopeno) que lo tornan de color rojo. Este proceso está asociado con la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos (Giovannoni, 2001). El aumento desmesurado de carotenoides está precedido por una acumulación de transcritos codificantes para la isoforma de fruto PSY1 (Lois *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 1994). A esta inducción le sigue inmediatamente después un aumento de la expresión de los genes que codifican las enzimas desaturasas e isomerasas y una fuerte represión de la expresión de las ciclasas, lo que en conjunto resulta en una acumulación de licopeno en el fruto maduro (Ronen *et al.*, 1999). Los mecanismos que controlan esta compleja regulación génica son objeto de una activa investigación. Recientemente se ha descubierto que el factor de transcripción RIN (inhibidor de la maduración, del inglés *Ripening INhibitor*) de la familia de

factores de transcripción MADS-box es capaz de regular la carotenogénesis mediante la unión directa del promotor de PSY1 y otros genes de la ruta en el fruto. Además, RIN también controla la expresión de genes involucrados en otros procesos asociados con la maduración, como la producción de etileno y la degradación de clorofilas (Fujisawa *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2011). En otro trabajo se ha demostrado la interacción entre RIN y otro factor de la familia, MADS1, que también tiene un papel importante en la maduración del fruto como modulador represivo (Dong *et al.*, 2013). La regulación transcripcional de la carotenogénesis a lo largo de la maduración del fruto también se ha observado en otras especies como el pimiento y el naranjo (Hugueney *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2004; Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004).

En *Arabidopsis*, el conocimiento de la importancia de las señales de desarrollo en el control de la carotenogénesis es muy limitado. Sin embargo, a partir de información publicada en bases de datos de expresión génica se ha establecido una correlación entre los niveles de expresión de los genes biosintéticos con el perfil de carotenoides observados en diversos órganos y estadios de desarrollo de esta planta (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

### Señales ambientales

La biosíntesis de carotenoides está controlada por factores ambientales, entre los cuales la luz constituye uno de los más importantes. Tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos la luz es esencial en el ajuste del reloj circadiano de las plantas, un mecanismo que permite anticipar los cambios asociados con los periodos de luz y oscuridad (Millar, 2004). En *Arabidopsis*, muchos de los genes de la síntesis de carotenoides y de la vía del MEP muestran una oscilación diurna y una posible regulación circadiana, lo que sugiere que

la producción de carotenoides podría estar también controlada por el reloj (Covington *et al.*, 2008).

Uno de los mejores ejemplos de regulación transcripcional de la biosíntesis de carotenoides mediado por luz ocurre durante la desetiología, momento en el cual las plántulas germinadas bajo tierra y en la oscuridad perciben la luz y activan su desarrollo fotomorfogénico. Este proceso trae consigo un aumento masivo en la producción de carotenoides para proteger el emergente aparato fotosintético (Park *et al.*, 2002; Rodríguez-Villalón, Gas y Rodríguez Concepción, 2009; Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez Concepción, 2010). En *Arabidopsis*, los cambios cuantitativos (niveles totales) y cualitativos (abundancia relativa) en el patrón de carotenoides durante la desetiología están asociados con una inducción de la mayoría de los genes que codifican enzimas biosintéticas, incluidas las del MEP (Ghassemian *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2011). Además, estos cambios son dependientes de la diferenciación de los etioplastos en cloroplastos, proceso mediado también por un efecto de la luz en la expresión génica. Para facilitar la transición al metabolismo fotosintético y minimizar el deterioro del aparato fotosintético durante la desetiología, la producción de carotenoides también se coordina con la producción de clorofilas y de complejos ricos en carotenoides en un proceso controlado por la familia de fotorreceptores fitocromo y los factores de transcripción tipo *basic-helix-loop-helix* (bHLH) de la familia *Phytochrome-Interacting Factors* (PIF). Los PIF se acumulan en la oscuridad y frenan el desarrollo del cloroplasto y la síntesis de clorofilas y carotenoides reprimiendo la expresión de muchos genes mediante la unión directa con su promotor (Castillon, Shen y Huq, 2007; Leivar y Quail, 2011). PIF1 es el principal responsable de la regulación de la carotenogénesis durante la desetiología. Se ha demostrado que es capaz de unirse a una caja G (CACGTG) del promotor

de PSY para reprimir directamente su expresión (Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez-Concepción, 2010). La degradación mediada por luz de los PIF des-reprime el desarrollo del cloroplasto y la expresión de PSY, y promueve por lo tanto la producción y acumulación de carotenoides de forma coordinada con la de las clorofilas y en conjunto la transición al metabolismo fotosintético. Además de en *Arabidopsis*, se ha encontrado que la expresión de las isoformas de PSY específicas de tejido fotosintético en maíz y arroz están también reguladas por la luz (Li, Tsfadia y Wurtzel, 2009; Welsch *et al.*, 2008) pero los mecanismos moleculares que controlan esta regulación no se han elucidado todavía.

Aparte de la luz, algunos estreses abióticos, como la sequía o el estrés salino son factores ambientales capaces de regular la biosíntesis de carotenoides. Para hacer frente al estrés abiótico, las plantas han desarrollado varias respuestas adaptativas entre las cuales las mediadas por la hormona ABA son las mejor caracterizadas. En particular, los estreses hídrico y salino desencadenan una síntesis y acumulación acentuada de la hormona que se produce a partir de la rotura oxidativa de las  $\beta,\beta$ -xantofilas (Nambara y Marion-Poll, 2005). Mientras que los tejidos fotosintéticos son ricos en carotenoides, la producción de carotenoides en órganos no fotosintéticos como la raíz es mucho menor (Howitt y Pogson, 2006) y por tanto el aporte de  $\beta,\beta$ -xantofilas para la síntesis de la hormona puede convertirse en un punto limitante. En las plantas de maíz y arroz se ha observado que los estreses salino e hídrico provocan una inducción en los niveles de transcritos del gen que codifica la isoforma específica de raíz PSY3, lo que facilita el aporte de precursores para la síntesis acentuada de ABA en la raíz (Li, Vallabhaneni y Wurtze, 2008; Welsch *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, el único gen codificante para PSY se regula diferencialmente en tejidos aéreos y raíz en situaciones de

estrés salino. El estrés desencadena una inducción específica de la expresión de PSY en la raíz que, en conjunto con la inducción de genes codificantes para otras enzimas de la rama  $\beta,\beta$  como BCH2 y ZEP, permiten la canalización del flujo acentuado de precursores hacia la síntesis de las  $\beta,\beta$ -xantofilas después del estrés (Ruiz-Sola *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, al igual que en maíz y arroz, la inducción de la expresión de PSY está retrorregulada por la hormona en un mecanismo independiente de PIF (Ruiz-Sola *et al.*, 2014a).

### Otros niveles de regulación

Hay muchos casos en los que la expresión de los genes biosintéticos no es capaz de explicar la acumulación o el perfil de carotenoides. Esto pone en evidencia que la vía carotenogénica también está regulada por otros mecanismos. Entre ellos, en este apartado se revisará la modulación de niveles y actividades enzimáticas, la canalización de metabolitos a través de complejos multienzimáticos, la capacidad de secuestro y almacenamiento de carotenoides y la degradación de estos metabolitos.

### Modulación de niveles y actividades enzimáticas

La luz es capaz de modificar el flujo metabólico de la ruta carotenogénica al actuar sobre la actividad de ciertas enzimas biosintéticas. En primer lugar, parte de las actividades isomerasas Z-ISO y CRTISO pueden sustituirse por la luz en tejidos fotosintéticos (Park *et al.*, 2002; Isaacson *et al.*, 2002). La luz también modifica la actividad de las enzimas moduladas por sistemas redox fotosintéticos. Entre ellos podemos destacar varias enzimas de la ruta del MEP que parecen ser dianas del sistema ferredoxina-tiorredoxina (Balmer *et al.*, 2003) y las desaturasas PDS y ZDS que usan la plastoquinona como aceptor de H, lo que las vincula con la cadena fotosintética de

transporte de electrones (Carol y Kuntz, 2001). Además, las actividades ZEP y VDE también están controladas por la luz y el estado fotosintético de la planta. Cuando se someten a altas intensidades lumínicas, las plantas ajustan la composición de carotenoides de las hojas para activar la fotoprotección y transforman la violaxantina en zeaxantina que disipa el exceso energético de una manera más eficiente. Cuando la intensidad de luz vuelve a niveles normales, la zeaxantina se transforma de nuevo en violaxantina lo que se conoce como el ciclo de las xantofilas (Hieber *et al.*, 2000). Este proceso está gobernado principalmente por un mecanismo mediado por los cambios de pH que la distinta intensidad lumínica induce en los tilacoides. Con bajas intensidades lumínicas o en la oscuridad, donde el pH del estroma tilacoidal es neutro, la enzima VDE permanece soluble en el estroma e inactiva. Pero si la intensidad de la luz aumenta, la bomba fotosintética de protones aumenta la acidez del lumen y estimula la unión de VDE a las membranas tilacoidales donde se activa resultando en un aumento de la producción de zeaxantina (Hieber, Bugos y Yamamoto, 2000).

Existen otros mecanismos capaces de aumentar las actividades enzimáticas que no están regulados por la luz. Por ejemplo, uno de los aspectos que más influye en la actividad de las enzimas de la carotenogénesis es su asociación con membranas. En los cloroplastos de *Arabidopsis* la mayoría de las enzimas biosintéticas se localizan en la membrana externa del cloroplasto mientras que sólo unas pocas se han detectado asociadas a los tilacoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Joyard *et al.*, 2009).

### Canalización de metabolitos a través de complejos multienzimáticos

Se ha postulado ampliamente que las enzimas carotenogénicas podrían organizarse en complejos multienzimáticos asociados

a membranas (Cunningham y Gantt, 1998; Bai *et al.*, 2009), para constituir un mecanismo clave en la regulación de su actividad y de la biosíntesis de carotenoides. Aunque los estudios de proteómica informan acerca de la localización de enzimas individuales y no de complejos multienzimáticos (Joyard *et al.*, 2009), la identificación y caracterización bioquímica de alguno de estos complejos se ha demostrado experimentalmente (Camara, 1993; Fraser, Schuch y Bramley, 2000; López *et al.*, 2008; Quinlan *et al.*, 2012). Además de estos datos, otros estudios evidencian la canalización de metabolitos a lo largo de la ruta (Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; De la Guardia *et al.*, 1971). Por último, el análisis de algunos mutantes y los estudios de coexpresión génica sugieren la acción conjunta de algunas enzimas en ramas específicas de la ruta (Tian *et al.*, 2003, 2004; Kim y DellaPenna, 2006; Kim *et al.*, 2009; Meier *et al.*, 2011).

Al integrar todos estos datos se ha propuesto recientemente un modelo que postula la formación de varios complejos multienzimáticos en *Arabidopsis* (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Este modelo propone la existencia de complejos proteicos asociados a la membrana externa del cloroplasto que transforman los precursores universales de isoprenoides en fitoeno, el fitoeno en licopeno (formado por las enzimas PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO), el fitoeno en  $\beta$ -caroteno (PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO y LCYB) y el licopeno en luteína (LCYE, LCYB y CYP97A y CYP97C). Además, enzimas individuales ancladas a la membrana externa o tilacoidal transformarían el  $\beta$ -caroteno en las  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas. Este modelo de canalización de metabolitos explicaría por qué se detectan tan pocos intermediarios de la ruta. Sin embargo, no puede explicar por qué la acumulación de carotenoides en las membranas tilacoidales (donde actúan en contra del daño fotooxidativo) es mucho mayor que en la membrana

externa (donde se han identificado la mayoría de enzimas que los producen). Por otro lado, teniendo en cuenta que la composición de los carotenoides varía en función del tipo de plasto, los cuales muestran una composición proteica y estructuras subplastídicas bastante diferentes, se esperaría que la naturaleza y localización de los complejos multiproteicos hipotéticos variara según el tipo de plasto. De acuerdo con esta premisa, las enzimas ZDS, LCYB, BCH1 y BCH2 se encontraron formando parte del proteoma del plastoglobulo en cromoplastos de pimiento pero no en cloroplastos de *Arabidopsis* (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg, Peltier y Van Wijk, 2006).

### Capacidad de secuestro y almacenaje

El tipo de plasto también tiene una influencia crucial en la acumulación de carotenoides. Existen numerosos ejemplos en la literatura donde la naturaleza, fisiología y número de plastos determinan la acumulación de estos compuestos. En *Arabidopsis*, por ejemplo, la desetiación implica la diferenciación de los etioplastos en cloroplastos, lo que tiene un gran impacto no sólo en el aumento de la actividad PSY y de otras enzimas de la ruta sino en la capacidad de almacenamiento de los plastos (Von Lintig *et al.*, 1997; Welsch *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2006). Por lo tanto, la mayor capacidad de acumulación de carotenoides que ofrecen los cloroplastos frente a los etioplastos justifica en parte la elevada acumulación de estos compuestos durante la desetiación. De hecho, un desarrollo alterado de los cloroplastos provoca una disminución de carotenoides incluso en condiciones donde la biosíntesis de sus precursores está activada (Sauret-Güeto *et al.*, 2006; Flores-Pérez *et al.*, 2008). La diferenciación de cloroplastos o cromoplastos en raíz de zanahoria en función de las condiciones de luz tiene también una enorme influencia en el perfil cuantitativo y cualitativo de carotenoides que se

acumulan, demostrándose la importancia del tipo de plasto en la acumulación final de estos compuestos (Fuentes *et al.*, 2012).

La diferenciación de los cloroplastos en cromoplastos implica el desarrollo de plastoglobulos o estructuras de secuestro de formas diferentes, lo que en conjunto permite la deposición de cantidades enormes de carotenoides dentro de una matriz de lipoproteínas. Este proceso es el que ocurre, por ejemplo, durante la maduración del fruto de tomate (Deruère *et al.*, 1994; Simkin *et al.*, 2007). La coliflor naranja (*Brassica oleracea* variedad *votrytis*) acumula muchos más carotenoides ( $\beta$ -caroteno principalmente) que las variedades incoloras sin presentar grandes cambios en la expresión de los genes biosintéticos (Li *et al.*, 2001). En esta variedad coloreada, los plastos presentan una estructura similar a la de los cromoplastos. Se ha descubierto que una mutación en el gen *Or* (que codifica una proteína plastídica tipo DnaJ) es responsable de la diferenciación de los cromoplastos (Paolillo, Garvin y Parthasarathy, 2004; Lu *et al.*, 2006). Con este ejemplo se ilustra cómo se puede estimular la biosíntesis de carotenoides activando el desarrollo de estructuras plastídicas de depósito para su almacenamiento. De manera similar, los frutos de los tomates mutantes *hp* (*high pigment*) acumulan también mayores cantidades de carotenoides totales sin presentar ningún cambio en la transcripción de los genes de la ruta biosintética. Estos tomates muestran un mayor número de plastos por célula, lo que parece justificar de nuevo los mayores niveles de carotenoides (Galpaz *et al.*, 2008; Kolotilin *et al.*, 2007).

De forma inversa, alteraciones en la producción de carotenoides pueden modular el desarrollo de los plastos. Así, algunos mutantes de *Arabidopsis* en los que la síntesis

de carotenoides está bloqueada presentan defectos en el desarrollo de los cloroplastos (Dong *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que un aumento del flujo de la vía de síntesis de carotenoides mediante la sobreexpresión de PSY es suficiente para activar la diferenciación de cromoplastos a partir de leucoplastos de raíz y callos en *Arabidopsis* (Maass *et al.*, 2009) y de cloroplastos en fruto de tomate (Fraser *et al.*, 2007).

### Degradación de carotenoides

El balance entre biosíntesis y degradación determina en muchos casos los niveles finales de carotenoides. En los tejidos fotosintéticos, los carotenoides pueden degradarse mediante procesos fotoquímicos no enzimáticos. Sin embargo, también existen enzimas capaces de catalizar reacciones de rotura oxidativa de carotenoides. Entre ellas, en las plantas, la familia de enzimas dioxigenasas CCD se encargan de la degradación específica de carotenoides en numerosos tejidos (Walter y Strack, 2011). La contribución de las CCD a la homeostasis de carotenoides es un tema en continua evaluación. Existen casos donde los niveles de transcritos codificantes para estas enzimas son inversamente proporcionales al contenido de carotenoides. Se ha observado por ejemplo una correlación entre el nivel de expresión del gen codificante para la isoforma CCD1 y la degradación de carotenoides (luteína) durante la maduración del fruto de fresa (García-Limones *et al.*, 2008) y la acumulación de carotenoides también parece estar controlada por estas enzimas en las flores de crisantemo y orquídea (Ohmiya *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2010), el endospermo de maíz (Vallabhaneni, Bradbury y Wurtzel, 2010) y el tubérculo de patata (Campbell *et al.*, 2010). Sin embargo el patrón de expresión de genes codificantes para isoformas de CCD no parece coincidir con el contenido de carotenoides en las flores de Ipomea (Yamamizo, Kishimoto y Ohmiya, 2010), los frutos

cítricos (Kato *et al.*, 2006) y el endospermo de arroz (Ilg *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis* los mecanismos que controlan la degradación de carotenoides son muy poco conocidos (Beisel *et al.*, 2010). Se ha demostrado que en las semillas, el contenido de carotenoides podría estar regulado por degradación mediada por la actividad CCD1 (Auldrige *et al.*, 2006). Sin embargo, esta actividad no parece tener un papel importante en la acumulación de carotenoides en las hojas, a pesar de que se detectan transcritos CCD1 en este órgano (Auldrige *et al.*, 2006).

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio está financiado por ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (BIO2011-23680), la Generalitat de Catalunya (2009SGR-26 y XRB), el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted, Red IBERCAROT, ref. 112RT0445), y la Unión Europea FP7 (TiMet, contrato 245143).

## REFERENCIAS

- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H. 2000. *Plant Physiol.* 123: 363-370.
- Al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Beyer, P. 1996. *Plant J.* 9: 601-612.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., Al-Babili, S. 2012. *Science* 335: 1348-1351.
- Auldridge, M.E., Block, A., Vogel, J.T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2006. *Plant J.* 45: 982-993.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F., Staehelin, L.A. 2006. *Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Bai, L., Kim, E.H., DellaPenna, D., Brutnell, T.P. 2009. *Plant J.* 59: 588-599.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P., Buchanan, B.B. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 370-375.
- Beisel, K.G., Jahnke, S., Hofmann, D., Köppchen, S., Schurr, U., Matsubara, S. 2010. *Plant Physiol.* 152: 2188-2199.
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., Beyer, P. 1997. *Eur. J. Biochem.* 247: 942-950.
- Bouvier, F., Keller, Y., D'Harlingue, A., Camara, B. 1998. *Biochim. Biophys. Acta* 1391: 320-328.
- Bréhélin, C., Kessler, F., van Wijk, K.J. 2007. *Trends Plant Sci.* 12: 260-6.
- Britton, G. 1993. En C. Sundqvist y M. Ryberg (eds.). *Pigment Protein Complexes in Plastids: Synthesis Assembly*. San Diego: Academic Press, pp. 447-483.
- Camara, B. 1993. *PMETHODS ENZYMOLOGY* 214: 352-365.
- Campbell, R., Ducreux, L.J.M., Morris, W.L., Morris, J.A., Suttle, J.C., Ramsay, G., Bryan, G.J., Hedley, P.E., Taylor, M.A. 2010. *Plant Physiol.* 154: 656-664.
- Candau, R., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4936-4940.
- Carol, P. Kuntz, M. 2001. *Trends Plant Sci.* 6: 31-36.
- Castillon, A., Shen, H., Huq, E. 2007. *Trends Plant Sci.* 12: 514-521.
- Chaudhary, N., Nijhawan, A., Khurana, J.P., Khurana, P. 2010. *Mol. Genet. Genomics* 283: 13-33.
- Chen, Y., Li, F., Wurtzel, E.T. 2010. *Plant Physiol.* 153: 66-79.
- Chiou, C.Y., Pan, H.A., Chuang, Y.Y., Yeh, K.W. 2010. *Planta* 232: 937-948.

## REFERENCIAS

- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A., Harmer, S.L. 2008. *Genome Biol.* 9: R130.
- Cunningham, F.X. Gantt, E. 1998. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Cunningham, F.X. Gantt, E. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2905-2910.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., Gantt, E. 1996. *Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W. 1996. *FASEB J.* 10: 403-412.
- Deruère, J., Römer, S., D'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M., Camara, B. 1994. *Plant Cell* 6: 119-133.
- Dogbo, O., Laferrière, A., D'Harlingue, A., Camara, B. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7054-7058.
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., Zuo, J. 2007. *Cell Res.* 17: 458-470.
- Dong, T., Hu, Z., Deng, L., Wang, Y., Zhu, M., Zhang, J., Chen, G. 2013. *Plant Physiol.* 163: 1026-1036.
- Du, H., Wang, N., Cui, F., Li, X., Xiao, J., Xiong, L. 2010. *Plant Physiol.* 154: 1304-1318.
- Endo, T., Ishida, S., Ishikawa, N., Sato, F. 2008. *Mol. Cells* 25: 158-162.
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., Giuliano, G. 2013. *Plant Physiol.* 163: 986-998.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., Rodríguez-Concepción, M. 2008. *Plant Cell* 20: 1303-1315.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M.A., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P.M. 2007. *Plant Cell* 19: 3194-3211.
- Fraser, P.D., Schuch, W., Bramley, P.M. 2000. *Planta* 211: 361-369.
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M. 1994. *Plant Physiol.* 105: 405-413.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2012. *Plant Mol. Biol.* 79: 47-59.
- Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y., Ito, Y. 2013. *Plant Cell* 25: 371-386.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D., Hirschberg, J. 2008. *Plant J.* 53: 717-730.
- García-Limones, C., Schnäbele, K., Blanco-Portales, R., Luz Bellido, M., Caballero, J.L., Schwab, W., Muñoz-Blanco, J. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9277-9285.

## REFERENCIAS

- Ghassemian, M., Lutes, J., Tepperman, J.M., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Quail, P.H., Lange, B.M. 2006. *Arch. Biochem. Biophys.* 448: 45-59.
- Giorio, G., Stigliani, A.L., D'Ambrosio, C. 2008. *FEBS J.* 275: 527-535.
- Giovannoni, J. 2001. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725-749.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C., Yamamoto, H.Y. 2000. *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 84-91.
- Howitt, C.A., Cavanagh, C.R., Bowerman, A.F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J.L., Pogson, B.J. 2009. *Funct. Integr. Genomics* 9: 363-376.
- Howitt, C.A. Pogson, B.J. 2006. *Plant, Cell Environ.* 29: 435-445.
- Huguene, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., D'Harlingue, A., Camara, B. 1996. *Plant Physiol.* 111: 619-626.
- Ilg, A., Yu, Q., Schaub, P., Beyer, P., Al-Babili, S. 2010. *Planta* 232: 691-699.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., Hirschberg, J. 2002. *Plant Cell* 14: 333-342.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2001. *Plant J.* 27: 325-333.
- Jia, W. 2002. *J. Exp. Bot.* 53: 2201-2206.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., Rolland, N. 2009. *Mol. Plant* 2: 1154-1180.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M. 2004. *Plant Physiol.* 134: 824-837.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., Yano, M. 2006. *J. Exp. Bot.* 57: 2153-2164.
- Kim, J. DellaPenna, D. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3474-3479.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., Dellapenna, D. 2009. *Plant Cell Physiol.* 50: 463-479.
- Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., Douglas, C.J. 2010. *Phytochemistry* 71: 168-178.
- Kloer, D.P. Schulz, G.E. 2006. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2291-2303.
- Kolotilin, I., Koltai, H., Tadmor, Y., Bar-Or, C., Reuveni, M., Meir, A., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Levin, I. 2007. *Plant Physiol.* 145: 389-401.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2012-2015.
- Leivar, P. Quail, P.H. 2011. *Trends Plant Sci.* 16: 19-28.

## REFERENCIAS

- Li, F., Tsfadia, O., Wurtzel, E.T. 2009. *Plant Signal. Behav.* 4: 208-211.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Wurtzel, E.T. 2008a. *Plant Physiol.* 146: 1333-1345.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., Wurtzel, E.T. 2008b. *Plant Physiol.* 147: 1334-1346.
- Li, L., Paolillo, D.J., Parthasarathy, M. V, Dimuzio, E.M., Garvin, D.F. 2001. *Plant J.* 26: 59-67.
- Von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., Kleinig, H. 1997. *Plant J.* 12: 625-634.
- Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. 2000. *Plant J.* 22: 503-513.
- López, A.B., Yang, Y., Thannhauser, T.W., Li, L. 2008. *Physiol. Plant.* 133: 190-198.
- Lu, S., Van Eck, J., López, A.B., O'Halloran, D.M., Cosman, K.M., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Vrebalov, J., Kochian, L.V., Küpper, H., Earle, E.D., Cao, J., Li, L. 2006. *Plant Cell* 18: 3594-3605.
- Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., Welsch, R. 2009. *PLoS One* 4: e6373.
- Mann, V., Harker, M., Pecker, I., Hirschberg, J. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18: 888-892.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J.J. 2011. *Plant Physiol.* 157: 1568-1579.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C., Wurtzel, E.T. 2011. *BMC Syst. Biol.* 5: 77.
- Mialoundama, A.S., Heintz, D., Jadid, N., Nkeng, P., Rahier, A., Deli, J., Camara, B., Bouvier, F. 2010. *Plant Physiol.* 153: 970-979.
- Millar, A.J. 2004. *J. Exp. Bot.* 55: 277-283.
- Moran, N.A. Jarvik, T. 2010. *Science* 328: 624-627.
- Nambara, E. Marion-Poll, A. 2005. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.
- Nashilevitz, S., Melamed-Bessudo, C., Izkovich, Y., Rogachev, I., Osorio, S., Itkin, M., Adato, A., Pankratov, I., Hirschberg, J., Fernie, A.R., Wolf, S., Usadel, B., Levy, A.A., Rumeau, D., Aharoni, A. 2010. *Plant Cell* 22: 1977-1997.
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., Weiss, D. 2005. *Plant Cell* 17: 1829-1838.
- Neuman, H., Galpaz, N., Cunningham, F.X., Zamir, D., Hirschberg, J. 2014. *Plant J.* 78: 80-93.
- Van Norman, J.M., Frederick, R.L., Sieburth, L.E. 2004. *Curr. Biol.* 14: 1739-1746.
- Van Norman, J.M. Sieburth, L.E. 2007. *Plant J.* 49: 619-628.

## REFERENCIAS

- Van Norman, J.M., Zhang, J., Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J., Harrison, P.J., Bugg, T.D.H., Chan, K.X., Thompson, A.J., Benfey, P.N. 2014. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E1300-1309.
- Norris, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D. 1995. *Plant Cell* 7: 2139-2149.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., Marion-Poll, A. 2007. *Plant J.* 50: 810-824.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., Sumitomo, K. 2006. *Plant Physiol.* 142: 1193-1201.
- Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Parthasarathy, M. V 2004. *Protoplasma* 224: 245-253.
- Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D., Pogson, B.J. 2002. *Plant Cell* 14: 321-332.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F.X., Hirschberg, J. 1996. *Plant Mol. Biol.* 30: 807-819.
- Phillip, D. Young, A.J. 1995. *Photosynth. Res.* 43: 273-282.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., Qu, L.J. 2007. *Cell Res.* 17: 471-482.
- Quinlan, R.F., Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Beltrán, J., Ma, C., Kennelly, E.J., Wurtzel, E.T. 2012. *Plant Physiol.* 160: 204-214.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., Havaux, M. 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5535-5540.
- Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Zacarías, L. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6724-6731.
- Rodriguez-Concepcion, M. Stange, C. 2013. *Arch. Biochem. Biophys.* 539: 110-116.
- Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S.G., Pistón, F. 2011. *PLoS One* 6: e19885.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., Rodríguez-Concepción, M. 2009. *Plant J.* 60: 424-435.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11102. 11107.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. *Plant J.* 17: 341-351.
- Ruiz-Sola, M.Á. Rodríguez-Concepción, M. 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158.
- Ruiz-Sola, M.Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Rodríguez-Concepción, M., Rodríguez-Villalón, A. 2014. *PLoS One* 9: e90765.
- Ruiz-Sola, M.A., Rodríguez-Villalón, A., Rodríguez-Concepción, M. 2014a. *Plant Signal. Behav.* 9.
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S., Bouwmeester, H. 2013. *Trends Plant Sci.* 18: 72-83.

## REFERENCIAS

- Sandmann, G. 2009. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 169-174.
- Sauret-Güeto, S., Botella-Pavía, P., Flores-Pérez, U., Martínez-García, J.F., San Román, C., León, P., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M. 2006. *Plant Physiol.* 141: 75-84.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaart, J.A.D. 2003. *Plant Physiol.* 131: 1591-1601.
- Shahbazi, M., Gilbert, M., Labouré, A.M., Kuntz, M. 2007. *Plant Physiol.* 145: 691-702.
- Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Monaco, R.R., Wurtzel, E.T. 2012. *Plant Cell* 24: 3725-41.
- Simkin, A.J., Gaffé, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Kuntz, M. 2007. *Phytochemistry* 68: 1545-1556.
- Sun, Z., Gantt, E., Cunningham, F.X. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 24349-24352.
- Tian, L. DellaPenna, D. 2001. *Plant Mol. Biol.* 47: 379-388.
- Tian, L., Magallanes-Lundback, M., Musetti, V., DellaPenna, D. 2003. *Plant Cell* 15: 1320-1332.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 402-407.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Rodríguez-Concepción, M. 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 11626-11631.
- Vallabhaneni, R., Bradbury, L.M.T., Wurtzel, E.T. 2010. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 104-111.
- Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dörmann, P., Kessler, F., Bréhélin, C. 2006. *J. Biol. Chem.* 281: 11225-11234.
- Walter, M.H. Strack, D. 2011. *Nat. Prod. Rep.* 28: 663-692.
- Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J., Beyer, P. 2010. *Plant Cell* 22: 3348-3356.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H., von Lintig, J. 2000. *Planta* 211: 846-854.
- Welsch, R., Medina, J., Giuliano, G., Beyer, P., Von Lintig, J. 2003. *Planta* 216: 523-534.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., Beyer, P. 2008. *Plant Physiol.* 147: 367-380.
- Yamamizo, C., Kishimoto, S., Ohmiya, A. 2010. *J. Exp. Bot.* 61: 709-719.
- Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., van Wijk, K.J. 2006. *Plant Physiol.* 140: 984-997.
- Yu, Q., Ghisla, S., Hirschberg, J., Mann, V., Beyer, P. 2011. *J. Biol. Chem.* 286: 8666-8676.

# BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN ZANAHORIAS

Ariel Cerda, Kevin Simpson y Claudia Stange



## INTRODUCCIÓN

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una planta bienal perteneciente al grupo botánico Umbelliferae o Apiaceae. Esta diversa y compleja familia de plantas incluye una gran cantidad de otros vegetales, como la pastinaca (*Foeniculum vulgare*), el hinojo (*Foeniculum vulgare*), el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*), el cilantro (*Coriandrum sativum*), el eneldo (*Anethum graveolens*), además de una gran variedad de hierbas y especias (Rubatzky, Quiros y Simon, 1999). Dentro de la especie *D. carota* se encuentran tanto las variedades que se cultivan comúnmente para consumo humano como las formas silvestres que aún se encuentran a lo largo de Asia occidental, Europa, África y América. Estas zanahorias silvestres, conocidas como subespecies o variedades de *D. carota*, por lo general crecen cerca del océano y su raíz principal es pequeña y pálida, con un sabor amargo y textura fibrosa (Vaughany y Geissler, 2009). En contraste, la zanahoria doméstica, actualmente posee una raíz mucho más larga y muy pigmentada, con un sabor dulce y una textura más crujiente.

A pesar de ser una planta sobre todo de clima templado, las zanahorias también se cultivan en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en altura.

Antes de que fueran domesticadas y utilizadas como alimento, las zanahorias silvestres y las formas tempranas de las zanahorias actuales se utilizaban como especias o hierbas medicinales, ya que al igual que otros miembros de esta familia, las semillas de las zanahorias son aromáticas (Prohens-Tomás y Nuez, 2007). Se cree que la zanahoria domesticada apareció por primera vez en el Cercano Oriente, en la región que está entre Afganistán y Turquía, antes del siglo X (Mackevic, 1929), ya que es el primer centro de diversificación de las zanahorias descrito. Desde ese punto de origen, la zanahoria se expandió tanto hacia el este como hacia el oeste (Asia menor, siglos X/XI; España, siglo XII; Europa noroeste continental, siglo XIV; Inglaterra, siglo XV; China, siglo XIV; Japón, siglo XVII) (Vaughan y Geissler, 2009). Hasta el siglo XVII, las zanahorias cultivadas en el noroeste de Europa eran todas de colores púrpura o amarillo, aunque se preferían las zanahorias amarillas ya que al cocinarse, las zanahorias púrpuras liberaban su coloración a la sopa. La forma anaranjada de la zanahoria apareció en el siglo XVII en Holanda gracias al cultivo selectivo a partir de zanahorias amarillas, que serían las progenitoras de la variedad moderna de zanahoria cultivada (International Plant Genetic Resourcesy Badra, 1998; Vaughan y Geissler, 2009).

## PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ZANAHORIAS

El consumo de zanahorias y de productos generados a partir de ellas se ha incrementado de forma sostenida durante las últimas décadas debido a la gran popularidad que ha ganado

como alimento, principalmente gracias al mayor entendimiento de su valor nutricional y a su reconocimiento como importante fuente de antioxidantes naturales; por eso la zanahoria se ha convertido en uno de los vegetales cultivados más importantes económicamente en el mundo, tanto en términos de área de producción como de valor de mercado (FAOSTAT Database on Agriculture, 2014). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2012 un total de 36917 245.70 toneladas de

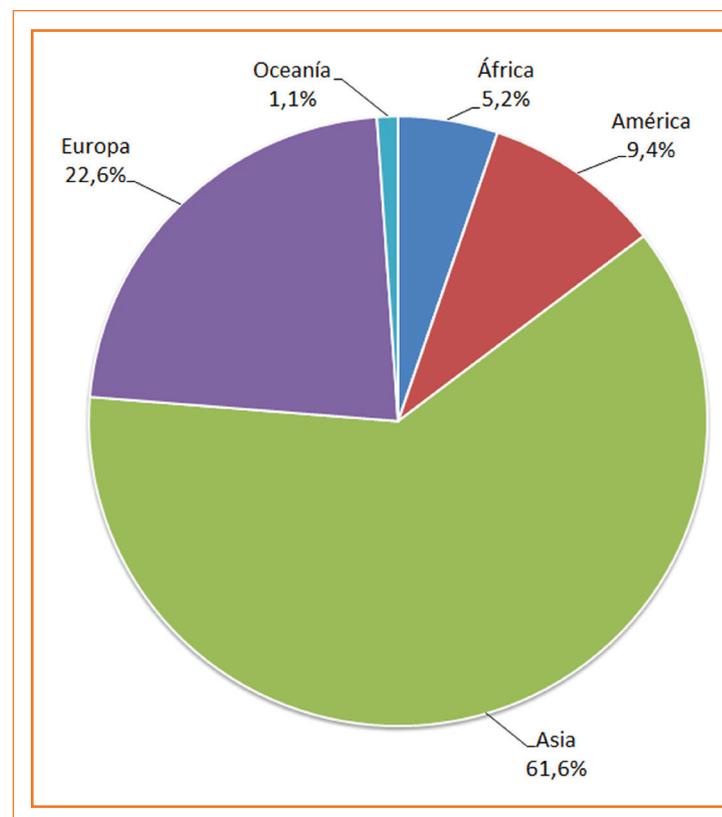


FIGURA 1. Porcentaje de producción de zanahorias y nabos por continente durante 2012, según la FAO.

zanahorias y nabos se produjeron en el mundo para consumo humano, los cuales fueron cultivados en 1 195 996 hectáreas. Tradicionalmente, Europa era el mayor centro de producción de zanahorias a escala mundial, sin embargo, en 1996 Asia adquirió el liderazgo. (FAOSTAT Database on Agriculture, 2014). Actualmente, Asia concentra aproximadamente 61.6% de la producción mundial de zanahorias y nabos, seguido por Europa con 22.6% y América con 9.4% (figura 1). En 2012, China fue el mayor productor de zanahorias y nabos con un total de 16 907 millones de toneladas producidas, concentrando así 45.8% de la producción mundial, seguido muy de lejos por Rusia (1 565 millones de toneladas), Estados Unidos (1 346 millones de toneladas) y Uzbekistán (1 300 millones de toneladas) (FAOSTAT Database on Agriculture, 2014).

## IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LAS ZANAHORIAS

Si bien la raíz de reserva de la zanahoria es la porción de la planta que se consume habitualmente, las hojas jóvenes también pueden ser ingeridas. En China y Japón las hojas tiernas de la zanahoria se utilizan en ensaladas o como hierbas para saltear (Rubatzky, Quiros y Simon, 1999). El consumo de zanahoria no aporta gran cantidad de energía calórica a la dieta humana, ya que 100 g de zanahoria cruda sólo aportan alrededor de 41 kcal (U.S. Department of Agriculture, 2014); sin embargo, la importancia de la zanahoria como alimento para el ser humano radica principalmente en la gran cantidad de fitoquímicos presentes en la raíz, como carotenoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Arscott y Tanumihardjo, 2010). Debido a la gran cantidad y variedad de diferentes compuestos presentes, la zanahoria es considerada

un alimento funcional para el ser humano, con propiedades importantes para la salud (Hager y Howard, 2006; Hasler y Brown, 2009).

La raíz de reserva de la zanahoria está constituida aproximadamente por 86.0 a 88.8% de agua, 6 a 10.6% de carbohidratos, 1.2 a 6.44% de fibra, 0.7 a 0.93% de proteínas y 0.2 a 0.5% de grasa (Gopalan, Sastri y Balasubramanian, 1989; Holland *et al.*, 1991; Li, Andrews y Pehrsson, 2002; Da Silva *et al.*, 2007; U.S. Department of Agriculture, 2014). Los carbohidratos presentes en la zanahoria son casi exclusivamente azúcares simples, sobre todo sacarosa, glucosa, fructosa y almidón (Li, Andrews y Pehrsson, 2002; U.S. Department of Agriculture, 2014). Por otro lado, del total de la fibra dietética presente en la raíz de las zanahorias, las fibras insolubles celulosa y hemicelulosa constituyen la mayor parte del total (entre 50 y 92%), mientras que la lignina sólo representa una pequeña porción del total, alrededor de 4%; la fibra soluble presente en la raíz de las zanahorias, consistente de hemicelulosa fermentable y pectina, constituye entre 8 y 50% del total de la fibra (Kochar y Sharma, 1992; Marlett, 1992).

Las zanahorias son una buena fuente de minerales como calcio, fósforo, hierro y magnesio. Si bien el contenido de nutrientes presentes en la raíz de reserva puede variar significativamente dependiendo del cultivar, se sabe que el potasio es el mineral más abundante presente en las zanahorias. De 20 cultivares analizados, incluyendo variedades de color naranja, amarillo, blanco y púrpura, se encontró que el potasio en la raíz de la zanahoria varía entre 443 y 758 mg/100 g de peso fresco (Nicolle *et al.*, 2004). Además, la acumulación de calcio en la raíz de las zanahorias parece no estar influido por el cultivar, no así otros minerales, como el hierro o el

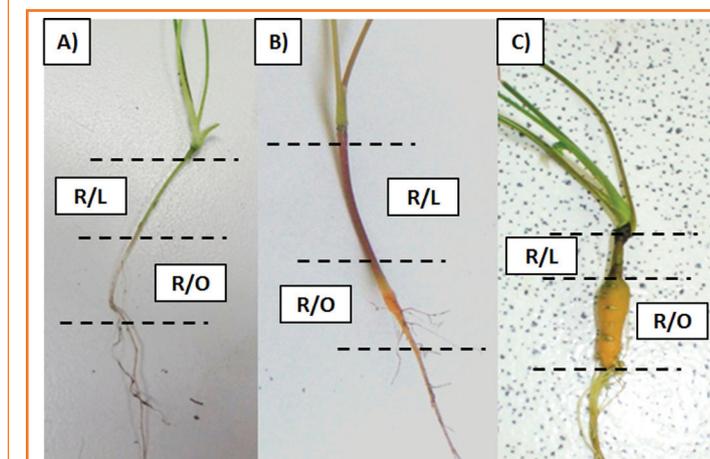
magnesio. Si bien no existe una relación clara entre el color de la raíz de reserva y la cantidad de minerales presentes, las zanahorias naranjas oscuras tienen mayor contenido de minerales, con excepción de potasio (Nicolle *et al.*, 2004). Sin embargo, la principal característica que poseen varios cultivares de zanahorias es la coloración que presentan en su raíz debido a la acumulación de diversos pigmentos.

## DESARROLLO Y COMPOSICIÓN DE CAROTENOIDES EN DISTINTAS VARIEDADES DE ZANAHORIA

A diferencia de la mayoría de las plantas, casi todos los cultivares de zanahoria son capaces de acumular altos niveles de pigmentos en la raíz de reserva, lo que permite a las zanahorias desplegar una gran variedad de colores en sus raíces. Bajo condiciones normales de crecimiento, es decir en oscuridad bajo tierra, a las cuatro semanas de desarrollo las zanahorias naranjas poseen una pequeña y delgada raíz incolora con muy bajos niveles de carotenoides (Clotault *et al.*, 2008; Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012). Luego del primer mes de crecimiento comienza el engrosamiento de la raíz de reserva y en paralelo la acumulación paulatina de carotenoides, lo cual se observa claramente a las ocho semanas de cultivo. Un crecimiento dramático de la raíz y una aceleración en la acumulación de carotenoides, hasta alcanzar altos niveles de pigmentación se observa por lo general alrededor de los tres meses de desarrollo, justo antes de completar el crecimiento secundario (figura 2) (Clotault *et al.*, 2008; Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012).

En tejidos fotosintéticos, los carotenoides actúan como pigmentos recolectores accesorios de luz durante la

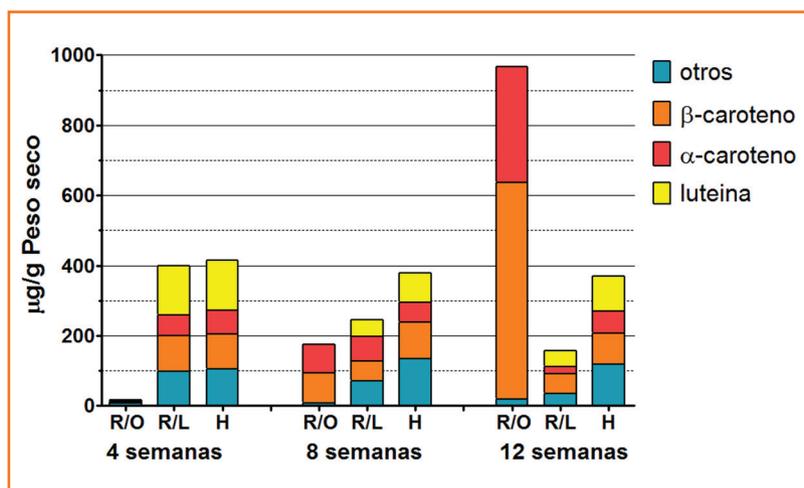
fotosíntesis y protegen a la célula vegetal del daño por oxidación. Además, proveen coloración a órganos no fotosintéticos como flores y frutos para atraer a animales polinizadores y dispersores de semillas (Davison, Hunter y Horton, 2002; Grotewold, 2006; Lu y Li, 2008). Los carotenoides que se acumulan en la raíz de reserva en zanahoria no parecen cumplir ninguna de estas funciones, y probablemente se originaron como resultado de la acumulación de mutaciones en el genoma de la zanahoria durante el proceso de domesticación.



**FIGURA 2.** Desarrollo de la raíz de reserva en zanahorias naranjas. Imágenes representativas del fenotipo de la raíz de reserva de plantas de zanahoria variedad Nantes: *a*) cuatro semanas: la raíz primaria de zanahoria se presenta delgada y pálida, *b*) ocho semanas: comienzo del engrosamiento y acumulación de carotenoides en la raíz de reserva, *c*) doce semanas: raíz en estado maduro de desarrollo. R/L: Raíz luz. R/O: Raíz oscuridad. Barra: 1 cm.

## Efecto de la luz en el desarrollo de la raíz de reserva y la acumulación de carotenoides en zanahoria

A pesar de que todos los plastidios son capaces de sintetizar carotenoides, tanto el tipo como la cantidad de éstos varía significativamente dependiendo del lugar donde se encuentren los plastidios. En las hojas, estos pigmentos se encuentran presentes en las membranas internas de los cloroplastos, por lo general directamente asociados a lipoproteínas y lípidos de membrana para formar parte de los complejos recolectores de luz y de los centros de reacción de la fotosíntesis. Se ha determinado que en los cloroplastos presentes en las hojas de las zanahorias, además de los carotenoides mayoritarios de tejidos fotosintéticos, también se observan otros como el



**FIGURA 3.** Contenido y perfil de carotenoides durante el desarrollo de hojas (H) y de segmentos de la raíz de reserva de zanahorias variedad Nantesa expuestos a luz (R/L) o a oscuridad (R/O). Resultados adaptados de Fuentes *et al.*, 2012 y Stange *et al.*, 2008.

α-caroteno (Surles, *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2012). Por otro lado, en la raíz de reserva de las zanahorias naranjas, α- y β-caroteno se acumulan en grandes cristales dentro de los cromoplastos, los cuales normalmente se diferencian en la raíz durante los últimos estadios de desarrollo bajo tierra a partir de leucoplastos que contienen almidón (amiloplastos) y son particularmente abundantes en el floema secundario de la raíz (Frey-Wyssling y Schwegler, 1965; Baranska *et al.*, 2006; Maass *et al.*, 2009; Egea *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando la raíz se expone a la luz, se inhibe el desarrollo de cromoplastos, y los leucoplastos se diferencian en cloroplastos (Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012). La raíz de la zanahoria expuesta a la luz presenta un perfil de carotenoides similar al observado en hojas, con altos niveles de luteína, además de observarse una disminución del contenido total de carotenoides, lo que no ocurre durante el desarrollo normal de la raíz en oscuridad (figura 3). Además de promover el desarrollo de cloroplastos a partir de leucoplastos e inhibir la diferenciación de los cromoplastos a partir de éstos, la luz produce la alteración en el desarrollo normal de la raíz de reserva de zanahoria, al inhibir su engrosamiento (figura 2). Sin embargo, cuando la raíz que fue expuesta a luz se somete de nuevo a condiciones de oscuridad, ésta es capaz de reanudar la diferenciación de cromoplastos y su desarrollo, eventualmente alcanzando un fenotipo similar al de la raíz que está continuamente en la oscuridad (Stange *et al.*, 2008; Stange y Flores, 2012).

## Acumulación de carotenoides en distintas variedades zanahoria

Las raíces de diferentes variedades de zanahorias exhiben una gran diversidad de colores, encontrándose zanahorias de color naranja, amarillo, rojo, blanco y púrpura (Surles *et*

*al.*, 2004; Arscott y Tanumihardjo, 2010). Esta diversidad de colores se debe principalmente a la capacidad que tienen las zanahorias de acumular diferentes tipos de carotenoides en la raíz de reserva, a excepción de las variedades púrpuras, que además son capaces de acumular antocianinas (Surles *et al.*, 2004; Montilla *et al.*, 2011). El contenido total de carotenoides y antocianinas presentes en la raíz de las zanahorias puede variar significativamente entre cultivares, y se ha descrito como la mayor fuente de variación en la concentración de estos pigmentos (Heinonen, 1990; Nicolle *et al.*, 2004; Grassmann, Schnitzler y Habegger, 2007). Diferentes estudios han demostrado que los carotenoides presentes en la raíz de las zanahorias son biodisponibles para algunos animales y el ser humano (Brown *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1999; Horvitz, Simon y Tanumihardjo, 2004; Tanumihardjo *et al.*, 2009). Sin embargo, la acumulación de carotenoides también se ve afectada por la temporada de crecimiento, el tipo de suelo y diferentes factores genéticos (Hart y Scott, 1995; Rosenfeld, Baardseth y Skrede, 1997; Grassmann, Schnitzler y Habegger, 2007). Además, se sabe que el perfil de carotenoides también varía dramáticamente durante el desarrollo de la raíz de la zanahoria y en respuesta a la exposición a la luz (Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012).

En la tabla 1 se proporciona información sobre los niveles de algunos carotenoides reportados por distintos autores en algunas variedades de zanahorias de diferentes colores. Las zanahorias blancas virtualmente carecen de carotenoides, y sólo se ha reportado que son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de luteína y trazas de otros carotenoides. La gran cantidad de luteína presente en la raíz de las zanahorias amarillas es la principal responsable de la coloración de estas variedades, a pesar de que son capaces de sintetizar en menor medida  $\beta$ -caroteno y sólo trazas de  $\alpha$ -caroteno. El color

rojo presente en las zanahorias de esta coloración se debe a que son capaces de acumular una gran cantidad de licopeno. Sólo estas variedades acumulan elevados niveles de licopeno, que puede variar de 6000 a 10000  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de peso fresco. La concentración de licopeno presente en las zanahorias rojas es incluso mayor que el contenido de licopeno encontrado comúnmente en tomates, una de las fuentes más comunes de licopeno (Dumas *et al.*, 2003). Sin embargo, las variedades rojas poseen muy poco  $\alpha$ -caroteno y, en comparación con las variedades naranjas, poseen menos  $\beta$ -caroteno. Las variedades naranjas de zanahoria deben su coloración a que producen y acumulan una gran cantidad de  $\beta$ -caroteno y, en menor medida,  $\alpha$ -caroteno, mientras que no acumulan licopeno y sólo presentan una baja cantidad de luteína (Surles *et al.*, 2004). Por otro lado, las variedades púrpura son las únicas zanahorias capaces de acumular una gran cantidad de antocianinas en la raíz de reserva y, dependiendo de la variedad, pueden acumular además diferentes tipos de carotenoides (Alasalvar *et al.*, 2001; Grassmann, Schnitzler y Habegger, 2007; Montilla *et al.*, 2011). Entre las variedades púrpuras que existen actualmente se encuentran zanahorias de color púrpura oscuro, conocidas como zanahorias negras, y otra variedades que poseen el floema púrpura, pero cuyo xilema es de color blanco, amarillo o naranja (Arscott, Simon y Tanumihardjo, 2010).

Los carotenoides pueden ser cortados por diferentes enzimas para dar origen a diversos derivados oxidados, que contribuyen de manera importante al aroma y sabor de una gran cantidad de órganos vegetales, incluyendo las zanahorias (Auldridge, McCarty y Klee, 2006; Walter, Floss y Strack, 2010; Walter y Strack, 2011). Si bien la ruta de biosíntesis de estos productos derivados de la ruptura oxidativa de carotenoides en zanahoria se encuentra poco estudiada, en 2013 Yahyaa

**TABLA 1.** Composición de Carotenoides en diferentes variedades de zanahorias

	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	luteína	licopeno
<b>Color de la raíz</b>	<b><math>\mu\text{g}/100 \text{ g de Peso fresco}</math></b>			
<b>Naranja</b>				
(Rodríguez-Amaya <i>et al.</i> , 2008)	980 a 2200	1800 a 3800	nc	nd
(Nicolle <i>et al.</i> , 2004)	1333 a 3131	3206 a 6653	60 a 180	nc
(Alasalvar <i>et al.</i> , 2001)	3990	6935	nc	nc
(Grassmann <i>et al.</i> , 2007)	5700 a 7000	4500 a 5200	400 a 500	nd
(Fuentes <i>et al.</i> , 2012)	2940 a 3920	5880 a 6860	nd	nd
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	2200	12800	260	nd
<b>Naranja oscura</b>				
(Nicolle <i>et al.</i> , 2004)	7583	17206	103	nc
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	3100	18500	440	1700
<b>Amarilla</b>				
(Nicolle <i>et al.</i> , 2004)	nd	332	138 a 232	nc
(Alasalvar <i>et al.</i> , 2001)	trazas	trazas	nc	nc
(Grassmann <i>et al.</i> , 2007)	trazas	trazas	500 a 1000	nd
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	5	180	510	nd
<b>Roja</b>				
(Grassmann <i>et al.</i> , 2007)	400	3500 a 4000	300	8500 a 10000
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	110	3400	320	6100
<b>Púrpura-amarilla</b>				
(Nicolle <i>et al.</i> , 2004)	nd	318 a 381	176 a 224	nc
<b>Púrpura-naranja</b>				
(Grassmann <i>et al.</i> , 2007)	6200 a 10000	6500	800 a 1000	nd
(Alasalvar <i>et al.</i> , 2001)	8725	16130	nc	nc
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	4100	12300	1100	nd
<b>Blanca</b>				
(Nicolle <i>et al.</i> , 2004)	nd	nd	nd	nc
(Alasalvar <i>et al.</i> , 2001)	nd	nd	nc	nc
(Grassmann <i>et al.</i> , 2007)	nd	nd	trazas	nd
(Surles <i>et al.</i> , 2004)	nd	6	9	nd

nd: no detectado; nc: no cuantificado

*et al.* encontraron varios de estos compuestos en variedades de zanahorias de color naranja y púrpura, mientras que no se encontraron en las variedades amarilla y blanca. Además, el nivel de compuestos derivados del corte de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno fueron más abundantes en las zanahorias naranjas y púrpura, lo que se correlaciona con la abundancia de  $\beta$ -caroteno encontrada en estos cultivares. Estos resultados sugieren que existe una relación directa entre el contenido de  $\beta$ -caroteno y los niveles de norisoprenoides relacionados estructuralmente (Yahyaa *et al.*, 2013).

## INGENIERÍA GENÉTICA EN *D. CAROTA*

Como uno de los vegetales más populares en el mundo y una de las principales fuentes de provitamina A en la dieta, *D. carota* se ha convertido en un importante foco de atención para el desarrollo de variedades genéticamente modificadas.

### Resistencia a herbicidas

La fosfotricina o glufosinato de amonio es un herbicida de amplio espectro y es el principal ingrediente activo de los herbicidas Basta® y Liberty®. Este compuesto produce la disrupción de la membrana celular debido a un aumento en los niveles de amoníaco, lo que produce el término de la fotosíntesis y finalmente la muerte de la planta. En 2002, Chen y Punja introdujeron en zanahoria el gen de la fosfotricina acetiltransferasa (*bar*) con el promotor CaMV 35S, generando zanahorias capaces de sobrevivir al rociado de 0.4% de Liberty® (Chen y Punja, 2002).

La resistencia a herbicidas también se ha utilizado para el control de plantas parásitas de zanahoria como, *Orobanch*

*aegyptiaca*. El gen mutado de la acetolactato sintasa de *A. thaliana* es capaz de conferir resistencia a herbicidas derivados de imidazolinona, herbicidas capaces de controlar un amplio espectro de malezas mediante la inhibición de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Este gen fue introducido en zanahorias para generar plantas capaces de resistir hasta 500  $\mu$ M de Imazapyr, mientras que plantas de *Orobanch* no resistieron los 100  $\mu$ M de este herbicida (Aviv, Amsellem y Gressel, 2002).

### Resistencia a la salinidad

La glicina betaína es un osmoprotector encontrado en varios organismos expuestos a una alta concentración de sal, mientras que la betaína aldehído deshidrogenasa es la principal enzima descrita involucrada en la biosíntesis de esta molécula, que está activa en los cloroplastos. En 2004, Kumar, Dhingra y Daniell, introdujeron en el genoma plastidial de *D. carota* el gen de la betaína aldehído deshidrogenasa, para generar líneas de zanahoria con un aumento en la actividad de esta enzima de hasta ocho veces con respecto a las plantas silvestres, resultando en un aumento de 50 veces en la acumulación de betaína. Las zanahorias transgénicas poseían un aumento en la tolerancia al estrés por sal y fueron capaces de sobrevivir a 400 mM de NaCl (Kumar, Dhingra y Daniell, 2004).

### Resistencia a patógenos

Las enfermedades producidas por hongos representan uno de los principales obstáculos para la producción de zanahoria y su posterior almacenamiento. En diferentes modelos vegetales se ha demostrado que la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis produce un aumento en la resistencia a

una gran variedad de enfermedades producidas por hongos (Oldach, Becker y Lorz, 2001; Punja, 2006; Sarowar *et al.*, 2006; Jayaraj y Punja, 2007). Entre estas proteínas relacionadas con la patogénesis se encuentran quitinasas, proteínas del tipo taumatina, glucanasas y lisozimas (Jayaraj y Punja, 2007), y varias de éstas han sido expresadas en zanahoria para producir un aumento en la resistencia a patógenos.

Plantas de zanahoria que expresan el gen de la quitinasa de tabaco (*TbChi1*) demostraron ser más tolerantes a los patógenos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Punja y Raharjo, 1996), mientras que la introducción del gen de una proteína del tipo taumatina (*t1p*) de arroz produjo un aumento en la resistencia a los patógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* en comparación con zanahorias silvestres (Chen y Punja, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión en conjunto de dos genes que codifiquen para diferentes proteínas relacionadas con la patogénesis en zanahoria asegura una protección más efectiva en comparación con las plantas que expresan los genes por separado, como se observó al expresar en zanahoria los genes de tabaco que codifican para la *TbChi1* y la 1,3-glucanasa (Melchers y Stuiver, 2000). Ambos genes codifican para enzimas que degradan la pared celular de hongos, por lo que su expresión en conjunto refuerza la destrucción de fitopatógenos.

Por otro lado, en 2006 Imani *et al.*, expresaron en zanahoria la proteína inhibidora-1 BAX (BI-1) de cebada, la cual controla la muerte celular inducida por BAX, la reacción de hipersensibilidad y la muerte celular inducida por estrés abiótico en plantas (Imani *et al.*, 2006). Al ser expuestas al hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*, las zanahorias que expresaban la proteína BI-1 demostraron poseer resistencia

mediada por BI-1 a la muerte celular inducida por hongos y una menor propagación del hongo en las hojas, además de ser más tolerantes a la podredumbre negra de raíces (*Chalara elegans*) (Imani *et al.*, 2006).

## Aumento del valor nutricional

En 2004, Park *et al.*, desarrollaron zanahorias con mayor contenido de calcio en la raíz mediante la expresión ectópica del transportador de calcio CAX1 de *A. thaliana* (Park *et al.*, 2004) y en 2008, Morris *et al.*, demostraron que la alimentación de adultos con las zanahorias CAX1 permitía un aumento en la absorción de calcio de 41% con respecto de personas alimentadas con zanahorias silvestres (Morris *et al.*, 2008).

## REGULACIÓN GÉNICA DURANTE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN ZANAHORIA

La mayor parte del conocimiento sobre los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides proviene del aislamiento y posterior secuenciación de los genes utilizando el conocimiento previo de otras secuencias de plantas como información. Esta información ha permitido el diseño de partidores para realizar experimentos de PCR heterólogos y la secuencia completa de los transcritos se ha obtenido mediante RACE-PCR (Just *et al.*, 2007). La tabla 2 muestra las secuencias genómicas presentes en zanahoria con homología a genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de carotenoides de otras especies vegetales. Hasta la fecha no se han encontrado secuencias que codifiquen para las enzimas ζ-caroteno isomerasa (ZISO) y neoxantina sintasa (NSY), mientras que para los casos de violaxantina de-epoxidasa

**TABLA 2.** Genes de síntesis de carotenoides en *D.carota* y su expresión en la raíz de reserva

Enzima	Nombre	ADNc	Proteína	Longitud (aá)	Expresión 12 sem/ 4sem
Fitoeno sintasa	PSY1	DQ192186	ABB52067	398	2,02
	PSY2	DQ192187	ABB52068	438	3,81
Fitoeno desaturasa	PDS	DQ222429	ABB52082	573	4,86
15- <i>cis</i> - $\zeta$ -caroteno isomerasa	ZISO	N.I.	N.I.		N.D.
$\zeta$ -caroteno desaturasa	ZDS1	DQ222430	ABB52083	573	0,98
	ZDS2	DQ192189	ABB52070	575	4,15
Caroteno isomerasa	CRTISO	DQ192188	ABB52069	615	N.D.
Licopeno $\beta$ -ciclasa	LCYB1	DQ192190	ABB52071	508	9,78
	LCYB2	DQ192191	ABB52072	492	0,88
Licopeno $\epsilon$ -ciclasa	LCYE	DQ192192	ABB52073	530	28,18
Caroteno $\beta$ -hidroxilasa (BCH)	CHYB1	DQ192193	ABB52074	309	N.D.
	CHYB2	DQ192194	ABB52075	303	0,07
	CHYB3	DQ192195	S.P.		N.D.
Caroteno $\epsilon$ -hidroxilasa (CYP97)	CHYE	DQ192196	ABB52076	548	N.D.
Zeaxantina epoxidasa	ZEP	DQ192197	ABB52077	668	10,61
Violaxantina de-epoxidasa	VDE	DQ192198	S.P.		0,86
Neoxantina sintasa	NSY	N.I.	N.I.		N.D.
9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa	NCED1	DQ192200	ABB52078	573	0,72
	NCED2	DQ192201	ABB52079	588	N.D.
	NCED3	DQ192202	ABB52080	588	0,1
Dioxigenasas de corte de carotenoides	CCD1	DQ192203	ABB52081	547	N.D.
	CCD2	DQ192204	S.P.		N.D.
	CCD3	DQ192205	S.P.		N.D.

N.I.: No identificado. N.D.: No determinado. Expresión 12 sem/4 sem: Expresión relativa de los genes a las 12 semanas de desarrollo de la raíz de zanahorias naranjas en oscuridad con respecto a la expresión a las 4 semanas (basado en Fuentes *et al.*, 2012).

(VDE), caroteno  $\beta$ -hidroxilasa 3 (CHYB3) y dioxigenasas de corte de carotenoides (CDD2/3), sólo se han encontrado secuencias parciales (tabla 2). Se incluye también la información de la tasa de expresión de los genes en la raíz de reserva

madura, respecto a una raíz joven de baja acumulación de carotenoides. Es interesante destacar que los genes de mayor expresión en esta condición son LCYB1, licopeno e-ciclasa (LCYE) involucradas directamente en la síntesis de  $\alpha$ -caroteno

y  $\beta$ -caroteno en la raíz de reserva y zeaxantina epoxidasa (ZEP), que participa en la síntesis de violaxantina, requerida posiblemente como precursor de ABA y de otras xantofilas. La información disponible sugiere que, de forma similar a lo que sucede en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y otras (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012), en zanahoria sólo un gen podría estar codificando a las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), caroteno isomerasa (CRTISO), LCYE, ZEP y VDE. Mientras que, en el caso de los carotenoides hidroxilasas y dioxigenasas (CHYB, CHYE, NCED, CCD), éstas están codificadas por una familia acotada de genes (tres genes máximo).

Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre en *Arabidopsis*, en zanahoria se han encontrado al menos dos isoformas para los genes *PSY*, *ZDS* y *LCYB* (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012, Rodríguez-Concepción y Stange, 2013) los cuales poseen diferente nivel de expresión en hojas (Fuentes *et al.*, 2012) y en la raíz de reserva (tabla 2). La presencia de más de una enzima *PSY* o *LCYB* es común en plantas, pero zanahoria podría ser uno de los pocos casos de plantas que poseen más de un gen codificante para *ZDS* (Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004). La presencia de múltiples isoformas para una enzima en un organismo vegetal, a menudo hace referencia a la producción preferencial de carotenoides en un tipo específico de plastidios por parte de las diferentes isoenzimas. En el caso particular de zanahoria esta producción preferencial también se ha observado al analizar resultados de expresión génica. Es interesante destacar que *PSY2* posee un nivel de expresión de 1.8 veces el de *PSY1* en la raíz madura, por su parte *LCYB1* supera en abundancia de transcrito a *LCYB2* en once veces y *ZDS2* en 4.2 veces al nivel de transcrito de *ZDS1* en la raíz madura respecto a una raíz de cuatro semanas (cuadro 17). Estos resultados sugieren que las isoenzimas *PSY1*, *ZDS1* y *LCYB2*

contribuyen preferencialmente a la producción de carotenoides en cloroplastos de tejidos fotosintéticos, mientras que *PSY2*, *ZDS2* y *LCYB1* podrían estar involucradas en la biosíntesis de carotenoides en cromoplastos de raíces de reserva (tabla 2, Cloutault *et al.*, 2008; Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012). No obstante, no siempre la funcionalidad y la actividad de las enzimas están vinculadas directamente con su tasa de expresión de transcrito y se necesitan más antecedentes para comprobar esta propuesta. Además, esto no excluye la posibilidad de que algunas de las isoformas también pudieran participar en la biosíntesis de carotenoides en otros órganos. Respecto a esto, estudios recientes han mostrado que al sobreexpresar el gen *LCYB1* en zanahoria, los niveles de carotenoides aumentan tanto en hojas como en raíces (Moreno *et al.*, 2013). Por otro lado, resultados descritos por Arango *et al.*, 2014 sugieren que la ausencia de funcionalidad de la enzima carotenoide  $\beta$ -hidroxilasa (*CHYB*) participaría en permitir la acumulación de  $\beta$ -caroteno en la raíz de reserva de *D. carota*. A pesar de ello, aún hace falta la demostración experimental que dé cuenta de la actividad enzimática de la mayoría de las enzimas que se muestran en el cuadro 17. Así, la secuencia anotada como *CHYE* (cuadro 17), que muestra homología con hidroxilasas del tipo *CYP97*, también podría tener función de *CHYB* (Kim *et al.*, 2009; 2010). Por su parte, *PSY1* y *PSY2* serían enzimas funcionales que producen un aumento en carotenoides en zanahoria y tabaco (resultados no publicados) y la expresión de *PSY2* en una planta heteróloga aumenta el nivel de carotenoides y favorece la tolerancia a estrés salino (Acevedo *et al.*, en preparación). Además, también es posible que algunas de las isoformas identificadas de *ZDS* pudieran no ser activas, por eso es necesaria una aproximación que permita establecer un panorama claro de la estructura de la ruta de biosíntesis de carotenoides en zanahoria y para eso una alternativa viable parece ser la que se

ha usado recientemente para demostrar la actividad enzimática de LCYB1 (Moreno *et al.*, 2013). En este estudio se determinó mediante complementación heteróloga en *E.coli*, localización subcelular, silenciamiento génico postranscripcional y sobreexpresión del gen en zanahoria que LCYB1 es funcional y necesaria para la síntesis de carotenoides en hojas y raíces. Adicionalmente, la expresión de LCYB1 en zanahoria y tabaco induce la expresión de genes carotenogénicos endógenos como PSY1, PSY2 y LCYB2 (Moreno *et al.*, 2013, Moreno *et al.*, 2016). En este mismo contexto, el trabajo actual en esta área se enfoca principalmente en la caracterización funcional de otros genes clave de la ruta de síntesis como *LCYB2*, *ZDS1* y *ZDS2*. Con el advenimiento de tecnologías de secuenciación masiva se cuenta hoy con bases de datos del transcriptoma parcial de zanahoria (Xu *et al.*, 2014) al igual que la secuenciación de novo del genoma de una variedad naranja de *D.carota* (Iorizzo *et al.*, 2016) que serán de gran utilidad en la identificación y caracterización de genes y rutas metabólicas en esta especie.

### Mecanismos que controlan la síntesis de carotenoides en zanahorias: raíz como modelo de estudio

A pesar de la gran relevancia que han tomado últimamente los carotenoides desde el punto de vista de la nutrición humana y su ya importante rol en la vida vegetal, el conocimiento respecto a cómo se regula a nivel molecular tanto su síntesis como su acumulación es aún muy limitado. Actualmente existen tres categorías en las cuales se encuentran los principales mecanismos de regulación: 1) control de la expresión génica de los genes codificantes para enzimas involucradas en la biosíntesis o degradación de carotenoides, 2) regulación de las actividades enzimáticas y 3) disponibilidad de estructuras de almacenamiento. Estos mecanismos parecen estar

estrechamente coordinados a través del ciclo de vida la planta, tanto por señales internas desencadenadas por el desarrollo como por estímulos externos medioambientales, de los cuales la luz tiene un rol sobresaliente (Cazzonelli y Pogson, 2010; Fuentes *et al.*, 2012). Los mayores aportes al estudio de cómo estos tres mecanismos actúan en conjunto para eventualmente dar cuenta del contenido de carotenoides en los tejidos vegetales provienen de los procesos de desetiolación en *Arabidopsis* y la maduración del fruto de tomate, dos procesos en los cuales la producción de carotenoides está aumentada y desempeña un papel relevante (Rodríguez-Concepcion y Stange, 2013).

Ahora bien, en el caso particular de zanahoria, los primeros estudios se enfocaron en mecanismos que dan cuenta de la pigmentación de las raíces modificadas y éstos se centraron principalmente en aproximaciones genéticas. Estos estudios han proporcionado información que concierne al contexto genómico de genes candidatos y los principales *quantitative trait loci* (QTL) que dan cuenta del contenido carotenogénico (y por ende, en gran parte, del color asociado), y han contribuido a estimar el número de genes, herencia y pasos limitantes para la producción de carotenoides en las raíces de reserva (Santos y Simon, 2002; Just *et al.*, 2007; ). En particular, el análisis de las poblaciones originadas a partir de la cruce entre variedades blanca, naranja y naranja oscura han proporcionado evidencia de que la herencia del contenido de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales es continua en la cruce entre variedades naranjas  $\times$  naranjas oscuras, pero discreta en el caso de cruces de variedades blancas y naranjas, sugiriendo que son por lo menos dos los principales *loci* que separan a las zanahorias blancas de las naranjas (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepcion, 2012). Estos estudios llevaron a proponer que la principal diferencia entre variedades blancas y naranjas de zanahoria correspondía a un bloqueo temprano en la ruta de biosíntesis, específicamente en

la producción de fitoeno (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepcion, 2012). Estudios posteriores confirmaron que la regulación positiva de la actividad de PSY era suficiente por sí sola para incrementar la producción de  $\beta$ -caroteno y carotenoides totales en zanahorias blancas, y además que su acumulación ocurría en forma de cristales en plastidios de estructura similar a cromoplastos (Maass *et al.*, 2009). Consistente con la relevancia de los primeros pasos en la ruta de biosíntesis de carotenoides en raíces de zanahoria, recientemente distintas aproximaciones filogenéticas sugieren que la domesticación de la zanahoria involucró la selección preferencial de mutaciones que afectan genes al principios de la ruta de biosíntesis, que participan en la síntesis de los precursores metabólicos, lo cual potencialmente pudo tener un efecto mayor en incrementar el flujo metabólico hacia la biosíntesis de carotenoides (Clotault *et al.*, 2012).

La identificación de los genes que putativamente codificaban para la ruta de biosíntesis de carotenoides en la primera década de este siglo, dio paso a la investigación enfocada en la relevancia de la regulación transcripcional que da origen a las diferentes variedades de zanahorias. En uno de los primeros estudios al respecto, se cuantificaron los niveles de expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo de raíces de distintos cultivares de zanahorias, cuya principal característica contrastante era el color de la raíz de reserva; blanca (Blanche), amarilla (Yellowstone), naranja (Bolero) y roja (Nutrired). Los transcritos cuantificados correspondieron a los de aquellos genes que codificaban proteínas con homología a PSY, PDS, ZDS, LCYE, LCYB1 y ZEP, y se encontró que éstos estaban regulados positivamente de manera global durante el desarrollo de la raíz en todos los cultivares estudiados (Clotault *et al.*, 2008). Esto es consistente con el aumento en la acumulación de carotenoides totales observada durante el mismo periodo en variedades de zanahorias coloreadas, a pesar de que el

aumento en los niveles de transcrito es modesto en comparación con el dramático aumento en los niveles de carotenoides observados en los cultivares Bolero y Nutrired. Además, los niveles de transcritos más altos en raíces de zanahorias Yellowstone y Nutrired correspondieron a los de los genes LCYE y ZDS respectivamente, lo que concuerda con la acumulación de luteína (Yellowstone) y licopeno (Nutrired) en esos cultivares (Clotault *et al.*, 2008). Todos estos resultados inicialmente apoyaron la conclusión de que la regulación transcripcional de los genes carotenogénicos era fundamental para definir el perfil de carotenoides en variedades coloreadas de zanahoria. Sin embargo, la ausencia de una correlación entre los niveles de transcrito y metabolitos en el momento en que la acumulación de carotenoides se aumenta durante estadios tardíos del desarrollo radicular sugieren que otros mecanismo también son relevantes para determinar el contenido final de carotenoides. Otra de las evidencias que pone de manifiesto que existen otros puntos de control que regulan la carotenogénesis es la ausencia de carotenoides en el cultivar de raíz blanca, que prácticamente no posee carotenoides a pesar de mostrar un perfil de expresión génico carotenogénico similar al de raíces coloreadas (Clotault *et al.*, 2008). Son muchos los mecanismos que se han propuesto para explicar esta incongruencia aparente, e incluyen la existencia de alelos no funcionales, isoformas tejido específicas, actividades enzimáticas alteradas e incluso un aumento en la degradación de carotenoides, no obstante, a la fecha no existe evidencia experimental suficiente para apoyar ninguna de ellas.

Otros estudios más recientes sobre la expresión carotenogénica durante el desarrollo de la raíz de zanahoria han mostrado que la identidad plastidial tiene un rol fundamental en la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva (Fuentes *et al.*, 2012). Basados en las observaciones previas de que la luz poseía un efecto dramático tanto en el desarrollo de la raíz como en el perfil

de carotenoides en zanahorias (Stange *et al.*, 2008; Stange y Flores, 2011), se analizaron los niveles de transcritos de genes carotenogénicos en muestras de raíces de la variedad naranja Nantaise que se habían desarrollado bajo tierra o expuestas a la luz (figura 4, del capítulo 1). Los transcritos analizados correspondieron a varios genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides; PSY1, PSY2, PDS, ZDS1, ZDS2, LCYE, LCYB1, LCYB2, CHYB2, ZEP, VDE, NCED1 y NCED3, revelando una compleja interacción de señales ambientales (luz) y del desarrollo que permiten la diferenciación de los plastidios y la expresión de los genes carotenogénicos (Fuentes *et al.*, 2012). Los perfiles de carotenoides de tejidos de raíz crecida en condiciones de luz y oscuridad fueron completamente distintos. En particular, se observó un aumento en los niveles de carotenoides totales y de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en aquellos segmentos que fueron expuestos a oscuridad y una disminución en las secciones de raíz iluminada; se correlacionaron con la expresión de genes involucrados en la síntesis de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno, con la excepción de ZDS1, LCYB2 (ambos con cambios no significativos) y LCYE (aumentado en las dos condiciones de desarrollo). Además, el fuerte incremento de los niveles de transcrito de LCYB1 y LCYE y la disminución en los de CHYB2 durante los estadios tardíos del desarrollo de raíces en oscuridad también se correlaciona con la acumulación preferencial de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en raíces maduras (Fuentes *et al.*, 2012).

La identidad plastidial, asociada directamente con el desarrollo y con el ambiente, fue una segunda evidencia que definió la composición y el contenido de carotenoides en *D. carota*. La diferenciación de los proplastidios a cloroplastos en aquellas secciones de la raíz expuestas a la luz dieron una explicación concordante con el perfil de carotenoides, de forma similar a otros órganos que contienen cloroplastos, como las hojas (Fuentes *et al.*, 2012, Rodríguez-Concepción y Stange, 2013).

Mientras que en el caso de aquellos segmentos desarrollados en oscuridad se observó la diferenciación de cromoplastos durante el crecimiento secundario en la raíz de reserva en una correlación directa con el aumento en los niveles de carotenoides totales  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno acumulados en forma de cristales (Fuentes *et al.*, 2012, Rodríguez-Concepción y Stange, 2013). Por lo tanto, el aumento en la expresión de los genes de síntesis de carotenoides, preferentemente para  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno, y la diferenciación de los plastidios a cromoplastos parecen ser determinantes para definir el contenido de carotenoides, sobre todo para  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en las raíces de reserva de zanahorias.

La gran acumulación de carotenoides en cromoplastos de raíces de zanahoria crecidas en oscuridad en comparación con la de cloroplastos de tejidos expuestos a la luz podría ser el resultado de un aumento en la capacidad de almacenamiento, un aumento en el flujo metabólico debido a la remoción de productos finales de la ruta o la ausencia de procesos foto-oxidativos que degraden aquellos carotenoides acumulados cuando el tejido se expone a la luz (Vishnevetsky, Ovadis y Vainstein, 1999; Baranska *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2010). Por otro lado la ultraestructura plastidial también es relevante en la actividad de aquellas enzimas requeridas para la biosíntesis de carotenoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Un claro ejemplo de esto es la aumentada actividad de PSY en cloroplastos en comparación con etioplastos, lo que se atribuye a la asociación de la enzima a las membranas tilacoidales del cloroplasto durante la de-etiolación (Welsch *et al.*, 2000). A causa de que las raíces de almacenamiento de zanahorias de variedades blancas muestran niveles de transcrito similares a aquellos observados en raíces coloreadas, pero la síntesis de fitoeno parece ser limitante sólo en zanahorias blancas (Maass *et al.*, 2009), es posible que la actividad de la enzima

PSY esté reducida en leucoplastos pero aumente cuando éstos se diferencian en cromoplastos. Por otro lado, el aumento en los niveles y actividad de PSY en la raíz de cultivares blancos de zanahoria y otros sistemas vegetales han sido suficientes para promover la diferenciación de cromoplastos (Ronen *et al.*, 1999; Shewmaker *et al.*, 1999; Bramley, 2002; Maass *et al.*, 2009), lo que sugiere que tanto la actividad de PSY como la diferenciación de los cromoplastos se ven mutuamente involucrados en la acumulación de carotenoides en plantas.

Estos resultados en conjunto apuntan a la existencia de un complejo mecanismo de retroalimentación que coordina la expresión de los genes carotenogénicos, actividades enzimáticas y diferenciación plastidial para asegurar una producción apropiada de carotenoides. Un trabajo reciente ha mostrado que la alteración de los niveles de *LCYB1* de *D.carota* a través de la transgénesis es capaz de producir cambios en la expresión de genes endógenos carotenogénicos (*PSY1*, *PSY2* y *LCYB2*) tanto en hojas como en raíces de zanahoria (Moreno *et al.*, 2013). Recientemente, con la información del genoma de zanahoria se postula el gen DCAR032551, presente en el loci Y, como un candidato en la participación de la síntesis de carotenoides dado que cosegrega con esta característica (Iorizzo *et al.*, 2016). El gen homólogo en *Arabidopsis* (At3g55240) produce un fenotipo de pseudo-etiolación en luz (PEL) semejante a *DXS1*, uno de los tres genes de la zanahoria que codifican para DXS, era el único de la ruta del MEP cuyos niveles de expresión correlacionaron positivamente con el contenido del carotenoides en las variedades pigmentadas de zanahoria (Iorizzo *et al.*, 2016). Recientemente, por medio de sobreexpresión determinamos que DXS desempeña un papel central en la producción de precursores en zanahoria, produciendo un aumento en carotenoides en hojas y en las raíces de reserva crecidas en

oscuridad (Simpson *et al.*, 2016). Otros autores (Misawa *et al.*, 1994; Corona *et al.*, 1996; Romer *et al.*, 2000; 2002; Simkin *et al.*, 2003; Diretto *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2007; Harjes *et al.*, 2008; Apel y Bock, 2009; Bai *et al.*, 2009) han propuesto la regulación mediante retroalimentación de la expresión de genes carotenogénicos y actividades enzimáticas mediada por fitoeno, licopeno u otros carotenoides, para explicar los perfiles de carotenoides. Sin embargo, tanto los mecanismos moleculares como los metabolitos específicamente involucrados en este tipo de regulación aún son desconocidos.

## PROYECCIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES

Todos los estudios hasta la fecha apuntan a que el perfil de carotenoides en raíces de zanahoria está determinado por un control mediado por factores ambientales durante el desarrollo y de la expresión de genes carotenogénicos, actividad enzimática y diferenciación plastidial. Sin embargo, los factores moleculares involucrados en este control aún no se han identificado. Teniendo en cuenta el rol clave de la luz en la regulación de la carotenogénesis en zanahoria, el primer paso para identificar estos factores moleculares podría ser el estudio de proteínas endógenas de zanahoria involucradas en vías de señalización por luz, que puedan tener un papel en la acumulación de carotenoides, en modelos mejor estudiados como lo son *Arabidopsis* y tomate. En particular, una familia de factores de transcripción denominada PIF, los cuales se acumulan en la oscuridad para reprimir la biosíntesis de carotenoides y el desarrollo de cloroplastos (Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez-Concepción, 2010; Leivar y Quail, 2011), podrían ser buenos candidatos para analizar en zanahoria. Por otro lado, la luz no sólo desempeña un rol en la expresión de los genes carotenogénicos y la diferenciación plastidial, sino que también afecta el grosor y el

normal desarrollo de las raíces de reserva de zanahoria (Stange *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2012), sugiriendo que el nivel o actividad de reguladores del desarrollo (ej. hormonas) podría también estar modulado por la luz, tal como en otros modelos vegetales (Egea *et al.*, 2010; Klee y Giovannoni, 2011). Una de las hormonas vegetales que podrían estar involucradas es el ácido abscísico (ABA), que es capaz de influir en el número y volumen de los cromoplastos en frutos de tomate y también regular mediante retroalimentación la expresión de genes clave en la síntesis de carotenoides en la raíz de muchas plantas (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch *et al.*, 2008; Arango *et al.*, 2010; Meier *et al.*, 2011). A este respecto se ha propuesto que el aumento en la actividad de PSY podría proveer los precursores carotenoides que permitirían un aumento en la producción de ABA, que se produce al someter las raíces a estrés salino o hídrico. No obstante, se desconoce si la presencia de altos niveles de carotenoides en las raíces de zanahoria hace innecesaria la regulación de la expresión de PSY mediada por ABA como se ha observado en otras plantas. Sería interesante evaluar si la presencia de altos niveles de carotenoides disponibles para la síntesis de ABA en zanahorias coloreadas afecta su capacidad de respuesta frente a estrés abiótico en comparación con los

cultivares de zanahorias blancas. Por otra parte, las auxinas, involucradas normalmente en el desarrollo radicular, son también interesantes candidatas para ser estudiadas en *D. carota* y representan un atractivo desafío para estudios futuros.

Las zanahorias se consumen mucho debido a su agradable sabor, que se debe principalmente a la presencia de isoprenoides volátiles y azúcares (Simon, Lindsay y Peterson, 1980; Alasalvar *et al.*, 2001), y si bien los pigmentos carotenoides no poseen mayor influencia en este atributo, sí lo hacen en contribuir al color, lo que también es un carácter apetecible para los consumidores (Surles *et al.*, 2004). La importancia de los carotenoides también radica en su importante rol como metabolitos secundarios que contribuyen a la salud humana (Fraser y Bramley, 2004; He y Giusti, 2010). En particular, las variedades naranjas de zanahoria representan una importante fuente de provitamina A en la dieta occidental, por lo que futuros estudios enfocados en la identificación de factores transcripcionales y reguladores hormonales de la síntesis de carotenoides en zanahorias podrían proporcionar herramientas adicionales para mejorar tanto las características visuales como el contenido nutricional de este importante vegetal.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto Fondecyt 1130245 del Gobierno de Chile.

## REFERENCIAS

- Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F. 2001. *J Agric Food Chem* 49: 1410-1416.
- Apel, W., Bock, R. 2009. *Plant Physiol* 151: 59-66.
- Arango, J., Wust, F., Beyer, P., Welsch, R. 2010. *Planta* 232: 1251-1262.
- Arango, J., Jourdan, M., Geoffriau, E., Beyer, P., Welsch, R. 2014. *Plant Cell* 26: 2223-2233.
- Arscott, S.A., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2010. *J Agric Food Chem* 58: 2877-2881.
- Arscott, S.A., Tanumihardjo, S.A. 2010. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 223-239.
- Auldridge, M.E., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2006. *Curr Opin Plant Biol* 9: 315-321.
- Aviv, D., Amsellem, Z., Gressel, J. 2002. *Pest Manag Sci* 58: 1187-1193.
- Bai, L., Kim, E.H., DellaPenna, D., Brutnell, T.P. 2009. *Plant J* 59: 588-599.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., Nothnagel, T. 2006. *Planta* 224: 1028-1037.
- Bramley, P.M. 2002. *J Exp Bot* 53: 2107-2113.
- Brown, E.D., Micozzi, M.S., Craft, N.E., Bieri, J.G., Beecher, G., Edwards, B.K., Rose, A., Taylor, P.R., Smith, J.C. Jr. 1989. *Am J Clin Nutr* 49: 1258-1265.
- Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J. 2010. *Trends Plant Sci* 15: 266-274.
- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., Geoffriau, E. 2007. *J Exp Bot* 59: 3563-3573.
- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., Geoffriau, E. 2008. *J Exp Bot* 59: 3563-3573.
- Clotault, J., Peltier, D., Soufflet-Freslon, V., Briard, M., Geoffriau, E. 2012. *PLoS One* 7: e38724.
- Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G., Bartley, G.E., Pitto, L., Giorgetti, L., Scolnik, P.A., Giuliano, G. 1996. *Plant J* 9: 505-512.
- Cunningham, F.X., Gantt, E. 1998. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 557-583.
- Chen, W., Punja, Z. 2002. *Plant Cell Reports* 20: 929-935.
- Da Silva, E.A., Vieira, M.A., Vieira, E.A., De Mello Castanho Amboni, R.D., Amante, E.R., Teixeira, E. 2007. *Journal of Food Process Engineering* 30: 746-756.
- Davison, P.A., Hunter, C.N., Horton, P. 2002. *Nature* 418: 203-206.
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., Giuliano, G. 2006. *BMC Plant Biol* 6: 13.

## REFERENCIAS

- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. 2003. *J. Sci. Food and Agriculture* 83: 369-382.
- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latche, A., Chervin, C., Bouzayen, M., Pech, J.C. 2010. *Plant Cell Physiol* 51: 1601-1611.
- FAOSTAT Database on Agriculture. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2004. *Prog Lipid Res* 43: 228-265.
- Frey-Wyssling, A., Schwegler, F. 1965. *J Ultrastruct Res* 13: 543-559.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2012. *Plant Mol Biol* 79: 47-59.
- Gopalan, C., Sastri, B.V.R., Balasubramanian, S.C., Nutrition Nlo. 1989. National Institute of Nutrition, Indian Council of Medical Research.
- Grassmann, J., Schnitzler, W.H., Habegger, R. 2007. *Int J Food Sci Nutr* 58: 603-611.
- Grotewold, E. 2006. *Annu Rev Plant Biol* 57: 761-780.
- Hager, T.J., Howard, L.R. 2006. *Hortic Sci.* 41: 74-79.
- Harjes, C.E., Rocheford, T.R., Bai, L., Brutnell, T.P., Kandianis, C.B., Sowinski, S.G., Stapleton, A.E., Vallabhaneni, R., Williams, M., Wurtzel, E.T., Yan, J., Buckler, E.S. 2008. *Science* 319: 330-333.
- Hart, D.J., Scott, K.J. 1995. *Food Chemistry* 54: 101-111.
- Hasler, C.M., Brown, A.C. 2009. *Journal of the American Dietetic Association* 109: 735-746.
- He, J., Giusti, M.M. 2010. *Annu Rev Food Sci Technol* 1: 163-187.
- Heinonen, M.I. 1990. *J. Agri. Food Chem.* 38: 609-612.
- Hirschberg, J. 2001. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218.
- Holland, B., Widdowson, E.M., Unwin, I.D., Buss, D.H. 1991. *Royal Society of Chemistry*
- Horvitz, M.A., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2004. *Eur J Clin Nutr* 58: 803-811.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K.H., Huckelhoven, R. 2006. *Mol Plant Pathol* 7: 279-284.
- International Plant Genetic Resources I, Badra, T. 1998. International Plant Genetic Resources Institute.
- Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P., Huang, J., et al. 2016. *Nat Genet* 48(6): 657-666. doi: 10.1038/ng.3565.
- Jayaraj, J., Punja, Z.K. 2007. *Plant Cell Rep* 26: 1539-1546.

## REFERENCIAS

- Just, B.J., Santos, C.A., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S., Oloizia, B.B., Simon, P.W. 2007. *Theor Appl Genet* 114: 693-704.
- Just, B.J., Santos, C.A., Yandell, B.S., Simon, P.W. 2009. *Theor Appl Genet* 119: 1155-1169.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., Dellapenna, D. 2009. *Plant Cell Physiol* 50: 463-479.
- Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., Douglas, C.J. 2010. *Phytochem.* 71: 168-178.
- Kim, J.E., Rensing, K.H, Douglas, C.J., Cheng, K.M. 2010. *Planta* 231: 549-558.
- Klee, H.J., Giovannoni, J.J. 2011. *Annu Rev Genet* 45: 41-59.
- Kochar, G.K., Sharma, K.K. 1992. *J.I Food Sci. Technol* 29: 187-190.
- Kumar, S., Dhingra, A., Daniell, H. 2004. *Plant Physiol* 136: 2843-2854.
- Leivar, P., Quail, P.H. 2011. *Trends Plant Sci* 16: 19-28.
- Li, B.W., Andrews, K.W., Pehrsson, P.R. 2002. *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 715-723.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Wurtzel, E.T. 2008. *Plant Physiol* 146: 1333-1345.
- Lu, S., Li, L. 2008. *J Integr Plant Biol* 50: 778-785.
- Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P., Welsch, R. 2009. *PLoS One* 4: e6373.
- Mackevic, V.I. 1929. *Bul. Appl. Bot.*, 20: 517-562.
- Marlett, J.A. 1992. *Journal of the American Dietetic Association* 92: 175-186
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C., Wurtzel, E.T. 2011. *BMC Syst Biol* 5: 77.
- Melchers, L.S., Stuiver, M.H. 2000. *Curr Opin Plant Biol* 3: 147-152.
- Misawa, N., Truesdale, M.R., Sandmann, G., Fraser, P.D., Bird, C., Schuch, W., Bramley, P.M. 1994. *J Biochem* 116: 980-985.
- Montilla, E.C., Arzaba, M.R., Hillebrand, S., Winterhalter, P. 2011. *J Agric Food Chem* 59: 3385-3390.
- Moreno, J.C., Pizarro, L., Fuentes, P., Handford, M., Cifuentes, V., Stange, C. 2013. *PLoS One* 8: e58144.
- Moreno, J.C., Cerda, A., Simpson, K., López-Díaz I., Carrera E., Handford, M., y Stange, C. 2016. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/erw037.
- Morris, J., Hawthorne, K.M., Hotze, T., Abrams, S.A., Hirschi, K.D. 2008. *Proc Nat Acad Sci* 105: 1431-1435.
- Muller, H., Bub, A., Watzl, B., Rechkemmer, G. 1999. *Eur J Nutr* 38: 35-44.

## REFERENCIAS

- Nicolle, C., Simon, G., Rock, E., Amouroux, P., Rémésy, C. 2004. *J. Ame. Soc. Hort Sci* 129: 523-529.
- Oldach, K.H., Becker, D., Lorz, H. 2001. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 832-838.
- Park, S., Kim, C.K., Pike, L., Smith, R., Hirschi, K. 2004 *Mol Breed.* 14: 275-282.
- Prohens-Tomás, J., Nuez, F. 2007. *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. Nueva York: Springer-Verlag.
- Punja, Z.K. 2006. *Can. J. Plant Pathol.* 28: S298-S308.
- Punja, Z.K., Raharjo, S.H.T. 1996. *Plant Dis* 80: 999-1005.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., Qu, L.J. 2007. *Cell Res* 17: 471-482.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Kimura, M., Godoy, H.T., Amaya-Farfán, J. 2008. *J Food Comp. Anals* 21: 445-463.
- Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2013. *Arch Biochem Biophys* 539: 110-116.
- Romer, S., Fraser, P.D., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M. 2000. *Nat Biotechnol* 18: 666-669.
- Romer, S., Lubeck, J., Kauder, F., Steiger, S., Adomat, C., Sandmann, G. 2002. *Metab Eng* 4: 263-272.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. *Plant J* 17: 341-351.
- Rosenfeld, H.J., Baardseth, P., Skrede, G. 1997. *Food Res Int* 30: 611-618.
- Rubatzky, V.E., Quiros, C.F., Simon, P.W. 1999. *Carrots and related vegetable Umbelliferae*. Nueva York: CABI
- Ruiz-Sola, M.A., Rodríguez-Concepción, M. 2012. *Arabidopsis Book* 10: e0158.
- Santos, C.A., Simon, P.W. 2002. *Mol Genet Genomics* 268: 122-129.
- Sarowar, S., Kim, Y., Kim, E., Kim, K., Choi, J., Hyung, N., Shin, J. 2006. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 86: 7-14.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. 1999. *Plant J* 20: 401-412X.
- Simkin, A.J., Zhu, C., Kuntz, M., Sandmann, G. 2003. *J Plant Physiol* 160: 439-443.
- Simon, P.W., Lindsay, R.C., Peterson, C.E. 1980 *J Agric Food Chem* 28: 549-552.
- Simpson, K., Quiroz, L.F., Rodríguez-Concepción, M. y Stange, C. 2016. *Front. Plant Sci.* 7 red: 1344. doi: 10.3389/fpls.2016.01344.
- Stange, C., Fuentes, P., Handford, M., Pizarro, L. 2008. *Biol Res* 41: 289-301.

## REFERENCIAS

- Stange, C., Flores, C. 2012. Carotenoids and Photosynthesis. Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors. INTECH Open Access Publisher.
- Surles, R.L., Weng, N., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2004. *J Agric Food Chem* 52: 3417-3421.
- Tanumihardjo, S.A., Horvitz, M.A., Dosti, M.P., Simon, P.W. 2009. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1280-1286.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Rodríguez-Concepción, M. 2010. *Proc Natl Acad Sci* 107: 11626-11631.
- U.S. Department of Agriculture ARS. 2014. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27. Nutrient Data Laboratory Home Page. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.
- Vaughan, J., Geissler, C. 2009. *The New Oxford Book of Food Plants*. Oxford: Oxford University Press.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Vainstein, A. 1999. *Trends Plant Sci* 4: 232-235.
- Walter, M., Floss, D., Strack, D. 2010. *Planta* 232: 1-17.
- Walter, M.H., Strack, D. 2011. *Natl Prod Rep* 28: 663-692.
- Wang, Y.Q., Yang, Y., Fei, Z., Yuan, H., Fish, T., Thannhauser, T.W., Mazourek, M., Kochian, L.V., Wang, X., Li, L. 2013. *J Exp Bot* 64: 949-961.
- Welsch, R., Beyer, P., Huguene, P., Kleinig, H., Von Lintig, J. 2000. *Planta* 211: 846-854.
- Welsch, R., Wust, F., Bar, C., Al-Babili, S., Beyer, P. 2008. *Plant Physiol* 147: 367-380.
- Xu, Z.S., Tan, H.W., Wang, F., Hou, X.L., Xiong, A.S. 2014. CarrotDB: A Genomic and Transcriptomic Database for Carrot. Oxford.
- Yahyaa, M., Bar, E., Dubey, N.K., Meir, A., Davidovich-Rikanati, R., Hirschberg, J., Aly, R., Tholl, D., Simon, P.W., Tadmor, Y., Lewinsohn, E., Ibdah, M. 2013. *J Agric Food Chem* 61: 12244-12252.

# BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN EL FRUTO DE TOMATE

Francesc Hernández-Gras, Karel de Pourcq, Djédoux Maxime Angaman y Albert Boronat



## RELEVANCIA COMERCIAL Y NUTRICIONAL DEL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más consumidas en el mundo. Con aproximadamente 160 millones de toneladas producidas en 2012, el tomate representa uno de los principales cultivos a escala global. En la actualidad los principales países productores son China, India y Estados Unidos, que contribuyen aproximadamente con la mitad de la producción mundial (tabla 1). España, con una producción de aproximadamente cuatro millones de toneladas, es el noveno productor mundial y el segundo de Europa detrás de Italia (tabla 1). Tomando en consideración la distribución geográfica de los países productores, se pueden delimitar dos grandes áreas que concentran la mayor parte de la producción mundial: por una parte, y con cerca de 40% de la producción, está Asia (excluyendo Medio Oriente), y son China e India los países más destacados; por otra, la cuenca mediterránea, que representa aproximadamente 20% del total, donde Turquía, Egipto, Italia y España son los países productores más importantes.

**TABLA 1.** Principales países productores de tomate en 2012

Posición	País	Millones de toneladas	Porcentaje de producción mundial
1	China	48.6	30.5
2	India	16.8	10.6
3	Estados Unidos	12.5	7.9
4	Turquía	11.0	6.9
5	Egipto	8.1	5.1
6	Irán	6.8	4.3
7	Italia	6.0	3.7
8	Brasil	4.4	2.8
9	España	3.9	2.4
10	Uzbekistán	2.6	1.6
11	México	2.4	1.5
12	Rusia	2.2	1.4
13	Ucrania	2.1	1.3
14	Nigeria	1.5	0.9
15	Túnez	1.3	0.8
16	Portugal	1.2	0.8
17	Marruecos	1.2	0.8
18	Grecia	1.2	0.7
19	Siria	1.2	0.7
20	Irak	1.1	0.7

**Fuente:** <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>.

El tomate se comercializa fresco y en forma de productos procesados, como zumos o jugos, salsas, triturados o concentrados. Mientras que el tomate fresco debe tener unas características organolépticas que satisfagan al consumidor, el tomate para uso industrial debe tener además otras

propiedades adecuadas a tal fin. El consumo creciente del tomate y sus derivados ha comportado que la superficie dedicada a su cultivo se haya duplicado durante los últimos veinte años. Las zonas de mayor consumo de tomate son los países del área mediterránea y Medio Oriente.

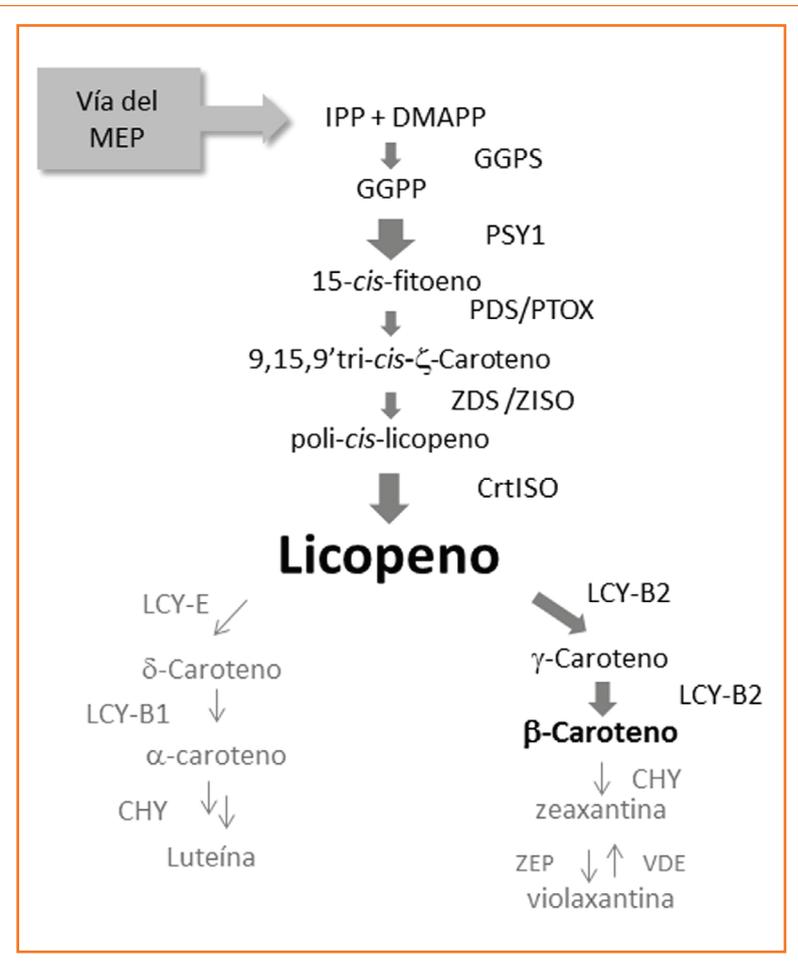
De forma similar a otros componentes vegetales de la dieta, el tomate contiene diversos compuestos, como minerales, vitaminas y otros de interés en nutrición, que poseen un efecto beneficioso para la salud. Distintos estudios epidemiológicos han establecido una correlación entre las dietas ricas en tomate y una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y de ciertos tipos de cáncer. Entre los compuestos con efectos saludables del tomate destacan el licopeno y el  $\beta$ -caroteno (figura 4), dos carotenoides que se sintetizan y acumulan en el fruto durante el proceso de maduración. El licopeno es el carotenoide coloreado mayoritario (85-90% del contenido total) y es el pigmento responsable del típico color rojo del fruto maduro. No obstante, los tomates también contienen importantes cantidades de los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno (Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez, Fraser y Bramley, 2010). El licopeno posee una potente actividad antioxidante, al menos *in vitro*, y su ingesta a través de la dieta se ha asociado con un menor riesgo de padecer cáncer de próstata y patologías cardiovasculares (Krinsky y Johnson, 2005; Rao y Rao, 2007). Es de destacar que el tomate representa la principal fuente dietaria de licopeno, ya que su presencia está restringida únicamente a otros pocos frutos, como la sandía, la papaya, el pomelo rosado o toronja y la guayaba. El  $\beta$ -caroteno es el segundo carotenoide coloreado más abundante en el fruto y puede representar 10-15% de los carotenoides coloreados totales. Sus beneficios para el organismo son múltiples y derivados principalmente de su metabolización a retinol (vitamina A), un compuesto esencial

para la funcionalidad de determinados órganos y de gran importancia también en el proceso de la visión (Von Lintig y Vogt, 2004). Además, el  $\beta$ -caroteno se ha relacionado con una disminución del riesgo de padecer cáncer de pulmón y enfermedades cardiovasculares (Krinsky y Johnson, 2005; Fritz *et al.*, 2011). A diferencia del licopeno, el  $\beta$ -caroteno presenta una amplia distribución en alimentos de origen vegetal (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005). El tomate contiene también cantidades importantes de los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno (que suelen ser los mayoritarios después del licopeno) y niveles relativamente bajos de xantofilas, siendo la luteína la más abundante (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010). Conjuntamente con la zeaxantina, la luteína tiene un papel importante en el proceso de la visión. Ambos carotenoides son componentes del pigmento macular del ojo y se acepta que su ingesta a través de la dieta disminuye el riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad (Fraser y Bramley, 2004). De forma similar al  $\beta$ -caroteno, la luteína se encuentra también presente en una gran variedad de frutas y hortalizas (Fraser y Bramley, 2004).

Además de su papel como pigmentos y de su relevancia nutricional, los carotenoides actúan como precursores de compuestos volátiles que contribuyen al aroma y el sabor del fruto (Simkin *et al.*, 2004). En este sentido, es interesante indicar que el contenido de carotenoides del fruto del tomate se ha correlacionado con la aceptabilidad de sus características sensoriales por parte de los consumidores (Vogel *et al.*, 2010).

## BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO Y SU REGULACIÓN

En las plantas, todas las etapas de la biosíntesis de carotenoides tienen lugar en los plástidos mediante la acción de enzimas importadas desde el citosol y codificadas por genes nucleares. Al igual que el resto de los isoprenoides, los carotenoides se sintetizan a partir de los precursores de 5-carbonos isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) (Bouvier, Rahier y Camara, 2005; Cazzonelli y Pogson, 2010). Las plantas contienen dos vías metabólicas para la síntesis de IPP y DMAPP, la vía del mevalonato (MVA) localizada en el citosol-retículo endoplasmático y la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) localizada en los plástidos (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Hemmerlin, Harwood y Bach, 2012; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2013). En el caso particular de los cromoplastos del fruto del tomate, se ha descrito que los carotenoides se sintetizan de forma mayoritaria a partir de IPP y DMAPP sintetizado por la vía del MEP (Enfissi *et al.*, 2005; Rodríguez-Concepción, 2010). La adición secuencial de tres moléculas de IPP al DMAPP, catalizada por la enzima geranylgeranyl difosfato (GGPP) sintasa (GGPS), resulta en la formación de GGPP (compuesto de 20 átomos de carbono). El primer paso específico de la carotenogénesis es la conversión de GGPP en fitoeno (15-*cis*-fitoeno), un intermedio no coloreado de 40 átomos de carbono, en el estroma plástidico (figura 1). Esta reacción, catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) constituye una de las principales etapas limitantes en la biosíntesis de carotenoides (Fraser *et al.*, 2002; Cazzonelli y Pogson, 2010). El mutante *yellow-flesh* (*r*), que produce frutos con el pericarpo amarillento debido a la falta de acumulación de carotenoides, está afectado en el gen que codifica para la isoforma PSY1 (Fray y Grierson, 1993)



**FIGURA 1.** Representación esquemática de la biosíntesis de carotenoides en el fruto del tomate. Los carotenoides presentes en cantidades muy bajas en el fruto, pero relativamente abundantes en los tejidos vegetativos de la planta, se indican en color gris. El grosor de las flechas refleja de forma aproximada la expresión y actividad de las enzimas implicadas. Abreviaturas: GGPS, geranylgeranyl difosfato sintasa; PSY1, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; PTOX, oxidasa terminal plastídica; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CrtISO, caroteno isomerasa; ZISO, ζ-caroteno isomerasa; LCY-B2, licopeno β-ciclasa específica de cromoplastos; LCY-E, licopeno ε-ciclasa; CHY, caroteno hidroxilasa; VDE, violaxantina de-epoxidase; ZEP, zeaxantina epoxidase.

y cuya expresión se induce fuertemente al inicio del proceso de la maduración (Giorio, Stigliani y D'Ambrosio, 2008). Se ha descrito recientemente que el factor de transcripción RIPENING-INHIBITOR (RIN) interacciona con la región promotora del gen PSY1 para activar su expresión (Martel *et al.*, 2011). De acuerdo con su papel regulador en la síntesis de carotenoides, la sobreexpresión de PSY1 resulta en un incremento del contenido de licopeno y β-caroteno en el fruto (Fraser *et al.*, 2007). El fitoeno se convierte posteriormente (todo-*E*-licopeno mediante la acción secuencial de las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno desaturasa (ZDS) y caroteno isomerasa (CrtISO) (Figura 46). La oxidasa plastídica terminal (PTOX) participa en el proceso de desaturación del fitoeno catalizado por la PDS transfiriendo electrones al oxígeno y utilizando la plastoquinona como intermediario (Carol y Kuntz, 2001). Los mutantes *ghost* (*gh*), defectivos en PTOX, muestran frutos amarillentos debido a los bajos niveles de licopeno sintetizados (Barr *et al.*, 2004). Los mutantes *gh* están también afectados en la síntesis de carotenoides en otros tejidos de la planta. La caracterización del mutante *tangerine* (*t*), que presenta frutos de color anaranjado, permitió aislar el gen *crtISO*, el cual codifica para una enzima que cataliza las etapas de isomerización necesarias para transformar el poli-*cis*-licopeno sintetizado por la ZDS en (todo-*trans*)-licopeno (Isaacson *et al.*, 2002). Estudios recientes indican que el proceso de conversión del ζ-caroteno en licopeno implicaría también la participación de una ζ-caroteno isomerasa (ZISO) y de dos enzimas CrtISO-like. Se ha propuesto también que CrtISO y ZISO podrían formar complejos enzimáticos con PDS y ZDS respectivamente (Fantini *et al.*, 2013)

El licopeno puede ser convertido en α-caroteno y β-caroteno por la acción de la ε-licopeno ciclasa (LCY-E) y la β-licopeno ciclasa (LCY-B) respectivamente. A partir de estos

compuestos, la hidroxilación de los anillos del  $\beta$ -caroteno conduce a la formación de zeaxantina y violaxantina, mientras que la hidroxilación de los anillos del  $\alpha$ -caroteno resulta en la formación de luteína (figura 1) (Cazzonelli y Pogson, 2010). El tomate contiene dos genes que codifican para LCY-B, LCY-B1(CRTL-B) y LCY-B2 (CYC-B). La expresión de LCY-B2 se induce de forma transitoria en las primeras etapas de la maduración del fruto (Ronen *et al.*, 2000). El gen LCY-B2 fue identificado en el mutante *Beta* ( $\beta$ ), que presenta niveles elevados de  $\beta$ -caroteno en el fruto. Los frutos del mutante *old-gold* (*og*), defectivo en LCY-B2, muestra un color rojo muy intenso debido al incremento de los niveles de licopeno combinado con la ausencia de  $\beta$ -caroteno (Ronen *et al.*, 2000).

Al inicio de la maduración del fruto del tomate (cuando la coloración naranja-roja ya es aparente) se empiezan a sintetizar carotenoides de forma muy activa, y el licopeno es el que se acumula de forma mayoritaria en el fruto maduro (Fraser *et al.*, 1994). La acumulación del licopeno en el fruto del tomate se produce como consecuencia de la intensa activación de la expresión de los genes que codifican para PSY1 y PDS asociada a una fuerte disminución de la expresión de las ciclasas que actúan sobre el licopeno (LCY-E y LCY-B1) (Hirschberg, 2001). El  $\beta$ -caroteno presente en el fruto maduro estaría asociado a la expresión transitoria de gen LCY-B2 durante las primeras etapas del proceso de maduración. El inicio de la biosíntesis de carotenoides en el fruto se correlaciona con la inducción de genes que codifican enzimas reguladoras de la vía del MEP, como la desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (isoforma DXS1) y la hidroximetilbutenil difosfato reductasa (Lois *et al.*, 2000; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Paetzold *et al.*, 2010; Rodríguez-Concepción, 2010). Plantas transgénicas que sobre-expresan la DXS de *E. coli* dirigida a los plastos muestran niveles incrementados de carotenoides

en el fruto. Eso indica que el aporte de IPP y DMAPP a través de la vía del MEP es un factor limitante en la biosíntesis de carotenoides en los cromoplastos (Enfissi *et al.*, 2005).

Ciertos aspectos relacionados con los mecanismos que regulan la síntesis y acumulación de carotenoides en el fruto se han puesto de manifiesto a partir de la caracterización de mutantes que muestran niveles alterados de carotenoides. De especial relevancia ha sido el análisis molecular de los mutantes *high pigment* (*hp1*, *hp2* y *hp3*) que presentan niveles elevados de carotenoides tanto en las hojas como en los frutos. El mutante *hp2*, que se caracteriza por una elevada acumulación de carotenoides y otras moléculas, como flavonoides y vitaminas C y E, mostró estar afectado en la expresión del gen DE-ETIOLATED (*DET1*), que codifica para un regulador negativo de la fotomorfogénesis (Mustilli *et al.*, 1999). La supresión específica de DET1 en el fruto resulta en un aumento significativo de los niveles de carotenoides y flavonoides sin afectar otros parámetros (Davuluri *et al.*, 2005). Estudios posteriores mostraron que los elevados niveles de carotenoides observados en las líneas defectivas en DET1 no se deben a cambios en la expresión de genes relacionados con su biosíntesis sino a la alteración de ciertos parámetros relacionados con características de los plástidos (Enfissi *et al.*, 2010). Los mutantes *hp2* y *hp3* están afectados en los genes UV-DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1 (DDB1) y ZEP (que codifica para zeaxantina epoxidasa) respectivamente (Lieberman *et al.*, 2004; Galpaz *et al.*, 2008). El análisis molecular de los mutantes *hp1* y *hp3* ha puesto de manifiesto que su elevado contenido de carotenoides está mayoritariamente asociado al incremento del número y tamaño de los plástidos (Cookson *et al.*, 2003; Galpaz *et al.*, 2008). De forma similar a *hp2*, el incremento del contenido de carotenoides en los mutantes *hp1* y *hp3* tampoco está

asociado a la expresión de genes carotenogénicos. No obstante, en el caso del mutante *hp1* se ha observado un aumento de la actividad PSY en el fruto (Cookson *et al.*, 2003). El mutante *green-flesh (gf)* presenta frutos de color verde rojizo debido a la presencia simultánea de cloroplastos que contienen clorofilas y cromoplastos ricos en carotenoides. La mutación *gf* se debe a la afectación de la funcionalidad de la proteína STAY GREEN (SGR) (Barry *et al.*, 2008). SGR es una proteína plastídica implicada en la degradación de la clorofila en hojas y frutos. El silenciamiento del gen SGR1 en el fruto genera un gran aumento del contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno asociado al incremento de la expresión del gen PSY1 (Luo *et al.*, 2013). Se ha determinado que SGR1 interacciona con la PSY1 *in vivo* y que modula negativamente su actividad (Luo *et al.*, 2013). También se ha descrito que la sobre-expresión del gen ARABIDOPSIS PSEUDO RESPONSE REGULATOR2-LIKE (APRR2-Like) resulta en un aumento del área y del número de plastos asociado al incremento del contenido de clorofila en los frutos verdes y de carotenoides en los frutos maduros (Pan *et al.*, 2013).

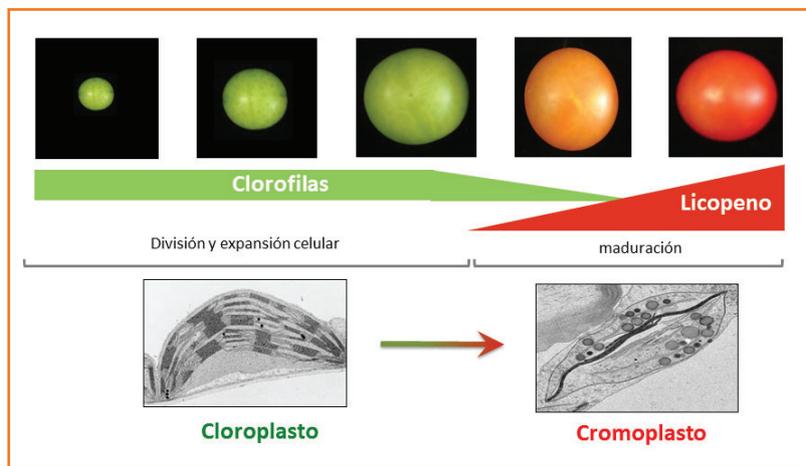
La biosíntesis y acumulación de carotenoides en el fruto del tomate está muy influida por diversos factores ambientales y hormonales, los cuales pueden interactuar entre sí de forma coordinada. Entre los factores ambientales destaca la intensidad de la luz (Alba, Cordonnier-Pratt y Pratt, 2000; Schofield y Paliyath, 2005; Giliberto *et al.*, 2005) y situaciones de estrés moderado, como el estrés oxidativo (Cocaliadis *et al.*, 2014), la temperatura (Lurie *et al.*, 1996) o los niveles elevados de CO<sub>2</sub> (Zhang *et al.*, 2014). Entre las hormonas implicadas en el desarrollo y maduración del fruto están el etileno, las auxinas, el ácido abscísico, el ácido jasmónico y los brasinoesteroides. Los mecanismos implicados en la síntesis, señalización y control de la expresión génica mediada por dichas hormonas

se han estudiado de forma muy extensa y aparecen en excelentes revisiones recientes (Klee y Giovannoni, 2011; Seymour *et al.*, 2013; Karlova *et al.*, 2014).

## LOS CROMOPLASTOS Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES

Los cromoplastos son plástidos especializados en la síntesis y acumulación de carotenoides. Se encuentran generalmente en frutos, flores, semillas y raíces y se originan a partir de otros tipos de plástidos, como proplástidos, cloroplastos, leucoplastos o amiloplastos (Li y Yuan, 2013). Los cromoplastos muestran una gran diversidad morfológica y se han clasificado en diferentes tipos según su forma y el tipo de estructuras suborganulares que presentan (Camara *et al.*, 1995). Los cromoplastos del fruto del tomate son de tipo cristalino y difieren de los del fruto del pimiento (tipo globular) y de los de las flores de *Narcissus* (tipo membranoso) (Camara *et al.*, 1995), dos de los tipos de cromoplastos mejor estudiados. La diversidad morfológica de los cromoplastos está posiblemente relacionada con la gran variedad de niveles y perfiles de carotenoides que se acumulan en ciertos tejidos particulares de las plantas.

La diferenciación de los cromoplastos está asociada a la síntesis activa de carotenoides y a una extensa reorganización del sistema membranoso interno de los plástidos de los cuales derivan (figura 2). Dicha reorganización está posiblemente relacionada con la formación de las estructuras implicadas en el almacenamiento de los carotenoides sintetizados de forma masiva en dichos orgánulos. El análisis de frutos de plantas transgénicas de tomate con contenidos modificados



**FIGURA 2.** Principales procesos durante el desarrollo y maduración del fruto.

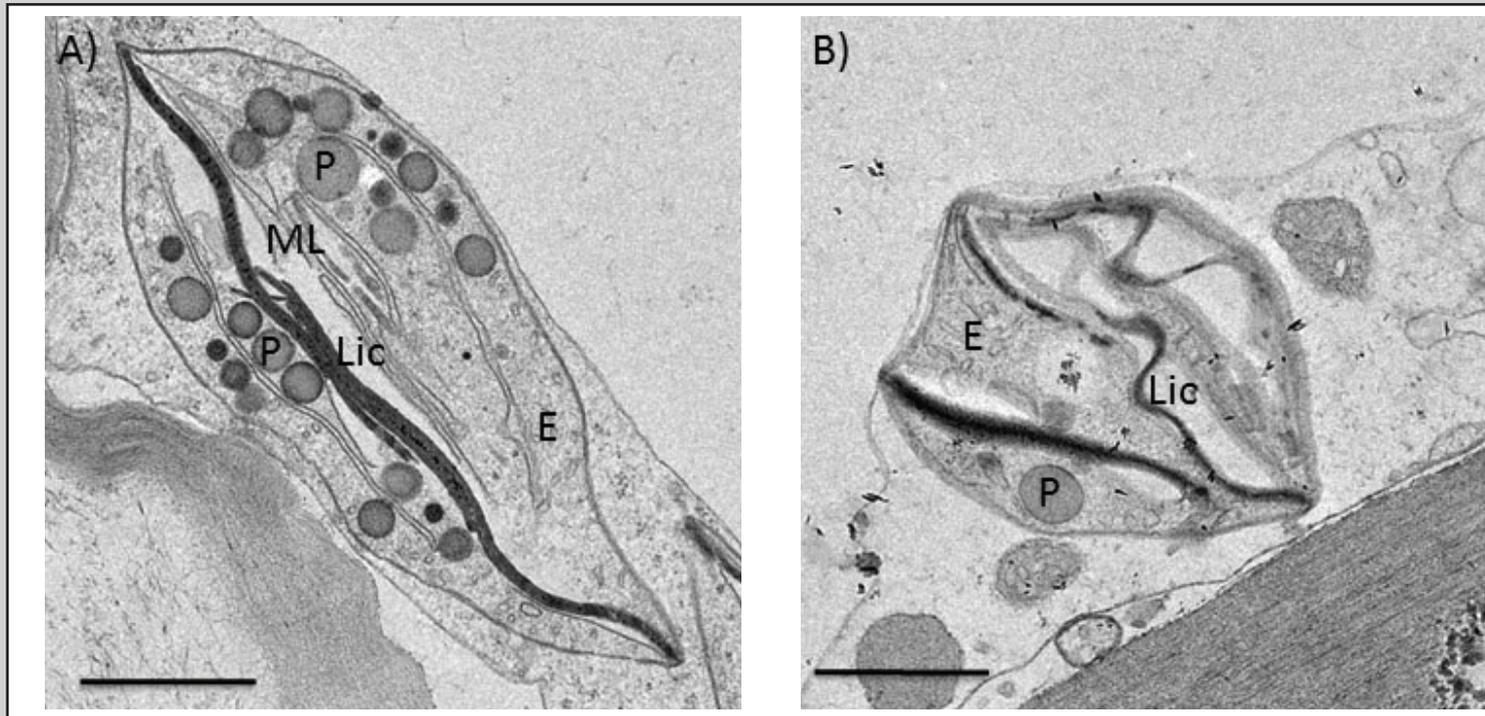
de licopeno y  $\beta$ -caroteno sugiere que las estructuras suborganelares de los cromoplastos se pueden adaptar para facilitar el almacenamiento de los intermediarios y los carotenoides sintetizados (Nogueira *et al.*, 2013).

En el fruto del tomate, los cromoplastos se generan a partir de los cloroplastos fotosintéticamente activos presentes en el fruto verde (Bathgate *et al.*, 1985). Este proceso de diferenciación comporta la desaparición de las membranas tilacoidales y la formación de nuevas estructuras suborganelares cuyo papel no ha sido definido con detalle. La estructuras más prominentes presentes en los cromoplastos del fruto de tomate incluyen plastoglobulos de gran tamaño asociados a un extenso sistema membranoso lamelar y largos filamentos osmiofílicos descritos como estructuras de almacenamiento de licopeno en forma cristalina (Rosso, 1968; Harris y Spurr, 1969) (figura 3).

Desde hace tiempo se sabe que los cromoplastos acumulan proteínas sintetizadas *de novo*. Esto indica que la diferenciación de los cloroplastos a cromoplastos constituye un proceso de desarrollo activo y no un mero proceso de senescencia (Bathgate *et al.*, 1985; Lawrence, Cline y Moore, 1993). En la actualidad se conoce relativamente poco sobre las señales y los procesos implicados en la biogénesis de los cromoplastos (Li y Yuan, 2013).

Los cloroplastos del fruto verde son fotosintéticamente activos y capaces de producir ATP y NADPH que pueden ser utilizados para la fijación del  $\text{CO}_2$  y procesos anabólicos (Batz, Scheibe y Neuhaus, 1992). Durante el proceso de diferenciación de los cromoplastos se degradan las clorofilas y, por lo tanto, se pierde la capacidad de producir ATP y NADPH asociadas a la fotosíntesis. Además, se genera una demanda creciente de carbohidratos exógenos para las distintas reacciones anabólicas que tienen lugar en los cromoplastos. De forma parecida se debe activar un mecanismo de aporte alternativo de ATP, ya sea mediante su importación desde el citosol o a través de su producción endógena.

La síntesis de carotenoides requiere el aporte de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (los precursores metabólicos de la vía del MEP) y de una importante provisión de energía (ATP) y poder reductor (NADPH). El origen del piruvato y del gliceraldehído 3-fosfato utilizados en la síntesis de carotenoides en los cromoplastos no se conoce con detalle. Estudios realizados en cloroplastos y cromoplastos aislados de fruto de pimiento han puesto de manifiesto la presencia de todas las actividades enzimáticas requeridas para la conversión de la glucosa en piruvato a través de la glucólisis (Thom *et al.*, 1998). No obstante, los bajos niveles de actividad de la fosfoglicerato mutasa y la enolasa han llevado a sugerir que, de forma similar



**FIGURA 3.** Cromoplastos en desarrollo de fruto de tomate (var. Moneymaker), imagen tomada con microscopio electrónico. E, estroma; P, plastoglobulos; ML, membranas laminares: CL, estructuras membranosas que contienen licopeno; a) sección longitudinal, b) sección transversal. Barra de escala = 1μm

a otros plástidos, el flujo de carbono hacia la parte inferior de la glucólisis estaría limitado. En consecuencia, se ha propuesto que los metabolitos de la parte baja de la glucólisis podrían ser aportados directamente desde el citosol (Thom *et al.*, 1998). En este sentido, es posible que ciertos transportadores de membrana descritos en otros plástidos no fotosintéticos pudieran participar en dicho proceso (Fischer y Weber, 2002; Weber, 2004). Estudios de incorporación de precursores marcados con  $^{14}\text{C}$  utilizando un sistema de cromoplastos aislados de fruto de tomate han mostrado que se pueden incorporar diversos intermediarios metabólicos de forma

eficiente a carotenoides (Angaman *et al.*, 2012). Entre dichos compuestos destaca el malato, un metabolito muy abundante en el fruto que puede ser convertido directamente en piruvato por la acción de la enzima málica presente en los cromoplastos (Angaman *et al.*, 2012). La relevancia del metabolismo del malato en la maduración del fruto del tomate la pusieron de manifiesto Centeno *et al.* (2011) y Osorio *et al.* (2013).

Como se ha indicado antes, la diferenciación de los cromoplastos comporta la desaparición de las membranas tilacoidales y la formación de un nuevo sistema membranosos

y vesicular en cuyo entorno tiene lugar la biosíntesis y el almacenamiento de los carotenoides sintetizados *de novo*. La biogénesis de las membranas de los cromoplastos ha sido estudiada en flores de *Narcissus*. En este caso, los ácidos grasos utilizados para la formación de las nuevas membranas plastídicas son sintetizados *de novo* dentro de los cromoplastos (Kleinig y Liedvogel, 1978, 1980). Se ha descrito recientemente que la síntesis de lípidos de membrana es también un proceso muy activo en los cromoplastos de tomate (Angaman *et al.*, 2012). Dado que la primera etapa de la biosíntesis de ácidos grasos es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa en los plástidos, la biosíntesis de los carotenoides y la de los ácidos grasos en los cromoplastos podrían competir tanto por la disponibilidad del piruvato (el precursor del acetil-CoA) como del ATP y del NADPH requeridos en ambos procesos.

Los recientes análisis proteómicos relacionados con la diferenciación de los cromoplastos durante la maduración del fruto han proporcionado una visión general de la variedad de procesos bioquímicos y metabólicos asociados a dicho proceso. Entre ellos destaca la fuerte disminución de proteínas relacionadas con la fotosíntesis, el ciclo de Calvin, la fotorrespiración y el metabolismo de los hidratos de carbono. Además del aumento de las proteínas relacionadas con la biosíntesis de isoprenoides (incluyendo los carotenoides) destaca la presencia de numerosas proteínas asociadas con la respuesta a estrés (ciclo ascorbato-glutatión, estrés abiótico, redox y choque térmico). Es también de resaltar la presencia de transportadores de membrana y de proteínas implicadas en el suministro de energía (Barsan *et al.*, 2010, 2012).

En las células heterotróficas, la mayor parte del ATP se sintetiza

en la mitocondria. Posteriormente se transporta al citosol y, desde allí, a los diversos orgánulos celulares. Se ha descrito recientemente que los cromoplastos son capaces de sintetizar ATP *de novo* a través de un proceso respiratorio que utiliza NADPH como donador de electrones (Pateraki *et al.*, 2013). Dicha síntesis de ATP implica la participación del complejo de la ATP sintasa plastídica que contiene un nuevo tipo de subunidad  $\gamma$  que se induce durante la maduración del fruto. Dicha subunidad se caracteriza por la ausencia del dominio ditiol presente en la subunidad  $\gamma$  de los cloroplastos, hecho que posiblemente le confiere una regulación diferencial (Pateraki *et al.*, 2013).

Consistente con su papel en la biosíntesis de carotenoides, durante la maduración del fruto se produce un incremento en la expresión de PTOX de forma paralela a la diferenciación de los cromoplastos (Josse *et al.*, 2000). Se conoce que la PTOX es inhibida por los análogos de pirogalol, especialmente por el octil galato (Ogal). Recientemente se ha descrito que la actividad respiratoria (consumo de oxígeno) de los cromoplastos se estimula por NADH y NADPH y es sensible a Ogal (Renato *et al.*, 2014). Además, la tasa de síntesis de ATP de los cromoplastos de tomate dependiente de NAD(P)H es completamente inhibida por Ogal. El hecho de que la síntesis de ATP también se inhiba por la acción de agentes desacoplantes de la translocación de protones sugiere la participación de un gradiente quimiosmótico asociado a dicho proceso (Renato *et al.*, 2014).

El Ogal afecta también la respiración y los niveles de ATP en muestras de pericarpo de fruto maduro. Así, mientras que el consumo de oxígeno de muestras de hoja y de pericarpo de fruto verde no se ven afectados por Ogal, este compuesto induce una fuerte disminución de la respiración en muestras de

pericarpo de fruto maduro (hasta 26%). Del mismo modo, Ogal causa una disminución significativa en el contenido de ATP en muestras de pericarpo de fruto maduro. Es de resaltar que el número de mitocondrias energizadas se reduce mucho durante la maduración del fruto. Todo ello indica que la contribución de los cromoplastos a la respiración total de fruto aumenta en las etapas avanzadas del proceso de maduración (Renato *et al.*, 2014).

## PAPEL DE LOS PLASTOGLÓBULOS Y OTRAS ESTRUCTURAS SUBORGANELARES EN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES

Los plastoglóbulos son partículas lipoproteicas presentes en los plástidos que han recibido un interés creciente en los últimos años al descubrirse que contienen enzimas implicadas en la síntesis de isoprenoides, como tocoferoles y carotenoides (Brehelin, Kessler y Van Wijk, 2007; Brehelin y Kessler, 2008). Si bien los plastoglóbulos de los cloroplastos se han estudiado con cierto detalle, tanto a nivel estructural como funcional, el conocimiento que se tiene de los plastoglóbulos de los cromoplastos es mucho menor. Se ha descrito que los plastoglóbulos aislados de cromoplastos de ciertas plantas contienen triglicéridos,  $\beta$ -caroteno y ésteres de carotenoides, y se ha sugerido por lo tanto un papel funcional en el almacenamiento de lípidos y carotenoides (Vishnevetsky, Ovadis y Vainstein, 1999; Steinmuller y Tevini, 1985). En el caso de tomate se ha descrito que los plastoglóbulos aislados del fruto maduro muestran autofluorescencia a 488 nm, lo cual indicaría la presencia de carotenoides en dichas estructuras suborganelares (Kilambi *et al.*, 2013). El análisis proteómico de plastoglóbulos aislados de cromoplastos de pimiento ha puesto

de manifiesto la presencia de las enzimas carotenogénicas ZDS, LYC-B y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (Ytterberg, Peltier y Van Wijk, 2006). Estos resultados sugieren un papel activo de los plastoglóbulos en la biosíntesis de carotenoides de forma adicional a su posible función de almacenamiento. No obstante, la gran diversidad estructural de los cromoplastos de las plantas hace que esta observación no se pueda generalizar a los distintos tipos de cromoplastos. Como se ha indicado antes, los cromoplastos del tomate son de tipo cristalino, por lo cual es posible que los plastoglóbulos no tengan un papel muy relevante en la acumulación de licopeno, ya que éste se almacenaría en su mayoría en forma de estructuras membranosas de aspecto semicristalino (figura 3). Sin embargo, estudios recientes basados en el subfraccionamiento de cromoplastos de fruto de tomate en gradientes de densidad han sugerido que los plastoglóbulos podrían contener cristales de licopeno (Nogueira *et al.*, 2013). Es posible, no obstante, que la resolución de los gradientes de densidad utilizados en dichos estudios, no permitan una separación eficiente de los plastoglóbulos y los cristales de licopeno.

En los cloroplastos, se ha descrito que los plastoglóbulos se forman a partir de los grana tilacoidales. El número y tamaño de los plastoglóbulos está influido por diversos factores, entre ellos la activación del metabolismo lipídico (Austin *et al.*, 2006) y el estrés, senescencia o mutaciones que impiden la formación de los tilacoides (Brehelin, Kessler y Van Wijk, 2007; Singh y McNellis, 2011). Los plastoglóbulos se componen de una hemimembrana recubierta de proteínas que envuelve un núcleo lipídico hidrofóbico (Brehelin y Kessler, 2008). En los cloroplastos, los plastoglóbulos se hallan con frecuencia unidos a los tilacoides a través de la hemicapa lipídica que los rodea. Durante la senescencia o en condiciones de estrés oxidativo se han observado agrupaciones de plastoglóbulos

que permanecen unidos entre sí mediante extensiones de la hemicapa lipídica que los envuelve. Eso ha sugerido que el contenido de los plastoglóbulos puede estar en equilibrio dinámico con los lípidos de los tilacoides (Austin *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis*, las proteínas presentes en los plastoglóbulos se han podido identificar mediante aproximaciones proteómicas (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006). Estudios posteriores han confirmado que las proteínas pertenecientes a la familia de las fibrilinas (denominadas también plastoglobulinas, *plastid-lipid associated proteins* o *chromoplast-associated carotenoid-binding proteins*) están entre las proteínas mayoritarias (Lundquist *et al.*, 2012). Se ha propuesto que las fibrilinas pueden participar en la formación de estructuras plastídicas que se han relacionado con la acumulación de pigmentos debido posiblemente a su función como sumidero. Pese a no observarse la generación de nuevas estructuras sumidero, la sobreexpresión de la fibrilina CHRC de pimiento en el tomate resulta en un incremento del contenido total de carotenoides en el fruto, lo que indica que estas proteínas podrían tener un papel relevante en la acumulación

de carotenoides (Simkin *et al.*, 2007). En este sentido se ha descrito recientemente que los mutantes *hp1* y *hp2* muestran niveles incrementados de la fibrilina CHRC (Kilambi *et al.*, 2013). Todo ello indicaría que las fibrilinas contribuyen de forma importante al almacenamiento de los carotenoides en los cromoplastos.

En la actualidad se desconoce la función de la mayoría de los compartimentos y estructuras suborganelares presentes en los cromoplastos. Por eso sería de interés combinar el uso de técnicas de perfilado metabólico y proteómico con técnicas de fraccionamiento que permitieran separar el conjunto de los sistemas membranosos y vesiculares presentes en los cromoplastos. Con base en los distintos procesos bioquímicos y metabólicos actualmente identificados en los cromoplastos, se podrían abordar también estudios de inmunocitoquímica con anticuerpos que reconocieran proteínas marcadoras de dichos procesos. Todo esto permitiría una mayor comprensión no sólo de la síntesis y acumulación de carotenoides en el fruto sino también del conjunto de procesos bioquímicos y metabólicos relacionados.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo de nuestro grupo ha sido financiado por los siguientes proyectos y ayudas: Red IBERCAROT (Programa CYTED, ref 112RT0445), BIO2011-23680, AGL2013-43522-R y 2014SGR-1434.

## REFERENCIAS

- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H. 2000. *Plant Physiology* 123: 363-370.
- Angaman, D.M., Petrizzo, R., Hernández-Gras, F., Romero-Segura, C., Pateraki, I., Busquets, M., Boronat, A. 2012. *Plant Methods* 8: 1.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F., Staehelin, L.A. 2006. *Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Barr, J., White, W.S., Chen, L., Bae, H., Rodermel, S. 2004. *Plant, Cell & Environment* 27: 840-852.
- Barry, C.S., McQuinn, R.P., Chung, M.Y., Besuden, A., Giovannoni, J.J. 2008. *Plant Physiology* 147: 179-187.
- Barsan, C., Sánchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., Zouine, M., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. 2010. *Journal of Experimental Botany* 61: 2413-2431.
- Barsan, C., Zouine, M., Maza, E., Bian, W., Egea, I., Rossignol, M., Bouyssie, D., Pichereaux, C., Purgatto, E., Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J. C. 2012. *Plant Physiology* 160: 708-725.
- Bathgate, B., Purton, M.E., Grierson, D., Goodenough, P.W. 1985. *Planta* 165: 197-204.
- Batz, O., Scheibe, R., Neuhaus, H.E. 1992. *Plant Physiology* 100: 184-190.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M. 2004. *Plant Journal* 40: 188-199.
- Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B. 2005. *Prog Lipid Res* 44: 357-429.
- Brehelin, C., Kessler, F., Van Wijk, K.J. 2007. 12: 260-266.
- Brehelin, C., Kessler, F. 2008. 84:1388-1394.
- Camara, B., Hugueney, P., Bouvier, F., Kuntz, M., Moneger, R. 1995. *International Review of Cytology* 163: 175-247.
- Carol, P., Kuntz, M. 2001. *Trends in Plant Science* 6: 31-36.
- Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J. 2010. *Trends in Plant Science* 15: 266-274.
- Centeno, D.C., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Bertolo, A.L., Carneiro, R.T., Araujo, W.L., Steinhauser, M.C., Michalska, J., Rohrmann, J., Geigenberger, P., Oliver, S.N., Stitt, M., Carrari, F., Rose, J.K., Fernie, A.R. 2011. *Plant Cell* 23: 162-184.
- Cocaliadis, M.F., Fernández-Muñoz, R., Pons, C., Orzaez, D., Granell, A. 2014. *Journal of Experimental Botany* 65: 4589-4598.
- Cookson, P.J., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Fraser, P.D., Romer, S., Schuch, W., Bramley, P.M., Pyke, K.A. 2003. *Planta* 217: 896-903.

## REFERENCIAS

- Davuluri, G.R., Van Tuinen, A., Fraser, P.D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P.M., Pennings, H.M., Bowler, C. 2005. *Nature Biotechnology* 23: 890-895.
- Enfissi, E.M., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W., Bramley, P.M. 2005. *Plant Biotechnology Journal* 3: 17-27.
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., Giuliano, G. 2013. *Plant Physiology* 163: 986-998.
- Fischer, K., Weber, A. 2002. *Trends in Plant Science* 7: 345-351.
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M. 1994. *Plant Physiology* 105: 405-413.
- Fraser, P.D., Romer, S., Sipton, C.A., Mills, P.B., Kiano, J.W., Misawa, N., Drake, R.G., Schuch, W., Bramley, P.M. 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1092-1097.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2004. *Prog Lipid Res* 43: 228-265.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P.M. 2007. *Plant Cell* 19: 3194-3211.
- Fray, R.G., Grierson, D. 1993. *Plant Molecular Biology* 22: 589-602.
- Fritz, H., Kennedy, D., Fergusson, D., Fernandes, R., Doucette, S., Cooley, K., Seely, A., Sagar, S., Wong, R., Seely, D. 2011. *PLoS One* 6: e21107.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D., Hirschberg, J. 2008. *Plant Journal* 53: 717-730.
- Giliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J.L., Fraser, P.D., Bramley, P.M., Fiore, A., Tavazza, M., Giuliano, G. 2005. *Plant Physiology* 137: 199-208.
- Giorio, G., Stigliani, A.L., D'Ambrosio, C. 2008. *FEBS Journal* 275: 527-535.
- Harris, W.M., Spurr, A.R. 1969. *Amer. J. Bot* 56: 380-389.
- Hemmerlin, A., Harwood, J.L., Bach, T.J. 2012. *Prog Lipid Res* 51: 95-148.
- Hirschberg, J. 2001. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210-218.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., Hirschberg, J. 2002. *Plant Cell* 14: 333-342.
- Josse, E.M., Simkin, A.J., Gaffe, J., Laboure, A.M., Kuntz, M., Carol, P. 2000. *Plant Physiology* 123 :1427-1436.
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G.C., Seymour, G.B., De Maagd, R.A. 2014. *Journal of Experimental Botany* 65: 4527-4541.
- Kilambi, H.V., Kumar, R., Sharma, R., Sreelakshmi, Y. 2013. *Plant Physiology* 161: 2085-2101.

## REFERENCIAS

- Klee, H.J., Giovannoni, J.J. 2011. *Annual Review of Genetics* 45: 41-59.
- Kleinig, H., Liedvogel, B. 1978. *European Journal of Biochemistry* 83: 499-505.
- Kleinig, H., Liedvogel, B. 1980. *Planta* 150: 166-169.
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J. 2005. *Mol Aspects Med* 26: 459-516.
- Lawrence, S.D., Cline, K., Moore, G.A. 1993. *Plant Physiology* 102: 789-794.
- Li, L., Yuan, H. 2013. *Arch Biochem Biophys* 539: 102-109.
- Lieberman, M., Segev, O., Gilboa, N., Lalazar, A., Levin, I. 2004. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1574-1581.
- Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. 2000. *Plant Journal* 22: 503-513.
- Lundquist, P.K., Poliakov, A., Bhuiyan, N.H., Zybailov, B., Sun, Q., Van Wijk, K.J. 2012. *Plant Physiology* 158: 1172-1192.
- Luo, Z., Zhang, J., Li, J., Yang, C., Wang, T., Ouyang, B., Li, H., Giovannoni, J., Ye, Z. 2013. *New Phytologist* 198: 442-452.
- Lurie, S., Handros, A., Fallik, E., Shapira, R. 1996. *Plant Physiology* 110: 1207-1214.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J.J. 2011. *Plant Physiology* 157: 1568-1579.
- Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2010. *Phytochemistry* 71: 1104-1114.
- Mustilli, A.C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F., Bowler, C. 1999. *Plant Cell* 11: 145-157.
- Nogueira, M., Mora, L., Enfissi, E.M., Bramley, P.M., Fraser, P.D. 2013. *Plant Cell* 25: 4560-4579.
- Osorio, S., Vallarino, J.G., Szecowka, M., Ufaz, S., Tzin, V., Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R. 2013. *Plant Physiology* 161: 628-643.
- Paetzold, H., Garms, S., Bartram, S., Wiczorek, J., Uros-Gracia, E.M., Rodríguez-Concepción, M., Boland, W., Strack, D., Hause, B., Walter, M.H. 2010. *Mol Plant* 3: 904-916.
- Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., Marshall, A., Jayasuta, S., Baxter, C., Van Wijk, R., Boyden, L., Cade, R., Chapman, N.H., Fraser, P.D., Hodgman, C., Seymour, G.B. 2013. *Plant Physiology* 161: 1476-1485.
- Pateraki, I., Renato, M., Azcon-Bieto, J., Boronat, A. 2013. *Plant Journal* 74: 74-85.

## REFERENCIAS

- Rao, A.V., Rao, L.G. 2007. *Pharmacological Research* 55: 207-216.
- Renato, M., Pateraki, I., Boronat, A., Azcon-Bieto, J. 2014. *Plant Physiology* 166: 920-933.
- Rodríguez-Concepción, M. 2010. *Arch Biochem Biophys* 504: 118-122.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. 2002. *Plant Physiology* 130: 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Ferrer, A., Boronat, A. 2013. En T.J. Bach y M. Rohmer (eds.). *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*. Nueva York: Springer. 439-456.
- Rohmer, M. 2008. *Lipids* 43: 1095-1107.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11102-11107.
- Rosso, S.W. 1968. *J Ultrastruct Res* 25: 307-322.
- Schofield, A., Paliyath, G. 2005. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 1052-1060.
- Seymour, G.B., Ostergaard, L., Chapman, N.H., Knapp, S., Martin, C. 2013. *Annual Review of Plant Biology* 64: 219-241.
- Simkin, A.J., Schwartz, S.H., Auldrige, M., Taylor, M.G., Klee, H. J. 2004. *Plant Journal* 40: 882-892.
- Simkin, A.J., Gaffe, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Kuntz, M. 2007. *Phytochemistry* 68: 1545-1556.
- Singh, D.K., McNellis, T.W. 2011. *Trends in Plant Science* 16: 432-441.
- Steinmuller, D., Tevini, M. 1985. *Planta* 163: 201-207.
- Thom, E., Möhlmann, T., Quick, W.P., Camara, B., Neuhaus, H.E. 1998. *Planta* 204: 226-233.
- Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dormann, P., Kessler, F., Brehelin, C. 2006. *Journal of Biological Chemistry* 281: 11225-11234.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Vainstein, A. 1999. *Trends in Plant Science* 4: 232-235.
- Vogel, J.T., Tieman, D.M., Sims, C.A., Odabasi, A.Z., Clark, D.G., Klee, H.J. 2010. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2233-2240.
- Von Lintig, J., Vogt, K. 2004. *Journal of Nutrition* 134: 251S-256S.
- Weber, A.P. 2004. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 247-253.
- Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Van Wijk, K.J. 2006. *Plant Physiology* 140: 984-997.
- Zhang, Z., Liu, L., Zhang, M., Zhang, Y., Wang, Q. 2014. *Food Chemistry* 153: 157-163.

# CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS: DIVERSIDAD Y BIOSÍNTESIS

Joanna Lado, Fabio A. Cuéllar, Lorenzo Zacarías, María Jesús Rodrigo



## DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS

El color es un atributo de calidad muy importante en los frutos cítricos, tanto para el consumo fresco, pues determina la aceptación del consumidor, como en la producción de zumos o jugos, ya que afecta directamente la calidad del producto final. El género *Citrus* se caracteriza por una amplia diversidad genética y la coloración del fruto es uno de los factores de variabilidad, ya que va desde el amarillo pálido del limón, pomelo blanco o pumelo, al naranja intenso característico de algunas mandarinas y naranjas, o incluso las tonalidades rosadas y rojizas de ciertos mutantes de naranjas, pomelos o toronjas y pumelos (Kato, 2012; Rodrigo *et al.*, 2013). Este amplio rango de coloraciones, tanto externa como interna, entre los frutos de las diferentes especies y variedades de cítricos se debe al contenido y composición de los carotenoides, así como a su distribución específica en el fruto. El perfil cualitativo de carotenoides en estos frutos puede llegar a ser muy complejo y se han descrito alrededor de

110 carotenoides diferentes en frutos del género *Citrus*, sin embargo, muchos de ellos son isómeros o artefactos generados en los procesos de extracción que se derivan de una veintena de carotenoides (Stewart y Wheaton, 1973).

En los frutos cítricos la mayoría de los carotenoides se acumulan en el epicarpio o flavedo, que es el tejido externo coloreado de la piel, mientras que el endocarpio o pulpa presenta concentraciones menores (Gross, 1987). Sin embargo, existen excepciones a esta norma general que se describen con detalle en los apartados correspondientes de este capítulo. En general, la mayoría de frutos cítricos cuando alcanzan su madurez comercial acumulan de forma predominante  $\beta,\beta$ -xantofilas (principalmente isómeros de violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina), aunque otros carotenos, como el fitoeno o el licopeno pueden llegar a detectarse en elevadas concentraciones en determinadas especies o variedades (Kato *et al.*, 2004). Con base en la composición y concentración de carotenoides en la piel y en las vesículas de zumo de más de

30 variedades de las especies más representativas, los frutos cítricos se han clasificado en cinco grupos representativos: pobres en carotenoides, muy ricos en fitoeno, muy ricos en violaxantina, ricos violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina y, por último, los que presentan grandes cantidades de fitoeno, violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina (Matsumoto *et al.*, 2007). Es interesante mencionar que en la mayoría de las especies y variedades la composición cualitativa de carotenoides es muy similar en la piel y en la pulpa, y las principales diferencias se deben a la concentración de los carotenoides individuales en ambos tejidos (Matsumoto *et al.*, 2007). Otros trabajos han sugerido que los contenidos de (9Z)-violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina permiten discriminar entre 25 variedades de frutos cítricos (Fanciullino *et al.*, 2006).

Una característica importante y distintiva de los carotenoides en los cítricos es la presencia de determinados apocarotenoides  $C_{30}$  en la piel de ciertas especies y variedades, principalmente naranjas y mandarinas (Farin, Ikan

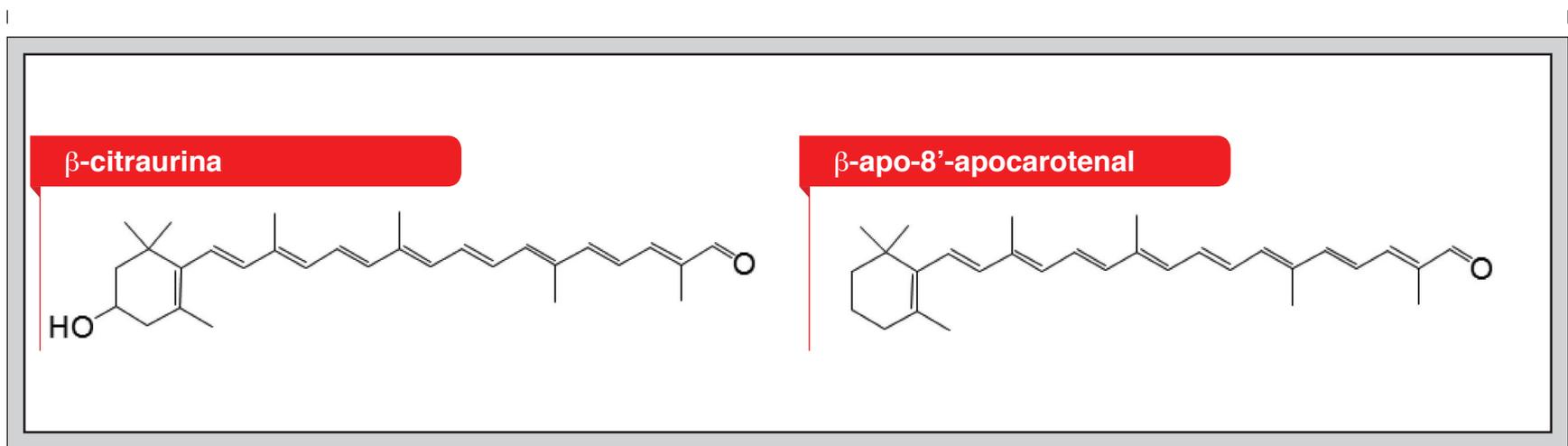


FIGURA 1. Estructuras químicas de  $\beta$ -citraurina y  $\beta$ -apo-8'-apocarotenal.

y Gross, 1983; Oberholster *et al.*, 2001). Estos apocarotenoides C<sub>30</sub>, mayoritariamente β-citraurina (3-hidroxi-β-apo-8'-carotenal) y β-apo-8'-carotenal (figura 1), son derivados del corte enzimático de β-criptoxantina y zeaxantina (Ma *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013a). Es de destacar que los apocarotenoides C<sub>30</sub>, que pueden llegar a ser 50% de los carotenoides totales en el flavedo de determinadas variedades de mandarinas y en menor proporción en naranjas, son responsables de la intensa coloración naranja-rojiza de algunas variedades y, por lo tanto, su concentración tiene un fuerte efecto en el color y la calidad externa del fruto (Ma *et al.*, 2013; Ríos *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2013a).

En los frutos cítricos maduros una elevada proporción de las xantofilas mono- o polihidroxiladas están esterificadas con ácidos grasos (Gross, 1987). El porcentaje de xantofilas esterificadas oscila entre más del 90% en la pulpa de naranjas y mandarinas hasta el 25% en los limones (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Giuffrida *et al.*, 2010). Los ácidos grasos más comúnmente identificados son el mirístico, laurico y palmítico (Gross, 1987; Giuffrida *et al.*, 2010). Se ha propuesto que la esterificación de las xantofilas facilita su acumulación de forma más estable en los plastoglobulos durante la acumulación masiva que tiene lugar en los tejidos del fruto, aunque actualmente se desconocen los mecanismos bioquímicos que conducen a la esterificación y su posible regulación a lo largo de la maduración.

## Naranjas

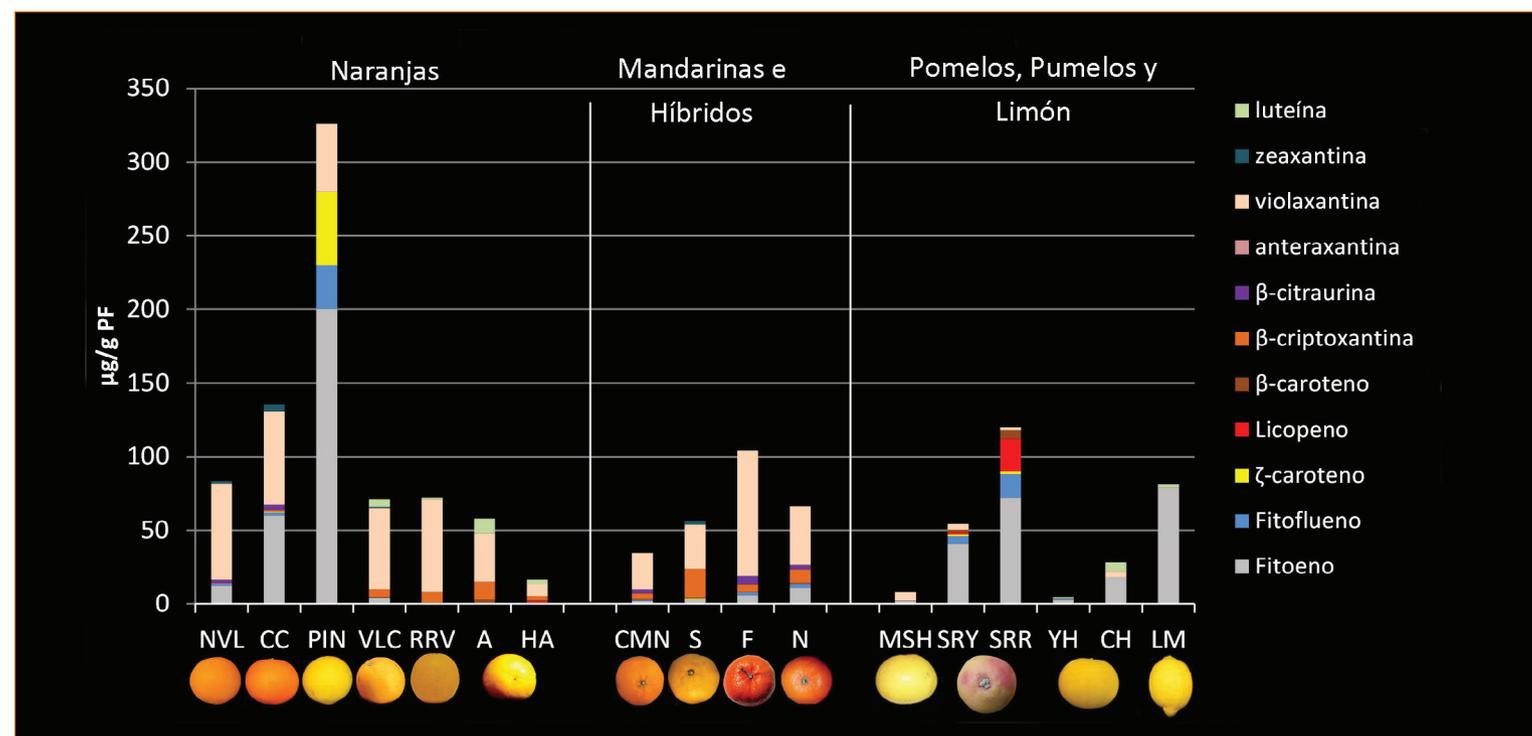
La coloración en los frutos maduros de esta especie (*Citrus sinensis*) se caracteriza por una tonalidad naranja, que cambia en función de la variedad y está determinada por factores genéticos (Fanciullino *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2007;

García-Lor *et al.*, 2012; 2013). El contenido de carotenoides en el flavedo de las naranjas varía entre 40 y 130 μg/g peso fresco (PF), mientras que en la pulpa es significativamente menor, entre 4 y 55 μg/g PF (figuras 2 y 3). La mayoría de los carotenoides en ambos tejidos corresponden a β,β-xantofilas, que representan alrededor de 90-98 % de los carotenoides presentes en algunas variedades (Kato *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2014; 2014a). Entre las xantofilas, la violaxantina es el carotenoide predominante en naranjas, mayoritariamente como (9Z)-violaxantina, tanto en la piel como en la pulpa, y representa entre 80 y 90% de los carotenoides totales (Kato *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2014). La violaxantina proporciona a los frutos un color amarillento y, por lo tanto, no es el único responsable de la coloración naranja típica de esta especie. La presencia de otros carotenoides con colores más anaranjados, como la xantofila β-criptoxantina y, especialmente el apocarotenoide C<sub>30</sub> β-citraurina, así como la proporción entre los carotenoides amarillos y naranjas (ej. violaxantina/β-citraurina), son factores determinantes de la intensidad de color y muestran una buena correlación con la coloración externa de los frutos. Se ha descrito que el ratio violaxantina/β-citraurina es menor en las naranjas del grupo Navel que en las Valencia (Oberholster *et al.*, 2001; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008), en concordancia con la coloración más pálida de estas últimas. En la pulpa, la intensidad de color naranja está más determinada por la presencia de otras β,β-xantofilas, como la anteraxantina, zeaxantina y, especialmente, β-criptoxantina. Es interesante mencionar un mutante espontáneo de naranja del grupo Valencia, denominado Rohde Red Valencia, que se caracteriza por una intensa coloración naranja de la pulpa que se ha asociado a un contenido seis veces mayor de β-criptoxantina respecto al parental Valencia (Wei *et al.*, 2014) (figura 2).

En diferentes variedades de naranjas se han identificado mutaciones espontáneas que generan una tonalidad roja en la pulpa, debido principalmente a la acumulación del caroteno rojo licopeno. La presencia de licopeno en frutos cítricos es una característica muy inusual que hasta la actualidad ha sido descrita únicamente en pocas variedades de naranja, y en varios mutantes de pomelos y pumelos. La primera descripción de la presencia de este caroteno en naranjas fue en 1961 por Monselise y Halevy en una mutación espontánea de la naranja Shamouti, denominada Shara, sin embargo no ha sido objeto de estudio en años posteriores. Más recientemente, se han descrito dos mutantes espontáneos de naranja: Cara Cara (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2008) y Hong Anliu (Liu *et al.*, 2007), que han sido objeto de investigaciones más intensas para conocer el origen de la acumulación de licopeno en la pulpa. La variedad Cara Cara es una mutación de la variedad Washington Navel descubierta en Venezuela, que presenta una tonalidad roja en la pulpa (Li, 2001; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008). Además de la presencia de licopeno en este tejido, también acumula cantidades importantes de fitoeno, fitoflueno y  $\beta$ -caroteno, en proporciones y concentraciones muy superiores a las del parental Navel (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2008). Por otro lado, la variedad Hong Anliu, originaria de China como una mutación de la naranja Anliu, presenta características muy similares a Cara Cara, aunque también acumula licopeno en el albedo, los segmentos y las vesículas de zumo, pero la abundancia de los carotenos lineales, fitoeno y fitoflueno es menor que en Cara Cara (Liu *et al.*, 2007), lo que sugiere que los procesos o mecanismos que provocan la alteración en la composición de carotenoides son diferentes entre Cara Cara y Hong Anliu. Por otro lado, se han descrito dos nuevos mutantes de naranja de pulpa de color rojo originarias de Sudáfrica, uno de ellos, denominado Kirkwood Red, procede del grupo de las Navel, mientras que el segundo,

Ruby Valencia, es el primero que se ha descrito derivado del grupo de las Blancas. Ambos mutantes se caracterizan por una alta acumulación de licopeno en la pulpa, además de los carotenos lineales fitoeno y fitoflueno (Cuéllar *et al.*, 2014). La disponibilidad de esta limitada colección de mutantes y la posibilidad de un análisis comparativo de la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, así como de otros estudios bioquímicos y estructurales, pueden proporcionar en el futuro importante información sobre los mecanismos bioquímicos y genéticos alterados en los mismos que dan lugar a la acumulación de licopeno, un carotenoide con importantes propiedades en la nutrición y salud humanas, en los frutos cítricos.

Otro mutante de naranja dulce con alteraciones en la acumulación de carotenoides es la naranja Pinalate, que se caracteriza por presentar una coloración amarillo pálido tanto en la piel como en la pulpa (Rodrigo *et al.*, 2003). Pinalate surgió como mutación espontánea a partir de la variedad Navelate en una parcela comercial de la región de Murcia (España). La coloración de los frutos maduros de Pinalate es muy similar a la de los pomelos blancos o limones, aunque su composición en carotenoides es muy distinta. Los frutos de Pinalate presentan una alta concentración de carotenoides totales, que alcanzar más de 300  $\mu\text{g/g}$  PF en el flavedo (figura 2), y más de 90% corresponde a fitoeno, fitoflueno y diversos isómeros de  $\zeta$ -caroteno, mientras que la concentración de  $\beta, \beta$ -xantofilas es muy reducida tanto en la piel como en la pulpa (figuras 2 y 3), lo que conlleva al color amarillento de piel y pulpa de los frutos. Estos resultados sugieren que la mutación ha podido afectar etapas metabólicas relacionadas con la desaturación de  $\zeta$ -caroteno (Rodrigo *et al.*, 2003). Como consecuencia de estas alteraciones, los tejidos de la piel y la pulpa son deficientes en la hormona ácido abscísico (ABA).



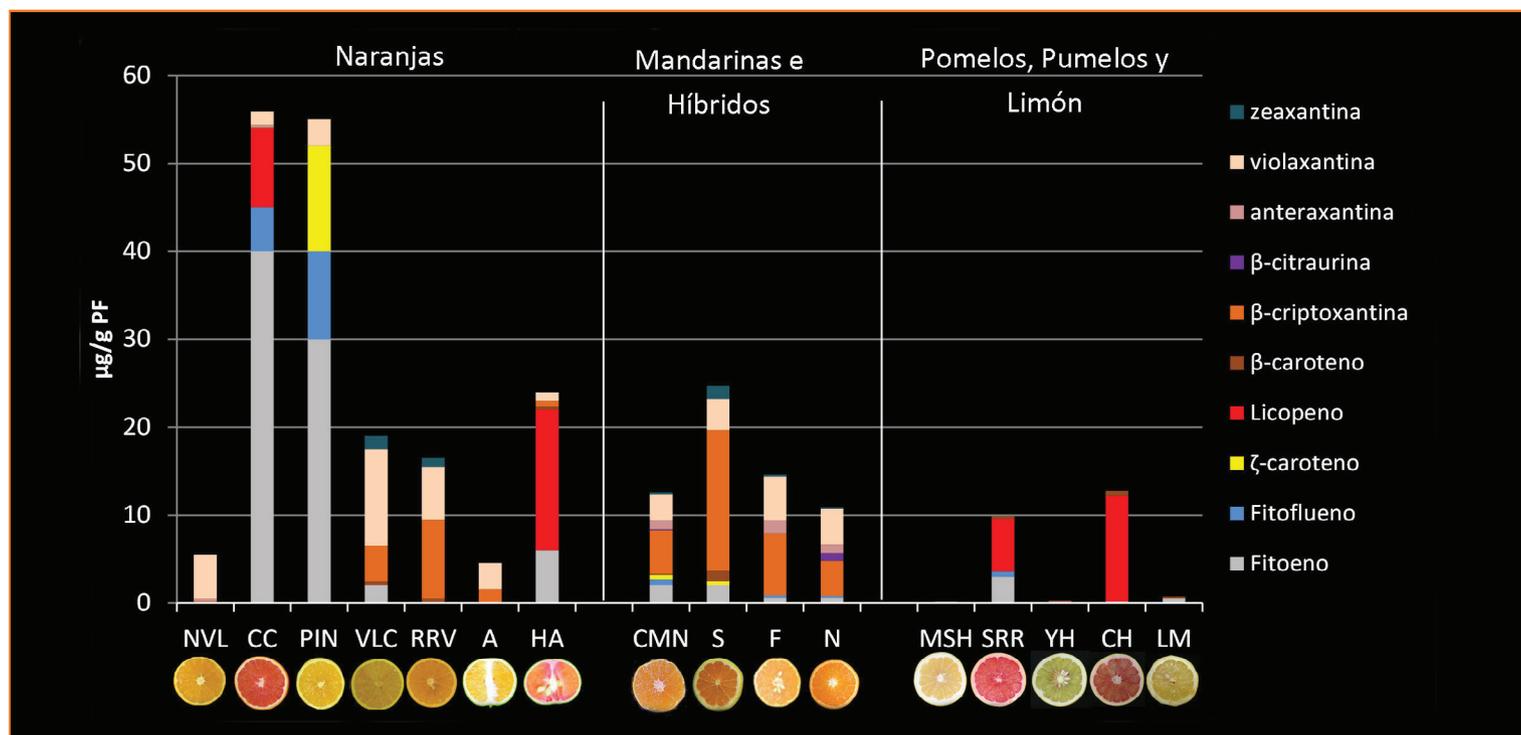
**FIGURA 2.** Contenido y composición de carotenoides en la piel de frutos de variedades representativas de las distintas especies de cítricos. Naranjas: NVL-Washington Navel; CC-Cara Cara; PIN-Pinalate; VLC-Valencia; RRV-Rohde Red Valencia; A-Anliu; HA-Hong Anliu. Mandarinas e híbridos: CMN-Clementina de Nules; S-Satsuma Okitsu; F-Fortuna, N-Nova o Clemenvilla. Pomelos: MSH-Marsh; SRY-Star Ruby zona amarilla de la piel; SRR-Star Ruby zona roja de la piel. Púmelos: YH-Yuhuan; CH-Cha. Limón: LM-Limón Lisbon.

Una de las características más interesantes de este mutante es que la alteración se manifiesta exclusivamente en los tejidos del fruto y, por lo tanto, la composición de carotenoides en otros órganos, como las hojas, es muy similar a la de la variedad parental.

### Mandarinas e híbridos

El grupo de las mandarinas incluye un gran número de especies, entre las que se encuentran *Citrus reticulata*, *Citrus*

*clementina*, *Citrus nobilis*, *Citrus deliciosa* y *Citrus unshiu*, así como sus diferentes híbridos, es muy heterogéneo y presenta una gran diversidad en la coloración de sus frutos (Goldenberg *et al.*, 2014). Al igual que en las naranjas, el contenido de carotenoides en mandarinas e híbridos es mayor en la piel que en la pulpa, los valores oscilan en el flavedo entre 25-100 µg/g PF, mientras que la pulpa acumula entre 10 y 40 µg/g PF, con importantes variaciones entre las especies y variedades que conforman este grupo heterogéneo (figuras 2 y 3). Las mandarinas se caracterizan por una coloración que varía



**FIGURA 3.** Contenido y composición de carotenoides en la pulpa de frutos de variedades representativas de las distintas especies de cítricos. Naranjas: NVL-Washington Navel; CC-Cara Cara; PIN-Pinalate; VLC-Valencia; RRV-Rohde Red Valencia; A-Anliu; HA-Hong Anliu. Mandarinas e híbridos: CMN-Clementina de Nules; S-Satsuma Okitsu; F-Fortuna, N-Nova o Clemenvilla. Pomelos: MSH-Marsh; SRR-Star Ruby zona amarilla de la piel; SRR-Star Ruby zona roja de la piel. Pumelos: YH-Yuhuan; CH-Chandler. Limón: LM-Limón Lisbon.

desde el naranja pálido de la piel de las satsumas, al naranja característico de las clementinas, o al naranja-rojizo intenso de los frutos de muchos híbridos. Esta gran variación de colores y tonalidades se ha asociado a diferencias importantes en el contenido y composición de los carotenoides. En un estudio reciente se han analizado los carotenoides en el zumo de 46 mandarinas y se ha observado que, el tangor Murcott, la satsuma Imamura y la mandarina King destacan por su elevado contenido de carotenoides (25 y 35 mg/mL de zumo), mientras que los menores contenidos los presentan el híbrido de

mandarina Fortuna y las mandarinas comunes, Odem y Dancy (3-7 mg/mL) (Goldenberg *et al.*, 2014).

La composición en carotenoides en la piel y la pulpa de mandarinas es compleja y, al igual que en los frutos de naranja, se han detectado más de 20 carotenoides diferentes, sin considerar isomerizaciones o reordenaciones en su estructura. Al igual que en las naranjas, las  $\beta,\beta$ -xantofilas son los principales carotenoides (68-90% de carotenoides totales) en este grupo. La presencia de (9Z)-violaxantina

es también importante, pero varía de forma notable entre especies y variedades, en las que se combina en diferentes proporciones con  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -citraurina en la piel del fruto, y con  $\beta$ -criptoxantina en la pulpa (Kato, 2012; Ma *et al.*, 2013; Rodrigo, Alquézar y Alós, 2013, 2013a). Así pues, la  $\beta$ -criptoxantina en el flavedo y la pulpa, y los apocarotenoides  $C_{30}$  en el flavedo, son compuestos especialmente relevantes en mandarinas y sus híbridos, y contribuyen directamente a la típica coloración de los frutos de este grupo de cítricos. En este sentido, la proporción relativa de  $\beta$ -citraurina, de coloración rojiza, y de  $\beta$ -criptoxantina, de color naranja intenso, determina la coloración de numerosas mandarinas, independientemente de la presencia de violaxantina, a pesar de que esta última representa más de la mitad de los carotenoides totales (Gross, 1987). También se han descrito variedades de mandarinas que presentan un retraso en el proceso de cambio de color, acumulan menores cantidades de carotenoides naranjas y rojizos, y conservan, por otro lado, durante un periodo más prolongado los carotenoides típicos de tejidos verdes (ej. luteína y  $\alpha$ -caroteno) (Alós *et al.*, 2013). Además, existen híbridos, como la variedad Tamami, originada por un cruce entre el tangor Kiyomi (*C. unshiu* x *C. sinensis*) y la mandarina Wilking (*C. nobilis* x *C. deliciosa*), que es capaz de acumular un total de 40  $\mu\text{g/g}$  PF de carotenoides en la pulpa, donde destacan el fitoeno (9-10  $\mu\text{g/g}$  PF), la violaxantina (5  $\mu\text{g/g}$  PF) y, sobre todo, el apocarotenoide  $\beta$ -citraurina (20  $\mu\text{g/g}$  PF), que le otorga un color naranja intenso a este tejido (Kato *et al.*, 2007; Kato, 2012).

## Limones

Los limones (*Citrus limon*) se caracterizan por una coloración amarilla típica en el flavedo y en la pulpa varía, en función de la variedad, de tonalidades verdosas al amarillo intenso. El perfil

de los carotenoides en limones maduros es más simple que en otras especies y está compuesto principalmente por carotenos lineales incoloros, como el fitoeno, que representa entre 80 y 90% del total de los carotenoides en la piel. Otros carotenoides detectados en la piel son luteína, fitoflueno y  $\beta$ -criptoxantina, aunque en cantidades significativamente menores (Kato *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2007; Kato, 2012). La pulpa presenta cantidades muy bajas de carotenoides, menores de 1  $\mu\text{g/g}$  PF en todas las variedades estudiadas (figuras 2 y 3).

## Pomelos o toronjas

### Pomelos y pumelos

Entre los pomelos (*Citrus paradisi* Macf.) existe una importante variabilidad en la coloración de la piel y la pulpa del fruto entre las diferentes variedades. En general, se clasifican en dos grandes grupos: los blancos, que presentan coloración amarillenta en piel y pulpa y, los rojos, con la pulpa de este color y que en determinadas variedades y condiciones ambientales también pueden presentar tonos rojos o rosados de diferente intensidad en el flavedo (figura 3). Los pomelos se caracterizan por ser la especie de cítricos en la que se han identificado mayor número de mutantes con pulpa de coloración roja o rosada (Gmitter, 1995; Xu *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2012; Alquézar *et al.*, 2013). Los pomelos amarillos, como es el caso de las variedades Marsh y Duncan, acumulan cantidades mínimas de carotenoides en la piel y la pulpa (menos de 4  $\mu\text{g/g}$  PF), identificándose principalmente carotenos lineales incoloros (fitoeno y fitoflueno) y violaxantina (Xu *et al.* 2006; Matsumoto *et al.*, 2007; Alquézar *et al.*, 2013; Lado, *et al.*, 2015). Por otro lado, mutaciones espontáneas o inducidas a partir de estos genotipos amarillos han originado variedades de pulpa rosada o roja, como es el caso de Flame o Ruby Red, derivados el pomelo Marsh; o Star Ruby, derivado

del pomelo blanco Walters. Las diferencias en la coloración en la pulpa se deben fundamentalmente a contenidos crecientes del caroteno licopeno, que se produce en combinación con la acumulación de los carotenos incoloros fitoeno y fitoflueno, y de  $\beta$ -caroteno (Alquézar *et al.*, 2013). Así pues, en los pomelos rojos o rosados, estos cuatro carotenoides representan más de 90% del total de estos pigmentos en la pulpa, mientras que en el flavedo también se detecta la presencia de  $\beta,\beta$ -xantofilas, principalmente violaxantina, aunque en cantidades sustancialmente menores que en naranjas y mandarinas. Algunas variedades de coloración rojo intenso en la pulpa, como Star Ruby o Rio Red, también desarrollan áreas de color rojo o rosado en la piel del fruto, que pueden ser más o menos extensas dependiendo de las condiciones ambientales, en donde se acumulan cantidades importantes de licopeno (Alquézar *et al.*, 2013; Lado *et al.*, 2015). En algunas variedades de pomelo rojo se ha descrito la presencia de licopeno en el albedo, tejido blanco esponjoso de la piel del fruto, que normalmente presenta cantidades mínimas de carotenoides (Xu *et al.*, 2006a).

Por otro lado, los pumelos o zamboa (*Citrus maxima* o *Citrus grandis*), una de las tres especies ancestrales de los cítricos, han sido menos estudiados, quizás debido a que su consumo y cultivo est  n restringidos a regiones del sudeste asiático y Malasia. Al igual que los pomelos, existen variedades blancas que han dado origen a rosadas o rosas. Las variedades blancas como Feicui, Goliath o Yuhuan acumulan principalmente fitoeno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta,\beta$ -xantofilas (violaxantina) y luteína durante la maduración, mientras que las variedades de pulpa rosada o roja, como el pomelo Chandler o el Chuzhou Early Red presentan una mayor cantidad de carotenoides totales en la piel, aunque con un perfil similar al de las variedades blancas (Xu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014).

Sin embargo, la característica principal en las variedades rojas radica en la acumulación de licopeno en la pulpa (50% de los carotenoides totales), la elevada proporción de  $\beta$ -caroteno y fitoeno (25%) y una muy baja presencia de xantofilas (<1 %) (Liu *et al.*, 2014). Este perfil en la distribución de carotenoides es similar al descrito en la pulpa de pomelo rojos y rosados, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación similares entre ambas especies.

## BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO DE CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS Y SU REGULACIÓN

Durante la última década se ha producido un avance considerable en la caracterización a nivel molecular y bioquímico de la ruta de biosíntesis de carotenoides en los cítricos, y se han identificado numerosos genes y sus correspondientes actividades enzimáticas, así como la caracterización funcional de muchos de ellos (Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008a; Kato 2012; Rodrigo *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios han correlacionado la evolución del contenido de carotenoides con el perfil transcripcional de los genes de biosíntesis (Alquézar *et al.*, 2008a; Kato, 2012; Rodrigo *et al.*, 2013). En los últimos años, el uso de diferentes aproximaciones ómicas (Pan *et al.*, 2009 y 2012; Xu *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2011), así como nuevas estrategias experimentales como el cultivo *in vitro* de vesículas de zumo (Zhang *et al.*, 2012a) o la generación de callos a partir de tejidos del fruto (Gao *et al.*, 2011), han ayudado a entender mejor los complejos mecanismos que conducen a la acumulación de estos pigmentos en la piel y la pulpa de los frutos cítricos.

La primera reacción de la ruta de biosíntesis de carotenoides

en los frutos cítricos corresponde a la enzima fitoeno sintasa (PSY). La PSY cataliza la reacción de condensación de dos moléculas de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) y determina la entrada de precursores en la ruta, por eso se considera que esta etapa es clave en el control de la acumulación de carotenoides en estos frutos. En cítricos se han aislado dos secuencias de PSY con una identidad de 97-99% a nivel de aminoácidos, considerándose, por lo tanto, dos alelos diferentes de un único gen *PSY* (Ikoma *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Fanciullino *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2014a). En general, el patrón de expresión de PSY en todos los frutos cítricos muestra una buena correlación con la acumulación de carotenoides totales a lo largo de la maduración del fruto y, tanto en el flavedo como en la pulpa, se produce una estimulación significativa de su expresión previa al cambio de color del fruto y a la máxima acumulación de carotenoides en los tejidos cromoplásticos (Kato *et al.*, 2004; Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004). Es de destacar que la acumulación de transcritos de PSY es significativamente menor en la pulpa que en el flavedo, de acuerdo con las diferencias en el contenido de carotenoides entre ambos tejidos (Tao *et al.*, 2007; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008a). Recientemente, se ha descrito tanto en naranja dulce como en pumelo, que existe una expresión diferencial de los dos alelos de PSY y que las proteínas correspondientes presentan distinta actividad *in vitro*, lo que sugiere un nivel adicional de regulación en esta etapa de la ruta (Zeng *et al.*, 2013).

El fitoeno, por medio de una desaturación catalizada por la fitoeno desaturasa (PDS), da lugar al fitoflueno. Diferentes trabajos han sugerido que el gen que codifica la PDS en cítricos pertenece a una pequeña familia génica (Kita *et al.*, 2001; Fanciullino *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2014a), a diferencia de la PDS de tomate o pimiento que poseen una única copia

en el genoma (Fraser y Bramley, 2004). Las secuencias de PDS de distintas variedades de cítricos presentan una identidad de 98-100% entre sí a nivel de aminoácidos. Ensayos *in vitro* indican que en la fracción soluble del plastidio se encuentran dos formas procesadas de PDS, mientras que otra forma sin procesar aparece en menor proporción asociada a la membrana (Inoue *et al.*, 2006). La expresión de PDS durante la maduración del fruto ha sido estudiada en diferentes variedades como naranja, mandarina, pomelo o limón, encontrándose en todos los casos que la acumulación de transcritos aumenta con la maduración del fruto tanto en el flavedo como en la pulpa (Kato *et al.*, 2004; Alquézar *et al.*, 2013).

La segunda desaturasa que actúa secuencialmente sobre el fitoflueno en la ruta de biosíntesis de carotenoides es la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS). En cítricos se han identificado hasta once miembros en el genoma de naranja (Chen *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014a), aunque su funcionalidad todavía no ha sido determinada. La acumulación del mRNA de ZDS aumenta progresivamente durante la maduración tanto en el flavedo como en la pulpa de naranja, mandarina y limón (Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008). Para la desaturación completa y correcta del fitoeno a licopeno se requiere la acción de una oxidasa plastídica terminal (PTOX) y de una caroteno isomerasa (CRTISO), que poseen una baja expresión en frutos verdes. Durante la maduración del fruto, la acumulación del mRNA correspondiente a la PTOX se produce de forma paralela a la del PDS y ZDS (Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008), mientras que la CRTISO permanece constante, llegando incluso a disminuir su expresión (Kato *et al.*, 2004). En el mutante de naranja amarillo Pinalate que presenta una acumulación masiva

de carotenoides tempranos (fitoeno, fitoflueno y diferentes isómeros de  $\zeta$ -caroteno) y una reducción en la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas y apocarotenoides  $C_{30}$  (Rodrigo *et al.*, 2003), se ha identificado una alteración en la secuencia de un gen con alta homología con  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZISO) que conduce a la formación de la proteína ZISO truncada no funcional (Rodrigo *et al.*, resultados no publicados). En diferentes plantas la actividad ZISO se ha descrito como accesoria para la correcta síntesis de carotenoides en tejidos fotosintéticos, ya que la luz es capaz de isomerizar el tri- $Z$ - $\zeta$ -caroteno en di- $Z$ - $\zeta$ -caroteno. Sin embargo, en tejido cromoplástico o en ausencia de luz, esta actividad parece ser esencial para el correcto funcionamiento de la ruta (Chen, Li y Wurtzel, 2010a). Por lo tanto, la caracterización de Pinalate parece indicar que ZISO tiene un papel clave en la carotenógenesis en frutos cítricos y que alteraciones en su función conducen a perfiles anormales de carotenoides.

Uno de los puntos cruciales en la regulación de la síntesis de carotenoides es la ciclación del licopeno, ya que esta etapa es la bifurcación de la ruta para dar lugar al  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno y, finalmente, a las  $\epsilon,\beta$ -xantofilas o  $\beta,\beta$ -xantofilas, respectivamente. Las enzimas encargadas de la ciclación de los extremos del licopeno se denominan licopeno ciclasas (LCY). En cítricos se han identificado tres genes cuyas proteínas presentan actividad LCY: una  $\epsilon$ -LCY y dos  $\beta$ -LCY (1 y 2) (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009; Zhang *et al.*, 2012). A medida que avanza la maduración en los frutos cítricos, la expresión de  $\epsilon$ -LCY disminuye mientras que la actividad  $\beta$ -LCY aumenta considerablemente, y conduce la ruta hacia la formación de  $\beta,\beta$ -xantofilas (Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Existen diferentes evidencias que indican que la  $\beta$ -LCY2 juega un papel

determinante en la composición de carotenoides en frutos cítricos maduros. La expresión de  $\beta$ -LCY2 es específica de tejido cromoplástico y se induce en el cambio de color del fruto de forma paralela a la acumulación masiva de  $\beta,\beta$ -xantofilas (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009). Además, en distintas variedades y especies de cítricos se han identificado dos alelos del gen  $\beta$ -LCY2, *a* y *b*, que se expresan de forma diferencial durante la maduración del fruto y ensayos funcionales muestran que la actividad del alelo *b* es prácticamente nula (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009). Debido a los potenciales beneficios para la salud del consumo de licopeno y su gran influencia en la coloración de los frutos, en los últimos años se han investigado de forma intensa las bases moleculares que conducen a la acumulación de licopeno en los frutos cítricos. La presencia de este caroteno es muy inusual en ellos, ya que sólo se acumula en la pulpa de variedades rosadas y rojas de pomelos y pumelos, y en un número muy escaso de mutantes espontáneos de naranja dulce. En pomelos rojos se ha comprobado una menor expresión de los alelos *a* y *b*  $\beta$ -LCY2 respecto a naranjas o pomelos blancos, además de menor expresión del alelo de reducida actividad, lo que podrían provocar la acumulación de licopeno en estos frutos (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009; Mendes *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012; Alquézar *et al.*, 2013). Sin embargo, en la naranja de pulpa roja Cara Cara se ha sugerido que una mayor entrada del flujo de precursores a la ruta de carotenoides podría ser uno de los factores responsables de la masiva acumulación de licopeno en la pulpa y de carotenos incoloros en el flavedo (Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008).

La  $\beta$ -caroteno hidroxilasa ( $\beta$ -CHX) de los cítricos se ha descrito como una proteína asociada a la membrana (Inoue *et al.*, 2006), cuya expresión se estimula de forma considerable durante la maduración en frutos de diferentes especies,

incluyendo limones, naranjas y mandarinas (Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008a). En el pomelo rojo Star Ruby se observa una baja expresión de  $\beta$ -CHX que coincide con la acumulación de  $\beta$ -caroteno en estos frutos (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009). En cítricos también se ha identificado un gen de  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa ( $\epsilon$ -CHX) que interviene en la formación de luteína a partir de  $\alpha$ -caroteno y cuya expresión disminuye con la maduración del fruto (Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008a). Recientemente, se ha descrito la obtención de una naranja modificada genéticamente en la que se ha bloqueado parcialmente la expresión del gen  $\beta$ -CHX y como consecuencia los frutos maduros contienen mayor proporción de carotenos en la pulpa y, en particular, un incremento de aproximadamente 36 veces en la concentración de  $\beta$ -caroteno respecto a los frutos parentales y, por lo tanto, una mayor capacidad antioxidante y provitamina A (Pons *et al.*, 2014). Así pues, el conjunto de resultados sugiere que la enzima  $\beta$ -CHX juega un papel crucial en la acumulación de  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas en frutos cítricos y que alteraciones en su expresión pueden ser determinantes en la composición de carotenoides.

Las últimas etapas metabólicas que dan lugar a las  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas epoxidadas violaxantina y anteraxantina, mayoritarias en la piel y pulpa de naranjas, están catalizadas por la zeaxantina epoxidasa (ZEP). La expresión de ZEP se ha estudiado a lo largo de la maduración en frutos de naranjas, limones y mandarinas, mostrando un incremento, aunque en general de menor magnitud, que el observado para *PSY*,  $\beta$ -*LCY2* o  $\beta$ -*CHX* (Rodrigo, Marcos y Zacarías, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008a). La epoxidación secuencial de la zeaxantina es reversible y forma parte del denominado ciclo de las xantofilas. La violaxantina puede ser reconvertida en zeaxantina

mediante de-epoxidación catalizada por VDE (violaxantina de-epoxidasa). El gen *VDE* ha sido poco estudiado en cítricos y se desconoce su posible relevancia en la acumulación de carotenoides en los frutos. Por último, la enzima neoxantina sintasa (*NSY*) cataliza la conversión de violaxantina a neoxantina, la última xantofila de la rama  $\beta$ , $\beta$ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides, aunque en cítricos todavía no se ha identificado ninguna enzima con esta actividad.

Una particularidad de los frutos cítricos es la presencia del isómero (9*Z*)-violaxantina que es el carotenoides mayoritario en frutos de naranjas y se acumula en elevadas proporciones en las mandarinas, por lo que su contribución al perfil de carotenoides en los frutos de mayor consumo es muy importante. Hasta el momento se desconoce la potencial isomerasa que catalizaría la conversión del isómero (todo-*Z*)-violaxantina en (9*Z*)-violaxantina, o si esta reacción ocurre de forma espontánea. Una posible alternativa es la presencia de una ruta 9*Z* en frutos, ya que otros autores han descrito una inusual abundancia de isómeros 9*Z* de otras xantofilas en zumos de naranja (Meléndez-Martínez *et al.*, 2008).

Otro de los potenciales mecanismos reguladores de la acumulación de carotenoides en frutos cítricos es su catabolismo o degradación. El catabolismo de carotenoides está mediado por una amplia familia de enzimas genéricamente denominadas dioxigenasas de corte de carotenoides (CCD, por sus siglas en inglés) que fragmentan los carotenoides en diferentes posiciones de la molécula para dar lugar a la formación de apocarotenoides (Walter y Strack, 2011). En frutos cítricos, al igual que en otras plantas, se han establecido diferentes subfamilias o grupos según su especificidad sobre el carotenoide sustrato y la posición de corte en la molécula. En cítricos se han identificado y caracterizado funcionalmente

diferentes miembros pertenecientes a las subfamilias CCD1, CCD4 y 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Kato *et al.*, 2006; Rodrigo, Alquézar y Zacarías, 2006; Agustí *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013a). La subfamilia de enzimas NCED reconoce exclusivamente 9Z-epoxicarotenoides ((9'Z)-neoxantina o (9Z)-violaxantina) para dar lugar a xantoxina C15. Esta actividad enzimática es de gran importancia en el metabolismo celular ya que la xantoxina es el precursor de la fitohormona ácido abscísico (ABA), que está implicada en numerosos procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas, así como en la respuesta a diferentes estreses. En cítricos se han caracterizado dos genes pertenecientes a este grupo y su expresión en frutos de diferentes especies se correlaciona con el contenido de ABA, aunque no parecen afectar al contenido en 9Z-epoxicarotenoides (Rodrigo, Alquézar y Zacarías, 2006; Kato *et al.*, 2006). Las enzimas de la subfamilia CCD1 presentan baja especificidad por el carotenoide sustrato y de posición de corte, y se ha identificado un único miembro en cítricos (Kato *et al.*, 2006). La expresión de *CCD1* en frutos cítricos no varía a lo largo de la maduración ni entre especies con diferencias marcadas en el contenido de carotenoides, por lo que no se le ha atribuido un efecto directo sobre el perfil de carotenoides en los frutos (Kato *et al.*, 2006). Recientemente, se han identificado hasta cuatro proteínas de la subfamilia CCD4 en cítricos y una de ellas, CCD4b, tiene un gran efecto en la composición de carotenoides y en el color externo de naranjas y mandarinas (Ma *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013a). La enzima CCD4b de cítricos cataliza la síntesis de apocarotenoides C<sub>30</sub>, b-citraurina y -b-apo-8'-apocarotenal, a partir de zeaxantina y β-criptoxantina (Ma *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013a). Estos dos apocarotenoides C<sub>30</sub> son prácticamente exclusivos del género *Citrus* y se sintetizan y acumulan en el flavedo del fruto, confiriéndole un color naranja-rojizo muy atractivo.

## EFFECTO DE FACTORES PRE- Y POS-COSECHA EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS

La biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos se ve afectada por distintos factores endógenos y exógenos, entre los que destacan las diferentes hormonas vegetales (principalmente giberelinas, etileno y ácido abscísico), factores nutricionales (contenido de nitrógeno y disponibilidad de carbohidratos), así como las condiciones ambientales, entre las que destacan la temperatura y la luz (Rodrigo *et al.*, 2013).

### Hormonas

#### Etileno

Es ampliamente conocido el efecto estimulador del etileno en la coloración de los frutos cítricos. Su aplicación durante la poscosecha es una práctica habitual en la industria citrícola, con el objetivo de inducir y homogeneizar la coloración de la piel de los frutos, sobre todo en variedades de maduración interna temprana en las que la piel alcanza más tarde el color externo requerido para la comercialización (Porat, 2008). La inducción de la coloración en respuesta al etileno se debe a la combinación de dos fenómenos, por un lado, la degradación de las clorofilas y, por otro, la inducción de la síntesis de carotenoides. A su vez, se ha descrito que los efectos de esta hormona se restringen principalmente a la piel, sin afectar significativamente a la calidad organoléptica y nutricional de la pulpa (Mayuoni *et al.*, 2011; Chaudhary *et al.*, 2012). Estudios pioneros mostraron que la aplicación exógena de etileno induce la acumulación de β-criptoxantina y β-citraurina, mientras que el efecto es menor sobre la violaxantina (Stewart

y Wheaton, 1972), lo que fue posteriormente corroborado en diferentes especies y variedades de cítricos (Rodrigo y Zacarías, 2007; Fujii *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Alós *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015). A su vez, el efecto del etileno en el cambio de color de los frutos interacciona directamente con la temperatura, y es mayor el efecto a 20 °C que a 5 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). En general se asume que el etileno induce la presencia de carotenoides más coloreados (rojizos y naranjas) como  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno o apocarotenoides  $C_{30}$ , mientras que mantiene o reduce la abundancia de carotenoides de coloración amarilla (violaxantina y luteína) (Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015).

El tratamiento con etileno tiene un efecto inductor sobre la transcripción de los principales genes de biosíntesis de carotenoides, que es consistente con los cambios registrados en estos pigmentos. En naranjas Navel se ha comprobado que la aplicación poscosecha de etileno induce la expresión de los genes *PSY*, *ZDS* y  $\beta$ CHX (Rodrigo y Zacarías, 2007) y, especialmente,  $\beta$ LCY2 que es específica de frutos coloreados (Alquézar, Zacarías y Rodrigo, 2009), sin afectar a la transcripción de otros genes de la ruta de biosíntesis. Además, también se ha descrito una disminución en la expresión de  $\epsilon$ LCY en respuesta a la hormona, lo que sugiere que el etileno favorece la activación de la ruta  $\beta,\beta$ - responsable de la síntesis de carotenoides coloreados y reprime la  $\epsilon,\beta$ - (Rodrigo y Zacarías, 2007; Ma *et al.*, 2015). Un efecto similar en la regulación de los genes biosintéticos se ha descrito tanto en mandarinas Satsuma como Comune, en las que la aplicación de etileno induce la expresión de genes clave en la regulación de la síntesis de carotenoides (Alós *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015). En conjunto, estos estudios demuestran que el etileno reproduce y acelera el proceso natural del cambio de color y la

acumulación de carotenoides coloreados en los frutos cítricos. Sin embargo, existe todavía controversia sobre el rol del etileno como regulador fisiológico natural de este proceso, ya que los frutos cítricos se clasifican como no-climatéricos y presentan muy baja producción de etileno durante el crecimiento y la maduración natural del fruto.

### Giberelinas

El efecto de las giberelinas (GA) como reguladores negativos de la inducción de la coloración de los frutos cítricos es ampliamente conocido desde hace décadas. El nivel de GA, incluidas las formas activas GA1 y GA4, se reduce previamente al inicio del cambio de color, de forma paralela al aumento en la producción de ABA (Alférez, 2001; Gambetta *et al.*, 2012), y es parte clave del proceso regulador endógeno de la maduración de los frutos cítricos. El estudio del efecto de las GA en el cambio de color en mandarinas Clemenules y naranjas Navel revela que el papel de las GA estaría vinculado con un retraso de la transición de la rama  $\beta,\epsilon$ - hacia la rama  $\beta,\beta$ -, lo que favorece la presencia de los carotenoides típicos de tejidos verdes, como la luteína; mientras que reduciría la acumulación de fitoeno, fitoflueno y  $\beta,\beta$ -xantofilas (Alós *et al.*, 2006; Rodrigo y Zacarías, 2007). Esta respuesta está asociada a un retraso en la inducción o una represión de los genes de biosíntesis de carotenoides (Alós *et al.*, 2006; Rodrigo y Zacarías, 2007; Fujii *et al.*, 2008). Además, se ha observado que la aplicación exógena de GA contrarresta el efecto promotor del etileno en la inducción de la carotenogénesis, ya que son hormonas antagonistas de este proceso (Rodrigo y Zacarías, 2007; Fujii *et al.*, 2008).

### Ácido abscísico

El cambio de color en los frutos cítricos se ha asociado con un aumento en la producción de ABA en el flavedo. Esta relación entre el inicio de la maduración y el aumento en

el contenido de ABA se describió inicialmente en naranjas Shamouti (Goldschmidt *et al.*, 1973) y posteriormente también se ha observado en la piel y pulpa de numerosas especies y variedades de frutos cítricos, como las naranjas Navel, Cara Cara y Valencia (Rodrigo, Alquézar y Zacarías, 2006; Agustí *et al.*, 2007; Alquézar, Rodrigo y Zacarías, 2008), pomelos Marsh y Star Ruby (Alquézar *et al.*, 2013), mandarinas Satsuma y Clementina, y limón Lisbon (Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007). Es más, el aumento en el contenido de ABA se potencia por la aplicación de etileno exógeno durante la poscosecha, lo que sugiere una interacción entre ambas hormonas (Rodrigo, Alquézar y Zacarías, 2006). Sin embargo, aún se desconoce el papel del ABA en la maduración en los cítricos, ya que es también un metabolito final de la ruta de carotenoides. A pesar de que existe una clara asociación entre el aumento de ABA endógeno y la inducción de la coloración de los frutos cítricos, las aplicaciones exógenas de la hormona son inefectivas para inducir la coloración en los cítricos (Iglesias *et al.*, 2007). Por otro lado, en el mutante de naranja Pinalate, que es deficiente en ABA debido a un bloqueo en la ruta de carotenoides, se ha observado un retraso en la desverdización natural de los frutos, lo que sugiere que el ABA puede estar implicado en la velocidad del cambio de color de la piel de los frutos (Rodrigo *et al.*, 2003). Este mutante presenta, a su vez, una respuesta alterada a la aplicación exógena de GA y de etileno (Alfárez, comunicación personal), por lo que la respuesta a ambas hormonas, ya sea inhibiendo o potenciando el cambio de color, respectivamente, podría estar mediada también por el ABA.

## Nutricionales

Evidencias acumuladas a lo largo de décadas demuestran que la disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores que interviene directamente tanto en el inicio como en

la velocidad del cambio de color en los frutos cítricos. Entre los diferentes nutrientes destacan el nitrógeno y los azúcares, ambos reconocidos como efectores de la transformación reversible de cloroplastos a cromoplastos en frutos cítricos. Los plástidos son los orgánulos responsables de la biosíntesis y acumulación de carotenoides, así como también de clorofilas y almidón (Gross, 1987). En este sentido, el proceso de transición de cloroplastos a cromoplastos constituye un paso clave que acompaña el desarrollo de la coloración en los frutos cítricos y determina su capacidad de biosíntesis y de sumidero para la acumulación de carotenoides en frutos coloreados (Gross, 1987; Cazzonelli y Pogson, 2010; Li y Yuan, 2013). La fertilización con altas dosis de nitrógeno retrasa el desverdizado natural de los frutos, manteniendo la estructura cloroplástica característica. Además, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que altas concentraciones de nitrógeno reducen la degradación de clorofilas inducida por azúcares, estableciéndose una relación inversa entre ambos factores en el proceso de cambio de color en los frutos (Huff, 1983; 1984). Por lo tanto, la desverdización de la piel de los cítricos se induce con reducidos niveles de nitrógeno y se estimula en condiciones de alta disponibilidad de azúcares. Este efecto se ha caracterizado en secciones del pericarpio de pomelos y mandarinas cultivadas *in vitro*, así como en árboles adultos (Huff, 1983; 1984). La inducción del cambio de color por los azúcares está mediada por los efectos opuestos del etileno y las giberelinas en este proceso. Además, existe una interacción con los factores ambientales que determinan la translocación de nutrientes en el árbol durante el crecimiento y maduración. Durante el invierno se reduce la absorción de nitrógeno y su translocación desde la raíz, por lo que el nivel de nitrógeno en el fruto se reduce. En esta etapa, el fruto es un sumidero importante de carbohidratos, proceso que se favorece cuando las temperaturas de campo se sitúan por

debajo de 10 °C (Agustí, 1999). Estas condiciones estimulan la pérdida de clorofilas y la acumulación de carotenoides. De forma contraria, las altas temperaturas durante la primavera favorecen la absorción de nitrógeno y su translocación a los frutos, mientras que las hojas en crecimiento constituyen un fuerte sumidero de fotoasimilados, condiciones ambas que favorecen el reverdecimiento de los frutos. Por lo tanto, los procesos de desverdecimiento y reverdecimiento de la piel de los cítricos en respuesta a las bajas y altas temperaturas, respectivamente, reflejan claramente la interacción entre el nitrógeno y los azúcares (Huff, 1983; 1984).

En la mandarina Clementines, los altos niveles de nitrógeno retrasan el cambio de color de la piel de los frutos y mantienen el perfil de carotenoides característico de tejidos verdes, debido, principalmente, a un retraso en la inducción de la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides (Alós *et al.*, 2006). La modificación del nivel de fotoasimilados en los frutos de Clementina mediante el sombreado o defoliado, provoca un cambio en el contenido de carotenoides en la piel, sin que se afecten de forma significativa, o incluso reduciéndose, la concentración de carbohidratos en los mismos (Poiroux-Gonord *et al.*, 2012). En consecuencia, se ha sugerido que aunque la disponibilidad de carbohidratos no es un factor limitante en la síntesis de carotenoides, una deficiencia de estos compuestos en el fruto en etapas tempranas de la maduración estimula una mayor acumulación de carotenoides en el fruto maduro (Poiroux-Gonord *et al.*, 2012).

## Temperatura

Los frutos cítricos presentan determinados requerimientos de temperatura para iniciar el cambio de color durante la

maduración natural. En este sentido, la transición de cloroplastos a cromoplastos en la piel del fruto se estimula por las bajas temperaturas (Gross, 1987), especialmente cuando las temperaturas nocturnas son inferiores a 10-15 °C (Stearns y Young, 1942). Además, la amplitud térmica también es una variable que afecta de forma importante la velocidad del cambio de color y un régimen día-noche de 20-7 °C induce una coloración naranja brillante en naranjas y mandarinas, mientras que a temperaturas superiores los frutos alcanzan una coloración más pálida (Young y Erickson, 1961). En concreto, se ha sugerido que temperaturas nocturnas inferiores a 12 °C estimulan la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas, especialmente  $\beta$ -criptoxantina (Gross, 1987; Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012), carotenoides clave en la adquisición de la típica coloración naranja intensa. Otros estudios realizados en pomelo Redblush y naranja Ruby Blood indican que las temperaturas de 16-5 °C día-noche son necesarias para la formación de xantofilas y que temperaturas altas (35-30 °C), promueven la acumulación de licopeno (Meredith y Young, 1969). Este efecto de las bajas temperaturas en la estimulación del cambio de color también se ha observado en limones (Manera *et al.*, 2012) y en frutos de pomelo Rio Red y Star Ruby, en los que el inicio del cambio de color se vincula a temperaturas mínimas de 13-14 °C durante los quince días previos al inicio del proceso (Porrás *et al.*, 2014).

Además de la temperatura del aire, la temperatura del suelo es otro factor importante que afecta al cambio de color de los frutos cítricos (Mesejo *et al.*, 2012). En mandarinas Satsuma, la desverdecimiento es más rápida y la acumulación de carotenoides más eficiente cuanto menor es la temperatura del suelo (Sonnen, Lenz y Gross, 1979). En mandarinas clementinas, el desarrollo del color en la piel se inicia cuando la temperatura del suelo alcanza 20-23 °C, y se sugiere éste como un intervalo umbral para el inicio del cambio de color en

esta especie (Mesejo *et al.*, 2012). Por lo tanto, la modificación de la temperatura del suelo mediante diferentes estrategias, podría favorecer el cambio de color y provocar un adelanto en la cosecha (Mesejo *et al.*, 2012). Este requerimiento de temperatura en el suelo podría estar conectado con una reducción en la producción de las hormonas GA y citoquininas en las raíces bajo estas condiciones (Eilati, Goldschmidt y Monselise, 1969), así como también con una menor absorción y transporte de nitrógeno hacia las hojas y frutos, factores que favorecen el cambio de coloración (Wallace, 1953). Así, se reconoce de manera general que las altas temperaturas durante la maduración natural de los frutos provocan una menor acumulación de carotenoides y favorecen la retención de clorofilas en la piel de los frutos (Stearns y Young, 1942; Young y Erickson, 1961; Agustí, 1999). Estas observaciones podrían explicar la incapacidad de este género, especialmente en el caso de naranjas y mandarinas, para desarrollar su coloración típica en regiones cálidas como el trópico (Stewart y Wheaton, 1972). Además, el efecto de la temperatura en la acumulación del apocarotenoide  $\beta$ -citraurina tiene especial interés, ya que es uno de los principales responsables de la intensa coloración naranja de la piel de determinadas variedades de mandarinas y naranjas. La síntesis de  $\beta$ -citraurina es mayor a bajas temperaturas (entre 15 y 10 °C) y se reduce notablemente cuando se superan 30°C (Stewart y Weathon, 1972; Stewart y Leuenberger, 1976; Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012). A pesar de este claro efecto de las temperaturas del suelo en la coloración de la piel, la pulpa no se afecta por este factor, ya que desarrolla su coloración de forma independiente.

Además de la temperatura de campo, las condiciones de almacenamiento poscosecha también pueden afectar la coloración de los frutos cítricos, al modificar directamente la

acumulación de carotenoides tanto en la piel como en la pulpa. El almacenamiento a bajas temperaturas (1 a 5 °C) es una práctica habitual para mantener la calidad de los frutos cítricos y minimizar el crecimiento de patógenos, y tiene un marcado efecto sobre el color, que puede ser variable en función de la especie y la variedad. Se ha descrito que periodos extensos de almacenamiento a bajas temperaturas provocan una pérdida en el color de las mandarinas Or y Odem (Tietel *et al.*, 2012), mientras que en la mandarina Satsuma el almacenamiento a 5 °C aumenta el nivel de carotenoides en la piel, pero los reduce en la pulpa (Matsumoto *et al.*, 2009). En el caso de variedades de naranjas del grupo Navel el contenido de estos pigmentos permanece inalterado durante el almacenamiento refrigerado (Tao *et al.*, 2012; Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012). Por otro lado, la aplicación de un shock de agua fría (2 °C durante 30 min) y posterior almacenamiento a 20 °C, favorece la coloración de los frutos de Clementina a un nivel comparable con el tratamiento de desverdización con etileno (Barry y Van Wyk, 2006). El almacenamiento a 20 °C en mandarinas Satsuma también estimula en forma importante la acumulación de carotenoides en piel y pulpa, y favorece la coloración (Matsumoto *et al.*, 2009).

En diferentes variedades de naranjas y mandarinas, el almacenamiento de los frutos a temperaturas intermedias (8 a 15 °C) resulta en una estimulación de la coloración de la piel (Van Wyk, Huysamer y Barry, 2009; Zhu *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2012; Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012). Este efecto está asociado a una reducción de clorofilas, a un aumento específico en el contenido del apocarotenoide de coloración rojiza,  $\beta$ -citraurina (Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012) o de la xantofila  $\beta$ -criptoxantina y del  $\beta$ -caroteno (Zhou *et al.*, 2010). Por lo tanto, en determinadas condiciones, puede ser interesante el almacenamiento prolongado a temperaturas intermedias de refrigeración (en torno a 10 °C), ya que permiten

extender la vida poscosecha del fruto a la vez que promueven la coloración externa y el aumento de carotenoides en la pulpa.

El análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos sometidos a diferentes temperaturas revela que los cambios en el contenido de estos compuestos parecen estar regulados a nivel transcripcional. Se ha observado que a bajas temperaturas apenas hay cambios en los niveles de transcritos, mientras que a temperaturas intermedias hay una estimulación en la expresión de genes clave de la ruta (Zhou *et al.*, 2010; Carmona, Zacarías y Rodrigo, 2012; Tao *et al.*, 2012). Por otro lado, al igual que ocurre durante el cambio de color en el campo, los tratamientos de altas temperaturas (30-35 °C) durante la poscosecha provocan una disminución en la coloración externa, ya que favorecen la degradación de clorofilas e inhiben la síntesis y acumulación de carotenoides coloreados (Stewart y Wheaton, 1972; Matsumoto *et al.*, 2009), lo que afecta de forma negativa la coloración externa de los frutos.

## Luz

La luz o la intensidad lumínica es uno de los factores ambientales, junto con la temperatura, que más claramente influye en la coloración de los frutos cítricos durante su maduración natural. En general, está descrito que la exposición a la luz durante la maduración favorece la síntesis de carotenoides, aunque en el caso de la pulpa no parece ser un requisito indispensable, ya que en este tejido los carotenoides se sintetizan y acumulan en condiciones de oscuridad o baja radiación. Observaciones de campo realizadas a lo largo de décadas indican que los frutos de diferentes variedades localizados en el interior del árbol desarrollan una coloración más pálida que los que están en el exterior (Uchida, Yoshinaga

y Kawasae, 1985; Casas y Mallent, 1988; Cronje *et al.*, 2011; Cronje, Barry y Huysamer, 2013; Lado *et al.*, 2014), que presentan a su vez un menor contenido de carotenoides (Cronje, Barry y Huysamer, 2011; 2013; Lado *et al.*, 2014). Además, los frutos de parcelas con una menor densidad de plantación, es decir con frutos más expuestos a la luz, desarrollan un color más intenso (Boswell, Nauer y Atkin, 1982), y la reducción de exposición a la luz de forma artificial también reduce significativamente la coloración externa de naranjas y mandarinas (Uchida, Yoshinaga y Kawasae, 1985; Lado, Rodrigo y Zacarías, 2013, Lado *et al.*, 2014). Sin embargo, el efecto positivo de la luz en la acumulación de carotenoides es también dependiente de la especie y variedad, ya que en el caso de los pomelos rojos la ausencia de luz estimula la coloración roja de la piel del fruto y la acumulación de carotenoides (x 3), principalmente, licopeno (x 50) (Lado, Rodrigo y Zacarías, 2013). En su conjunto, estas observaciones sugieren que la coloración de la piel de los frutos cítricos se ve afectada de forma importante tanto por la calidad como por la cantidad de luz recibida y que la respuesta también depende de la variedad o especie.

La luz también modifica la coloración de los frutos durante el periodo poscosecha. La aplicación de luz LED roja en mandarina Satsuma durante los días posteriores a la cosecha provoca un aumento en el contenido de  $\beta$ -criptoxantina, mientras que, por otro lado, reduce el nivel de  $\beta$ -caroteno (Ma *et al.*, 2012). A su vez, la aplicación de luz roja evita la reducción en el contenido de luteína inducida por el tratamiento con etileno, debido al efecto positivo específico de la luz en la transcripción del gen  $\epsilon$ LCY (Ma *et al.*, 2015).

Los mecanismos que subyacen en la respuesta positiva de naranjas y mandarinas a la luz aún se desconocen con certeza,

pero los datos de que se dispone sugieren que, al menos en parte, existe un efecto a nivel transcripcional sobre los genes de biosíntesis de carotenoides (Lado *et al.*, 2014). En otras especies, como *Arabidopsis*, se ha demostrado una regulación directa de la expresión de PSY por la luz (Toledo-Ortiz, Huq y Rodríguez-Concepción, 2010). En el caso de los cítricos, se ha descrito la existencia de motivos de respuesta a luz en el promotor del gen *PSY* de naranja (Zeng *et al.*, 2013), así como una menor expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*,  $\beta$ *LCY* y  $\beta$ *CHX* en frutos de mandarina Clemenules que maduraron en oscuridad (Lado *et al.*, 2014), lo que sugiere una regulación

transcripcional coordinada de las diferentes etapas clave de la ruta de carotenoides. Estudios adicionales en callos de diferentes especies de cítricos con una acumulación diferencial de carotenoides también han mostrado que la luz tiene un efecto importante en la expresión de varios genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, aunque los cambios a nivel transcripcional no siempre se correlacionan con las modificaciones en la acumulación de carotenoides (Gao *et al.*, 2011), lo que sugiere la existencia de mecanismos más complejos de regulación de la biosíntesis de carotenoides.

### AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio ha estado financiado por proyectos del Ministerio de Economía e Innovación de España (AGL2012-34573 y AGL2015-70218) y la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/027). Los autores forman parte y agradecen el apoyo de la Red CYTED IBERCAROT (ref. 112RT0445) del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. JL es receptora de un contrato predoctoral JAE-Predoc (CSIC-FSE) y FAC es receptor de una beca predoctoral del Programa Santiago Grisolia (Generalitat Valenciana).

## REFERENCIAS

- Agustí, M. 1999. Research Singpost, Trivandrum, India, pp. 1-34.
- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D.J., Cercós, M., Tadeo, F.R., Talón, M. 2007. *Plant Science* 72: 85-94.
- Alférez, F. 2001. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.
- Alós, E., Cercós, M., Rodrigo, M.J., Zacarías, L., Talón, M. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4888-4895.
- Alós, E., Distefano, G., Rodrigo, M.J., Gentile, A., Zacarías, L. 2013. *Physiologia Plantarum* 151: 507-521.
- Alquézar, B., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. 2008. *Phytochemistry* 69: 1997-2007.
- Alquézar, B., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. 2008a. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2: 23-35.
- Alquézar, B., Zacarías, L., Rodrigo, M.J. 2009. *Journal of Experimental Botany* 60:1783-1719.
- Alquézar, B., Rodrigo, M.J., Lado, J., Zacarías, L. 2013. *Tree Genetics & Genomes* 9:1257-1269.
- Barry, G.H. y Van Wyk, A.A. 2006. *Postharvest Biology and Technology* 40: 82-88.
- Boswell, S.B., Nauer, E.M., Atkin, D.R. 1982. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 60-65.
- Carmona, L., Zacarías, L., Rodrigo, M.J. 2012. *Postharvest Biology and Technology* 74: 108-117.
- Casas, A. y Mallent, M.D. 1988. *Revista de Agroquímica y Tecnología Alimentaria* 28: 344-356.
- Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J. 2010. *Trends in Plant Science* 15: 266-274.
- Chaudhary, P., Jayaprakasha, G.K., Porat, R., Patil, B.S. 2012. *Food Chemistry* 135: 1667-1675.
- Chen, C., Costa, M.C.G., Yu, Q., Moore, G.A., Gmitter, F.G. 2010. *Tree Genetics and Genomes* 6: 905-914.
- Chen, Y., Li, F., Wurtzel, E.T. 2010a. *Plant Physiology* 153:66-79.
- Costa, M.G.C., Moreira, C.D., Melton, J.R., Otoni, W.C., Moore, G.A. 2012. *Molecular Biology Reports* 39: 895-902.
- Cronje, P.J.R., Barry, G.H., Huysamer, M. 2011. *Postharvest Biology and Technology* 60: 192-201.
- Cronje, P.J.R., Barry, G.H., Huysamer, M. 2013. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 13: 217-224.
- Cuéllar, F., Cronje, P.J.R., Zacarías, L., Rodrigo, M.J. 2014. En L. Zacarías, A.R. Ballester, J.F. Marcos y M.B. Pérez-Gago (eds.). *Avances en la Postcosecha de frutas y hortalizas*, Valencia: Fundación Universidad-Empresa, pp. 515-521.

## REFERENCIAS

- Dhuique-Mayer, C., Borel, P., Reboul, E., Caporiccio, B., Besancon, P., Amiot, M.J. 2007. *The British Journal of Nutrition* 97: 883-890.
- Eilati, S.K., Goldschmidt, E.E., Monselise, S.P., 1969. *Experientia* 25: 209-210.
- Fanciullino, A.L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R., Ollitrault, P. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4397-4406.
- Fanciullino, A.L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Morillon, R., Ollitrault, P. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7406-7417.
- Fanciullino, A.L., Cercós, M., Dhuique-Mayer, C., Froelicher, Y., Talón, M., Ollitrault, P., Morillon, R. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3628-3638.
- Farin, D., Ikan, R., Gross, J. 1983. *Phytochemistry* 22: 403-408.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Fujii, H., Shimada, T., Sugiyama, A., Nishikawa, F., Endo, T., Nakano, M., Ikoma, Y., Shimizu, T., Omura, M. 2007. *Plant Science* 173: 340-348.
- Fujii, H., Shimada, T., Sugiyama, A., Endo, T., Nishikawa, F., Nakano, M., Ikoma, Y., Shimizu, T., Omura, M. 2008. *Scientia Horticulturae* 116: 291-298.
- Gambetta, G., Bentancur, O., Mesejo, C., Reig, C., Gravina, A. 2012. *Journal of Plant Growth Regulators* 31: 273-282.
- Gao, H., Xu, J., Liu, X., Liu, B., Deng, X. 2011. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 2485-2492.
- García-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P. 2012. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 77-94.
- García-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P. 2013. *Annals of Botany* 111: 1-19.
- Giuffrida, D., Dugo, P., Salvo, A., Saitta, M., Dugo, G. 2010. *Fruits* 65: 277-284.
- Gmitter, F.J. 1995. En J. Janick (ed.), *Plant Breeding Reviews*. Lake Alfred: John Wiley & Sons, pp. 345-363.
- Goldschmidt, E.E., Goren, R., Even-Chen, Z., Bittner, S. 1973. *Plant Physiology* 51: 879-882.
- Goldenberg, L., Yaniv, Y., Kaplunov, T., Doron-Faigenboim, A., Porat, R., Carmi, N. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 4938-4946.
- Gross, J. 1987. En B.S. Schweigert (ed). *Food Science and Technology: A Series of Monographs*. Londres: Academic Press.
- Huff, A. 1983. *Plant Physiology* 73: 243-249.
- Huff, A. 1984. *Plant Physiology* 76: 307-312.

## REFERENCIAS

- Hwang, A., Huang, K., Hsu, S. 2004. *Journal of Agricultural Research China* 53: 229-238.
- Iglesias, D.J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Naranjo, M.A., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., Tadeo, F.R., Talón, M. 2007. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 333-362.
- Ikoma, Y., Komatsu, A., Kita, M., Ogawa, K., Omura, M., Yano, M., Moriguchi, T. 2001 *Physiologia Plantarum* 111: 232-238.
- Inoue, K., Furbbe, K.J., Uratsu, S., Kato, M., Dandekar, A.M., Ikoma, Y. 2006. *Physiologia Plantarum* 127: 561-570.
- John-Karuppiah, K.J. y Burns, J.K. 2010. *Postharvest Biology and Technology* 58:185-193.
- Kato, M. 2012. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 81: 219-233.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M. 2004. *Plant Physiology* 134: 824-837.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., Yano, M. 2006. *Journal of Experimental Botany* 57: 2153-2164.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kuniga, T., Nakajima, N., Yoshida, T., Yano, M. 2007. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76: 103-111.
- Katz, E., Lagunes, P.M., Riov, J., Weiss, D., Goldschmidt, E.E. 2004. *Planta* 219: 243-252.
- Kim, I.J., Ko, K.C., Nam, T.S., Kim, Y.W., Chung, W.I., Kim, C.S. 2003. *Journal of Microbiology* 41: 212-218.
- Kita, M., Komatsu, A., Omura, M., Yano, M., Ikoma, Y., Moriguchi, T. 2001. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65: 1424-1428.
- Lado, J., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. 2013. *Levante Agrícola Especial Postcosecha*, 179-185.
- Lado, J., Brocal, R., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. 2014. En L. Zacarías, A.R. Ballester, J.F. Marcos, M.B. Pérez-Gago (eds.). *Avances en la postcosecha de frutas y hortalizas*. Valencia: Fundación Universidad Empresa, pp. 108-115. ISBN 978-84-617-1950-1.
- Lado, J., Rodrigo, M.J., Cronje, P., Zacarías, L. 2015 *Postharvest Biology and Technology* 100: 176-186.
- Lafuente, M.T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M.A, Sánchez-Ballesta, M.T., Dupille, E. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 6020-6025.
- Li, L. y Yuan, H., 2013. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539: 102-109.
- Liu, Q., Xu, J., Liu, Y., Zhao, X., Deng, X., Guo, L., Gu, J. 2007. *Journal of Experimental Botany* 58: 4161-4171.

## REFERENCIAS

- Liu, C., Yan, F., Gao, H., He, M., Wang, Z., Cheng, Y., Deng, X., Xu, J. 2014. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:111-119.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Kiriwa, Y., Yahata, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 197-201.
- Ma, G., Zhang, L., Matsuta, A., Matsutani, K., Yamawaki, K., Yahata, M., Wahyudi, A., Motohashi, R., Kato, M. 2013. *Plant Physiology* 163: 682-695.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Kiriwa, Y., Yahata, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H. 2015. *Postharvest Biology and Technology* 99: 99-104.
- Manera, F.J., Brotons, J.M., Conesa, A., Porras, I. 2012. *Scientia Horticulturae* 145: 34-38.
- Marcos, J.F., González-Candelas, L., Zacarías, L. 2005. *Journal of Experimental Botany* 56: 2183-2193.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N., Yoshida, T. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2356-2368.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N., Hasegawa, Y. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4724-4732.
- Mayuoni, L., Tietel, Z., Patil, B.S., Porat, R. 2011. *Postharvest Biology and Technology* 62: 50-58.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109(3): 546-553.
- Mendes, A.F.S., Chen, C., Gmitter, F.G., Moore, G.A., Costa, M.G.C. 2011. *Physiologia Plantarum* 141: 1-10.
- Meredith, F.I. y Young, R.H., 1969. *Proceeding of the 1<sup>st</sup> International Citrus Symposium* 1: 271-276.
- Mesejo, C., Gambetta, G., Gravina, A., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Agustí, M. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 520-525.
- Monselise, S.P. y Halevy, A.H. 1961. *Science* 133: 1478.
- Oberholster, R., Cowan, A.K., Molnar, P., Toth, G. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 303-307.
- Pan, Z., Liu, Q., Yun, Z., Guan, R., Zeng, W., Xu, Q., Deng, X. 2009. *Proteomics* 9: 5455-5470.
- Pan, Z., Zeng, Y., An, J., Ye, J., Xu, Q., Deng, X. 2012. *Journal of Proteomics* 75: 2670-2684.
- Poiroux-Gonord, F., Fanciullino, A.L., Poggi, I., Urban, L. 2012. *Physiologia Plantarum* 147: 417-431.
- Pons, E., Alquézar, B., Rodríguez, A., Martorell, P., Genovés, S., Ramón, D., Rodrigo, M.J., Zacarías, L., Peña, L. 2014. *Plant Biotechnology Journal* 12: 17-27.
- Porat, R. 2008. *Tree Forest Science and Biotechnology* 2: 71-76.

## REFERENCIAS

- Porras, I., Brotons, J.M., Conesa, A., Manera, F.J. 2014. *Scientia Horticulturae* 173: 45-53.
- Ríos, G., Naranjo, M., Rodrigo, M.J., Alós, E., Zacarías, L., Cercós, M., Talón, M. 2010. *BMC Plant Biology* 10: 276.
- Riov, J. y Yang, S.F. 1982. *Plant Physiology* 69: 687-690.
- Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Alférez, F., Mallent, M.D., Zacarías, L. 2003. *Journal of Experimental Botany* 54: 727-738.
- Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Zacarías, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6724-6731.
- Rodrigo, M.J., Alquézar, B., Zacarías, L. 2006. *Journal of Experimental Botany* 57: 633-643.
- Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. 2007. *Postharvest Biology and Technology* 43: 14-22.
- Rodrigo, M.J., Alquézar, B., Alós, E., Lado, J., Zacarías, L. 2013. *Scientia Horticulturae* 163: 42-62.
- Rodrigo, M.J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., Al-Babili, S., Zacarías, L. 2013a. *Journal of Experimental Botany* 64: 4461-4478.
- Romero, P., Lafuente, M., Rodrigo, M.J., 2012. *Journal of Experimental Botany* 63: 4931-4945.
- Ruiz-Sola, M.Á., Rodríguez-Concepción, M. 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 10: e0158.
- Sonnen, H.D., Lenz, F., Gross, J. 1979. *Gartenbauwiss* 44: 49-52.
- Stearns, C.R., Young, G.T., 1942. *Proceedings Florida State Horticultural Society* 55: 59-61.
- Stewart, I. y Wheaton, T.A. 1972. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 448-449.
- Stewart, I. y Wheaton, T.A. 1973. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Citrus Congress* 3: 325-330.
- Tao, N., Hu, Z., Liu, Q., Xu, J., Cheng, Y., Guo, L., Guo, W., Deng, X. 2007. *Plant Cell Reports* 26: 837-843.
- Tao, N., Wang, C., Xu, J., Cheng, Y. 2012. *Plant Cell Reports* 31: 1667-1676.
- Tietel, Z., Lewinsohn, E., Fallik, E., Porat, R. 2012. *Postharvest Biology and Technology* 64: 175-182.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Rodríguez-Concepción, M. 2010. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11626-11631.
- Uchida, M., Yoshinaga, K., Kawasae, K. 1985. *Chinese Journal of Applied Ecology* 14: 1833-1836.

## REFERENCIAS

- Van Wyk, A.A., Huysamer, M., Barry, G.H. 2009. *Postharvest Biology and Technology* 53: 109-116.
- Wallace, A. 1953. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 61: 89-94.
- Walter, M. H. y Strack, D. 2011. *Natural Products Reports* 28: 663-692.
- Wei, X., Chen, C., Yu, Q., Gady, A., Yu, Y., Liang, G., Gmitter, F.G. 2014. *Plant Science* 227: 28-36.
- Wei, X., Chen, C., Yu, Q., Gady, A., Yu, Y., Liang, G., Gmitter, F.G. 2014a. *Tree Genetics Genomes* 10: 439-448.
- Xu, C.J., Fraser, P.D., Wang, W.J., Bramley, P.M. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5474-5481.
- Xu, J., Tao, N., Liu, Q., Deng, X. 2006a. *Scientia Horticulturae* 108: 181-184.
- Xu Q, Yu K, Zhu A, Ye J, Liu Q, Zhang J, Deng X. 2009. *BMC Genomics* 10: 540.
- Young, L.B. y Erickson, L.C. 1961. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 78: 197-200.
- Zeng, Y., Pan, Z., Ding, Y., Zhu, A., Cao, H., Xu, Q., Deng, X. 2011. *Journal of Experimental Botany* 62: 5297-5309.
- Zeng, W., Xie, Z., Yang, X., Ye, J., Xu, Q., Deng, X. 2013. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 113: 449-458.
- Zhang, L., Ma, G., Shirai, Y., Kato, M., Yamawaki, K., Ikoma, Y., Matsumoto, H. 2012. *Planta* 236: 1315-1325.
- Zhang, L., Ma, G., Kato, M., Yamawaki, K., Takagi, T., Kiriwa, Y., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Yoshioka, T., Nesumi, H. 2012a. *Journal of Experimental Botany* 63: 871-886.
- Zhou, J.Y., Sun, C.D., Zhang, L.L., Dai, X., Xu, C.J., Chen, K.S. 2010. *Scientia Horticulturae* 126: 229-235.

# BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN AZAFRÁN

Oussama Ahrazem, Ángela Rubio-Moraga, Lourdes Gómez-Gómez



### RESUMEN

El estigma de *Crocus sativus* acumula elevadas cantidades de apocarotenoides glucosilados característicos del género *Crocus*, que son los responsables del color, sabor y aroma de la especia azafrán, constituida por los estigmas deshidratados y tostados de *C. sativus*. Estos compuestos se generan a partir de la ruptura oxidativa de compuestos carotenoides seguida de deshidrogenaciones y glucosilaciones catalizadas por deshidrogenasas y glucosiltransferasas específicas, respectivamente. La biosíntesis de los carotenoides y su regulación durante el desarrollo del estigma de *C. sativus* es un proceso complejo que se produce a lo largo del desarrollo del estigma y que se traduce en un cambio en las propiedades organolépticas de este tejido hasta alcanzar el momento de antesis, cuando tiene lugar la recogida y transformación de la especia. El patrón de expresión de los genes implicados en la generación de estos apocarotenoides glucosilados y de sus precursores, los carotenoides, varía a lo largo del desarrollo del estigma, y la regulación de dicha expresión es uno de los principales mecanismos

de control de los niveles de apocarotenoides en este tejido. En *C. sativus* las enzimas de ruptura de carotenoides son especialmente importantes debido a su implicación directa en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Algunas de estas enzimas han sido recientemente caracterizadas en el estigma de *C. sativus*, demostrándose su implicación en la generación de diferentes compuestos volátiles. La comparación del transcriptoma de las distintas etapas de desarrollo del estigma del azafrán ha permitido la identificación de los posibles genes candidatos implicados en la biosíntesis de apocarotenoides y compuestos relacionados con el azafrán.

## LA PLANTA *CROCUS SATIVUS*

La planta *Crocus sativus* L. (figura 1) es una monocotiledonea vulgarmente conocida como azafrán. Es una pequeña bulbosa, que florece en otoño, estéril, propagada y cultivada a través de sus cormos (figura 1) desde la edad del bronce (Negbi *et al.*, 1989). Los estigmas desecados de esta planta constituyen la especia azafrán, que ha sido empleada como agente colorante y aromatizante desde la Antigüedad y que actualmente es considerada como una de las especias más caras del mundo, conocida como "oro rojo" (figura 1). Los compuestos responsables de las propiedades organolépticas de la especia son derivados oxidados de carotenoides: las crocinas, derivados glucosilados del apocarotenoide crocetina, confieren la coloración roja del estigma y de la especia; la picocrocina, derivado glucosilado del hidroxib- $\beta$ -ciclocitral confiere el sabor amargo de la especia, y su degradación genera azafrán el responsable del aroma.

El azafrán florece una vez al año durante el otoño (octubre-noviembre), de cada una de las yemas apicales del cormo



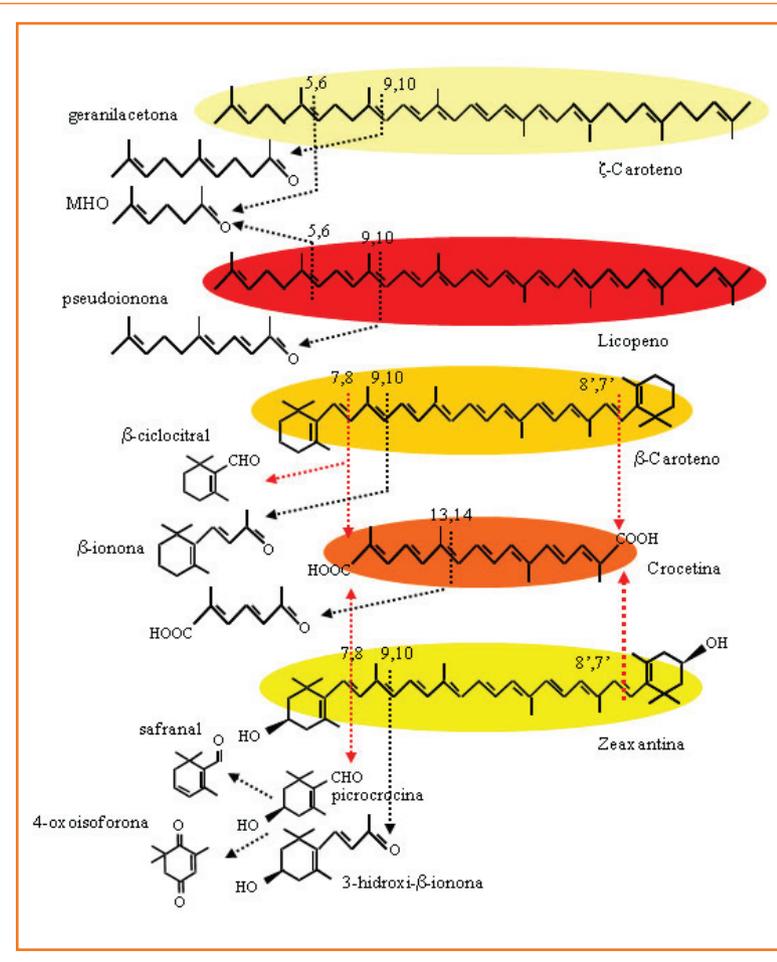
**FIGURA 1.** Los estigmas de la flor de *Crocus sativus* deben su fuerte color rojo a la acumulación de apocarotenoides; a) flor de *C. sativus*, b) cormos de *C. sativus*, c) estigmas de *C. sativus*, su tostado da lugar al denominado azafrán hebra.

(de una a tres) pueden surgir de una a tres flores, que tienen una duración aproximada de tres días, tras este periodo las flores comienzan a marchitarse y se inicia la senescencia de toda la flor, que va acompañada de una movilización de los pigmentos apocarotenoides desde el estigma hacia el cormo hijo en desarrollo (Moraga *et al.*, 2009; Rubio-Moraga *et al.*, 2010). Esta etapa va seguida de una fase vegetativa a lo largo del invierno, produciéndose el desarrollo completo de las hojas y de los cormos hijos en la base de los brotes (Molina *et al.*, 2004). Durante los meses de abril a mayo se produce la senescencia de las hojas y del cormo madre, mientras que los cormos hijos, ya desarrollados, entran en una fase de dormancia. Durante los siguientes 40 días no se aprecia cambio en el tamaño del cormo ni señales de desarrollo a nivel de su yema apical. Al inicio del mes de julio comienza la transición de la fase vegetativa a la reproductiva,

con la formación en la yema apical de los primordios foliares. A mitad del mes de julio se inicia un desarrollo acelerando de las brácteas que crecen envolviendo la yema apical y protegiéndola. Durante este periodo comienza la formación del primordio floral, y son los estambres los primeros en iniciarse, seguidos del perianto y del ginoecio. A finales del mes de agosto todas las partes de la flor se encuentran perfectamente diferenciadas (Molina *et al.*, 2005) y su crecimiento comenzará a acelerarse a finales de septiembre, para al final de este mes y comienzo del mes de octubre iniciarse la floración, y un nuevo ciclo vital.

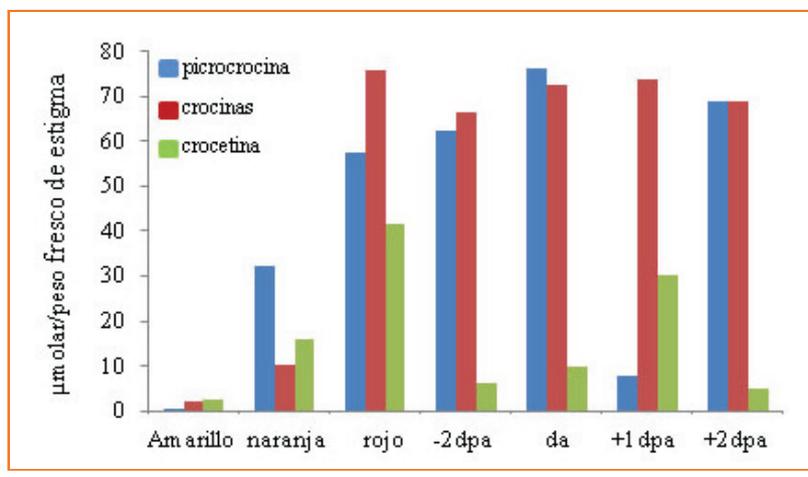
## NIVELES DE CAROTENOIDES Y APOCAROTENOIDES EN EL ESTIGMA. CROMOPLASTOS Y VACUOLAS

El proceso de biosíntesis de carotenoides y apocarotenoides en el estigma de azafrán se inicia en los estadios más tempranos del desarrollo de la flor (Castillo, Fernández y Gómez-Gómez, 2005). En su momento más temprano de desarrollo, a inicios de septiembre, el estigma presenta un color blanco y se caracteriza por la presencia de amiloplastos en el interior de sus células. Conforme se desarrollan la flor y el estigma, se produce un incremento en la concentración de carotenoides y apocarotenoides (Moraga *et al.*, 2009) y se produce un cambio en la coloración desde el amarillo, pasando por el naranja y el rojo y para alcanzar un color escarlata intenso en el estigma ya desarrollado (Rubio *et al.*, 2008). Este proceso va acompañado de una diferenciación de los amiloplastos en cromoplastos, sin pasar por un estadio de cloroplastos. En los estadios más avanzados del desarrollo del estigma se observa una ausencia de amiloplastos y una elevada presencia de cromoplastos de estructura tubular, que muestran numerosos



**FIGURA 2.** Apocarotenoides y otros compuestos detectados en el estigma de *Crocus sativus* y sus moléculas carotenoides precursoras. La generación de estos compuestos se debe a la ruptura oxidativa de los dobles enlaces de los compuestos carotenoides, catalizada por las dioxigenasas de rotura de carotenoides.

plastoglóbulos y vesículas (Grilli-Caiola y Canini, 2004), en los que se acumulan los pigmentos carotenoides. Los carotenoides más abundantes presentes a lo largo del desarrollo del estigma son el β-caroteno y la zeaxantina (Castillo *et al.*, 2005). En



**FIGURA 3.** Evolución de los crocetina, crocinas y picrocrocina del azafrán a lo largo del desarrollo del estigma. -2dpa, dos días antes de la antesis; da, día de antesis; +1 dpa, un día después de la antesis; +2dpa, dos días después de la antesis.

los estadios más tempranos del desarrollo se acumulan los precursores del  $\beta$ -caroteno, que comienza a ser mayoritario en los estadios intermedios del desarrollo del estigma, mientras que en los estadios más maduros es la zeaxantina el principal carotenoide presente. Las clases de carotenoides presentes se relacionan directamente con el tipo de apocarotenoides que comienzan a sintetizarse y acumularse a lo largo del desarrollo del estigma (Moraga *et al.*, 2009) (figura 2). El estigma inmaduro de color amarillo contiene niveles muy bajos de crocetina, crocinas (apocarotenoides) y picrocrocina (figura 3). Los niveles de estos compuestos se detectan también en el estadio naranja, incrementándose rápidamente en el estadio rojo y en los subsiguientes estadios de desarrollo. Los niveles más elevados de crocetina se detectan en el estadio rojo, junto con las crocinas C1 (crocetin b-D-glucosil éster) y C2 (crocetin b-D-gentibiosil éster). Sin embargo, las crocinas

con mayor grado de glucosilación, crocinas C3 (crocetin b-D-gentibiosil-b-D-glucosil éster), C4 (crocetin di-(b-D-gentibiosil) éster) y C5 (crocetin tres-(b-D-glucosil)-b-D-gentibiosil éster) alcanzan sus niveles más elevados en los siguientes estadios del desarrollo, permaneciendo a concentraciones más o menos estables durante estos estadios más maduros del desarrollo del estigma. A diferencia de los carotenoides, que se acumulan en el interior de los cromoplastos en el estigma, los apocarotenoides glucosilados del azafrán se acumulan en las vacuolas, que en los estadios más desarrollados del estigma ocupan prácticamente toda la célula (Grilli-Caiola y Canini, 2004). Este proceso de transporte de las crocinas hacia la vacuola se desconoce por completo, asimismo si es la crocetina o bien las crocinas de bajo grado de glucosilación las que son transportadas fuera del cromoplasto, glucosiladas en el citoplasma y desde éste transportadas hacia la vacuola para su almacenamiento.

### COMPUESTOS VOLÁTILES DERIVADOS DE CAROTENOIDES EN EL ESTIGMA DE AZAFRÁN

Además de apocarotenoides (crocetinas y crocinas), también se producen derivados volátiles de carotenoides desde los estadios más tempranos del desarrollo del estigma, que alcanzan los niveles más elevados cuando se produce la apertura de la flor (figura 4) (Moraga *et al.*, 2009). Algunos de estos volátiles se sintetizan como precursores glucosilados, como la picrocrocina, precursora del safranal y de otros volátiles derivados. Entre estos volátiles resultan de especial interés el HTTC, el b-ciclocitral, y la b-ionona, estos dos últimos con patrones complementarios de biosíntesis durante el desarrollo del estigma. El hidroxib-ciclocitral, resultante de

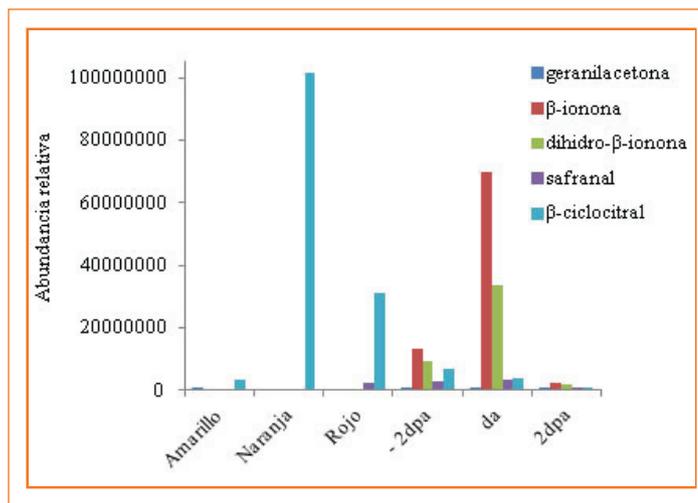
la ruptura oxidativa en los enlaces 7,8;7',8' de la zeaxantina, presenta un patrón de acumulación similar al de su derivado glucosilado, la picrocrocina, y alcanza el máximo de acumulación en el estadio previo a la antesis y en el momento de antesis, si bien siempre a niveles muy inferiores a los de la picrocrocina, lo que sugiere que el proceso de glucosilación de este metabolito es muy efectivo y resulta en un elevado grado de acumulación de picrocrocina. El  $\beta$ -ciclocitral, resultante de la ruptura en los enlaces 7,8;7',  $\beta$  8' del  $\beta$ -caroteno, alcanza su máximo de emisión en el estadio naranja del estigma, y su producción es una prueba directa del empleo del  $\beta$ -caroteno como precursor en la biosíntesis de la crocetina (Moraga *et al.*, 2009). La  $\beta$ -ionona y la hidroxio- $\beta$ -ionona, resultantes de la ruptura oxidativa de los enlaces 9,10; 9',10' del  $\beta$ -caroteno y de la zeaxantina, respectivamente, alcanzan sus niveles máximos en el momento de antesis, y dicha emisión podría encontrarse relacionada con la atracción de insectos polinizadores (Rubio *et al.*, 2008). El safranal, derivado de la picrocrocina, no se encuentra entre los volátiles producidos a niveles elevados a lo largo del desarrollo del estigma (figura 4), ni en el momento de la antesis, a diferencia de lo observado en el azafrán especia, lo que sugiere que la producción de este apocarotenoide resulta del procesamiento al que se ve sometido el azafrán para la producción de la especia. Sin embargo, se detectan niveles elevados de otros

compuestos relacionados con el safranal, como el compuesto 2,2,2-trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona (4-oxoisoforona) cuyos niveles alcanzan sus máximos en el momento de la antesis y en el estigma en senescencia (Moraga *et al.*, 2009).

## BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN AZAFRÁN: UNA RUTA ESPECÍFICA DE CROMOPLASTOS

En las plantas superiores, los carotenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se producen en los plastidios por la ruta MEP (véase el capítulo 9, "Biosíntesis de carotenoides: consideraciones generales"). Estudios recientes sugieren la presencia de una ruta de biosíntesis de carotenoides específica de los cromoplastos, que incrementaría la carotenogénesis y la pigmentación en frutos y flores. Esta ruta se habría generado a

partir de la duplicación de genes carotenogénicos específicos, cuya expresión está restringida a los cromoplastos. En muchas plantas se han identificado dos o más genes que codifican para GGPS, PSY, LYC, y CHY. Para cada una de estas enzimas, una isoforma se encuentra constitutivamente expresada en hojas, mientras que otra es específica de cromoplastos en flores y frutos (Galpaz *et al.*, 2006). En *C. sativus* dos genes codifican para la PSY (Moraga *et al.*, 2009), la CHY (Castillo, Fernández y Gómez-Gómez,



**FIGURA 4.** Evolución de compuestos volátiles derivados de carotenoides a lo largo del desarrollo del estigma. -2dpa, dos días antes de la antesis; da, día de antesis; +1dpa, un día después de la antesis; 2dpa, dos días después de la antesis.

2005) y para la LCY (Ahrazem *et al.*, 2010) y se ha observado una expresión específica en los cromoplastos para cada uno de los genes duplicados que codifican para estas enzimas carotenogénicas. La presencia de esta ruta específica de biosíntesis de carotenoides en los cromoplastos de los estigmas de *C. sativus* podría desempeñar un papel importante respecto a la acumulación de carotenoides en estos órganos. Sin embargo, los niveles de carotenoides en el estigma desarrollado son muy inferiores a los esperados, en comparación con la masiva acumulación de productos obtenidos por su ruptura, lo que sugiere un elevado flujo en la ruta de biosíntesis de carotenoides hacia la biosíntesis de apocarotenoides y otros derivados y el importante papel desempeñado por las enzimas de ruptura de carotenoides en este proceso.

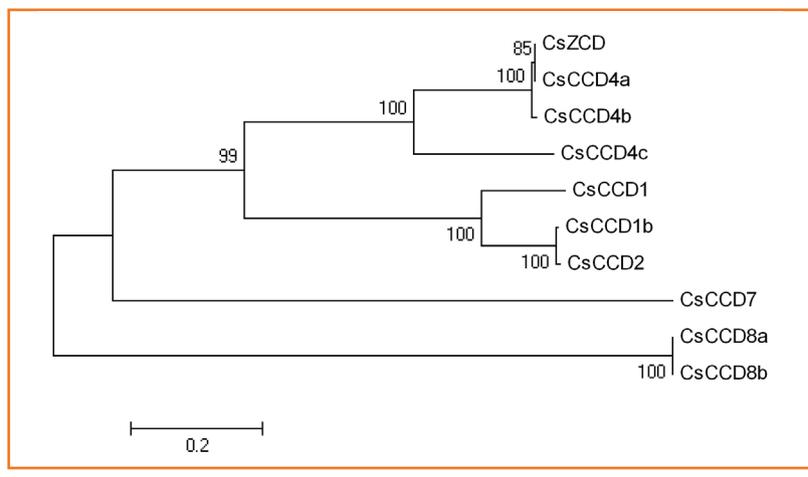
### REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES DURANTE EL DESARROLLO DEL ESTIGMA

La regulación transcripcional de la ruta de carotenoides específica de los cromoplastos parece ser el principal mecanismo de control que regula la biosíntesis y acumulación de carotenoides en el estigma del azafrán. Durante el desarrollo de los estigmas de *C. sativus*, el gen que codifica la enzima 1-deoxilulosa-5-fosfato sintasa, DXS, la primera enzima específica de la ruta MEP, se expresa a niveles relativamente elevados en todos los estadios del desarrollo, mientras que el gen que codifica la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, HMGR, la enzima que cataliza la tercera etapa de la ruta MVA, se expresa a niveles más bajos. Estos resultados indican que la DXS tiene una función importante en el control de la biosíntesis de isoprenoides en el estigma, caracterizado por altos niveles de apocarotenoides.

En el estigma de *C. sativus* los niveles de expresión de los genes *CsPSY* y *CsPDS* son relativamente bajos en los estadios iniciales del desarrollo y alcanzan los niveles más elevados en el estadio rojo y durante la pre-antesis. Por el contrario, los niveles transcripcionales de los genes que codifican para *CsLYCb2* y la *CsCHY1* son mucho más elevados y comienzan a acumularse a partir del estadio naranja, alcanzando sus máximos en el estigma rojo y escarlata, de acuerdo con la producción y acumulación en estos estadios del  $\beta$ -caroteno y de la zeaxantina (Castillo *et al.*, 2005). De especial interés resulta la regulación del gen *CsLYCb2* específico de cromoplastos en el estigma de azafrán. La presencia de este gen está directamente relacionada con los niveles de apocarotenoides en los estigmas de las distintas especies de *Crocus*. La ausencia de este gen en determinadas especies se relaciona con la ausencia de crocinas (Ahrazem *et al.*, 2010). Los niveles de apocarotenoides en las distintas especies también se encuentran relacionados con los niveles de expresión del gen *CsCHY1* (Castillo *et al.*, 2005), por lo que la regulación de la transcripción de ambos genes es clave en el control de la biosíntesis de apocarotenoides en el estigma y constituirían las etapas limitantes en la biosíntesis de apocarotenoides y sus precursores en el estigma.

### REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE APOCAROTENOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL ESTIGMA

El primer gen identificado que codifica para una dioxigenasa de ruptura de carotenoides (CCD) fue en maíz, a partir de la caracterización del mutante VIVIPAROUS14 (Vp14) deficiente en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) (Schwartz *et al.*,



**FIGURA 5.** Relaciones filogenéticas de las distintas CCD identificadas en el estigma de azafrán.

1997). La enzima VP14 reconoce y corta los dobles enlaces 11,12 de los epoxicarotenoides (9'Z)-neoxantina o (9Z)-violaxantina y se clasifica como una 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Schwartz *et al.*, 1997), para constituir una subclase especial de la gran familia de CCD. Desde el descubrimiento de Vp14, muchas otras CCD se han identificado y caracterizado, y se encuentran implicadas en la biosíntesis de distintos apocarotenoides diferentes del ABA, y nombradas todas ellas CCD. En plantas, las CCD se distribuyen en cuatro subfamilias: CCD1, CCD4, CCD7 y CCD8, y para cada una de ellas se han identificado homólogos en el estigma de *C. sativus* (figura 5). El primer miembro de la subfamilia de las CCD1 fue identificado en *Arabidopsis thaliana* (Schwartz, Qin y Zeevaart, 2001). Las enzimas CCD1 reconocen distintos sustratos carotenoides cortando en diferentes posiciones. Reconocen los dobles enlaces 5,6 o 5',6' de los carotenos lineales que generan el compuesto

volátil C8 cetona 6-metil-5-hepten-2-ona (Vogel *et al.*, 2008) (figura 2) o los dobles enlaces 7,8 y 7',8' que generan geranial (Ilg, Beyer y Al-Babili, 2009). CCD1 reconoce carotenoides ciclados cortando simétricamente en los dobles enlaces 9,10 y 9',10' que generan C14 dialdehídos, comunes a todos los sustratos cíclicos que reconoce, y dos grupos variables procedentes de los extremos de sus sustratos de tipo C13 cetona, como el  $\beta$ -ionona, la  $\alpha$ -ionona, la pseudoionona y geranilacetona (Schwartz, Qin y Zeevaart, 2001) (figura 2). En azafrán se han aislado y caracterizado dos enzimas de tipo CCD1, CsCCD1a y CsCCD1b (Bouvier *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2008). Ambas enzimas se expresan en los estigmas de *C. sativus*, aunque difieren en su patrón de expresión. Los niveles de expresión de CsCCD1a se mantienen prácticamente constantes a lo largo de todo el desarrollo del estigma, excepto en el estigma en senescencia, donde no se detecta expresión. Por el contrario, CsCCD1b se expresa únicamente en los estadios más inmaduros del estigma, y es indetectable en el estigma escarlata. Además, este gen es específico del estigma, a diferencia de CsCCD1a, y su patrón de expresión bien podría estar relacionado con la regulación de los genes carotenogénicos en azafrán, como se ha sugerido que sucede en el fruto de tomate (Simkin *et al.*, 2004).

El primer miembro de la subfamilia CCD4 se caracterizó en azafrán (Rubio *et al.*, 2008). Estas enzimas no reconocen carotenos lineales y sólo actúan sobre carotenoides ciclados, reconociendo y cortando simétricamente en los dobles enlaces 9,10; 9',10'. La CCD4 de azafrán parece ser mucho más activa que la CsCCD1a (Rubio *et al.*, 2008), lo que viene a reforzar la idea de que las enzimas CCD1 tiene como sustratos naturales compuestos apocarotenoides en vez de carotenoides (Walter, Floss y Strack, 2010). Además, mientras que las enzimas CCD4 se localizan en los plastoglobulos, en el interior de los

cromoplastos (Rubio *et al.*, 2008), las enzimas CCD1 son citosólicas, por lo que su actividad se limita a carotenoides y derivados presentes en el citosol (Auldridge *et al.*, 2006; Simkin *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2003). La presencia en los cromoplastos de las enzimas CCD4 permite a estas enzimas acceder directamente a sus sustratos carotenoides, sintetizados en este compartimento celular. En azafrán se han identificado un total de cuatro genes que codifican para enzimas de la subfamilia CCD4: CsCCD4a, CsCCD4b, CsCCD4a-t y CsCCD4c (Ahrazem *et al.*, 2010a; Rubio *et al.*, 2008). El gen *CsCCD4a-t* es un pseudogen, cuya expresión no se ha detectado en el estigma de azafrán, que genera una proteína truncada en su extremo C-t. Los genes que codifican para CsCCD4a y b presentan una gran similitud de secuencia, y se consideran como variantes alélicas, dado el carácter triploide de *C. sativus*. Ambos genes alcanzan sus niveles máximos de expresión en el estadio escarlata, lo que coincide con la mayor acumulación de sus productos de reacción, procedentes del corte simétrico en los dobles enlaces 9,10;9',10' del  $\beta$ -caroteno y de la zeaxantina (Rubio *et al.*, 2008) (figura 2). El gen *CsCCD4c* presenta los niveles más bajos de expresión en el estigma, pero a diferencia de *CsCCD4a* y *CsCCD4b* que se expresan en otros tejidos de la flor, la expresión de *CsCCD4c* se encuentra restringida al estigma (resultados no publicados) al igual que *CsCCD1b*.

Las enzimas CsCCD4a (580 aa) y CsCCD4b (569 aa) muestran 98% de similitud en los 369 residuos aminoácidos de la enzima CsZCD (369 aa) (Bouvier *et al.*, 2003). Inicialmente considerada como la enzima responsable de la biogénesis de la crocetina en *C. sativus*, sin embargo, las secuencias de CsCCD4a y b son 200 aminoácidos más largas que CsZCD, siendo esta enzima una secuencia truncada en su extremo N-t. La carencia de estos 200 aminoácidos en CsZCD, implica la imposibilidad

de un plegamiento adecuado, así como la ausencia de importantes residuos para la actividad dioxigenasa (Kloer y Schulz, 2006), como lo demuestran distintos estudios (Rubio *et al.*, 2008; Sergeant *et al.*, 2009). CsCCD4a y CsCCD4b tienen una actividad 9,10;9',10' y carecen de actividad 7,8;7',8' necesaria para la formación de crocetina.

Las enzimas CCD7 y CCD8 se encuentran implicadas en la generación de la hormona estrigolactona, implicada en el control de la dominancia apical y en la comunicación de las plantas en la rizosfera (Walter, Floss y Strack, 2010). CCD7 y CCD8 se encuentran conservadas en las distintas especies vegetales, incluyendo las monocotiledóneas, y parecen catalizar reacciones secuenciales de corte. AtCCD7 presenta regioselectividad por las posiciones 9,10, cortando asimétricamente sus sustratos, para generar los productos  $C_{13}$  y  $C_{27}$  (Schwartz, Qin y Loewen, 2004). CCD8 actúa sobre el producto  $C_{27}$  generado por CCD7 (Alder *et al.*, 2008; Schwartz, Qin y Loewen, 2004), pero también es capaz de actuar directamente sobre otros sustratos carotenoides (Auldridge *et al.*, 2006). En los estigmas de *C. sativus* se han identificados los genes que codifican para CCD7 y CCD8 (Rubio-Moraga *et al.*, 2014). Ambas enzimas se localizan en los cromoplastos, al igual que las CCD4, y la inexistencia de estrigolactonas en el estigma sugiere que estas enzimas están implicadas en la generación de otros compuestos apocarotenoides.

Teniendo en cuenta la estructura de las crocinas y del safranal, se propuso que estos compuestos se derivaban de la zeaxantina mediante la ruptura oxidativa de sus dobles enlaces 7,8;7',8' (Pfander y Schurtenberger, 1982). Estudios más recientes han mostrado que la biogénesis de la crocetina puede tener también al  $\beta$ -caroteno como molécula precursora (Moraga *et al.*, 2009). A pesar de la abundancia de las

crocinas en el estigma, la enzima implicada en su biosíntesis permanece sin identificarse, debido a varios motivos, entre los que se incluyen que *C. sativus* no se encuentra dentro del conjunto de plantas modelo, caracterizadas en su mayoría por la baja acumulación de metabolitos secundarios de interés biotecnológico. Otro inconveniente es que *C. sativus* es estéril, y se propaga de forma vegetativa desde hace siglos, por lo que puede considerarse como un clon, y no se conoce la existencia de variedades ni mutantes respecto a la acumulación y producción de compuestos carotenoides y sus derivados que pudieran ser relevantes para la identificación de las enzimas clave implicadas en la producción de apocarotenoides en el estigma. Por último, cabe resaltar la baja homología de secuencia entre las distintas subfamilias de CCD, que hace muy difícil la búsqueda de nuevas CCD mediante las técnicas estándar de biología molecular. Por eso deben adoptarse nuevas estrategias de búsqueda, entre las que se contempla el análisis transcriptómico del estigma de *C. sativus* (D'Agostino *et al.*, 2007).

## GLUCOSILACIÓN DE LOS COMPUESTOS APOCAROTENOIDES EN *C. SATIVUS*

La etapa final de la biosíntesis de las crocinas en azafrán supone la transformación del apocarotenoide crocetina en sus formas solubles, las crocinas, mediante reacciones de transferencia de UDP-glucosa catalizadas por glucosiltransferasas específicas (UGT) (figura 6). Las UGT de plantas implicadas en la glucosilación de metabolitos secundarios se agrupan en una gran familia que se caracteriza por la presencia de un motivo altamente conservado próximo al extremo C-t implicado en la unión del azúcar (Hughes y Hughes, 1994).

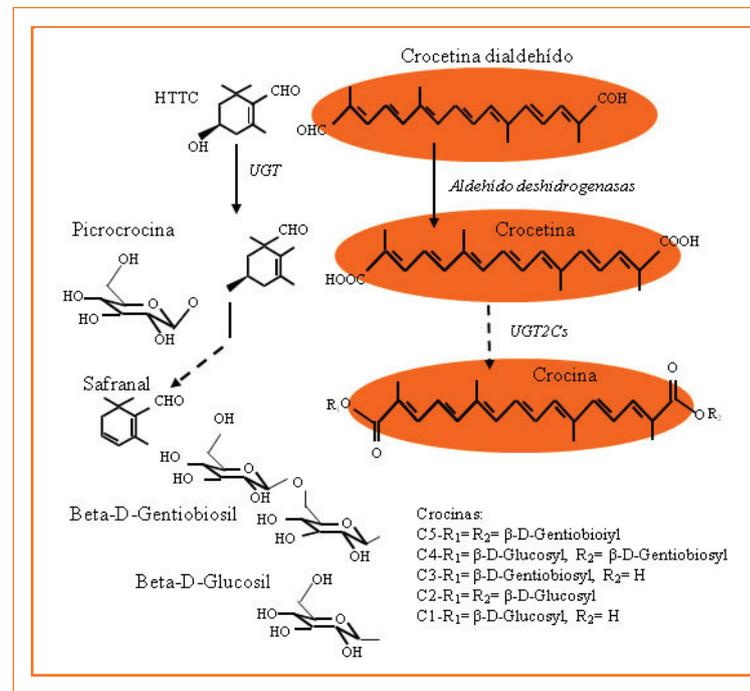


FIGURA 6. Ruta de biosíntesis de la picrocrocina y de las distintas crocinas presentes en el estigma de azafrán.

En 1997 Dufresne y colaboradores propusieron que el proceso de transformación de la crocetina en crocinas implica reacciones secuenciales catalizadas por dos glucosiltransferasas diferentes. Una UDP-glucosa: crocetinglucosilester 6''-O-glucosiltransferasa que cataliza la glucosilación de los dos extremos carboxílicos de la crocetina y una uridin-5'-difosfoglucosa (UDP-glucosa)-crocetina 8,8'-glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de moléculas de glucosa en los grupos hidroxilo de las glucosas unidas a la molécula de crocetina formando ésteres de gentobiosa (Côté *et al.*, 2001). Hasta la fecha, se ha caracterizado una única UGT en azafrán capaz de glucosilar *in*

*vitro* la crocetina y la crocina, denominada UGTCS2 (Moraga *et al.*, 2004) (figura 6). Esta enzima es capaz de añadir hasta 12 moléculas de glucosa sobre una molécula de crocetina, y se han identificado crocinas con hasta 10 moléculas de glucosa en otras especies de *Crocus* (Rubio-Moraga *et al.*, 2013). El patrón de expresión del gen que codifica para esta enzima en el estigma de *C. sativus* es similar al patrón de acumulación de crocinas.

Se desconoce por el momento la enzima implicada en la formación de picrocrocina, y también aquellas UGT que glucosilan otros derivados de carotenoides minoritarios presentes en el estigma de azafrán. Entre ellos se encuentran un éster de monogentiobiosa, relacionado estructuralmente con la crocina, que podría formarse a partir del corte de la zeaxantina o del  $\beta$ -caroteno en las posiciones 7,8 y 13,14 (Straubingerr *et al.*, 1998); la  $\beta$ -D-glucopiranosido (4R)-4-hidroxi-3,5,5-termetilciclohex-2-enona, la (4S)-4-hidroxi-3,5,5-termetilciclohex-2-enona, y la (4S)-4-hidroximetil-3,5,5-termetilciclohex-2-enona, junto con otros siete compuestos relacionados con otros identificados previamente en otras especies vegetales (Straubingerr *et al.*, 1998).

## LAS RESPUESTAS DEL TRANSCRIPTOMA

Con el objetivo de identificar las enzimas clave en la biosíntesis de la crocetina en *C. sativus*, se procedió a la elaboración de un transcriptoma de los distintos estadios de desarrollo del estigma de azafrán, perfectamente caracterizados en cuanto a la acumulación de los distintos carotenoides y compuestos derivados (Moraga *et al.*, 2009). A partir de este análisis, además de los ya identificados *CsCCD1a*, *CsCCD4a*, *CsCCD4b*, se aislaron dos nuevos alelos de *CsCCD4* y un

nuevo alelo de *CsCCD1b*, designado *CsCCD2*. Esta nueva dioxigenasa, al igual que *CsCCD1b*, se expresa en los estadios iniciales del estigma (Rubio *et al.*, 2008). *CsCCD1b* y *CsCCD2* muestran 97% de identidad a nivel de su secuencia de aminoácidos (figura 5). A pesar de este elevado grado de similitud, *CsCCD1b* corta en las posiciones 9,10;9',10' del  $\beta$ -caroteno (Rubio *et al.*, 2008), mientras que *CsCCD2* no reconoce como sustrato el  $\beta$ -caroteno, sólo reconoce la zeaxantina y la corta en las posiciones 7,8;7',8', y también reconoce a la luteína como sustrato (Frusciante *et al.*, 2014). La secuencia de aminoácidos de *CsCCD2* no parece presentar una señal clara de localización en plastidios, al igual que *CsCCD1b*; sin embargo, su actuación sobre carotenoides sugiere su presencia en estos suborgánulos, como es el caso de *CCD4* y de *NCED*. Será necesario realizar experimentos de localización para determinar dónde se encuentra la enzima.

El análisis del transcriptoma también ha permitido identificar nueve posibles aldehído deshidrogenasas implicadas en la transformación de crocetindial en crocetina. La caracterización de esta enzima está en marcha y pronto podremos conocer las enzimas implicadas en la ruta completa de la biosíntesis de la crocetina en *C. sativus*.

## CONCLUSIONES

Las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de apocarotenoides y compuestos relacionados tan característicos de esta planta y responsables de las propiedades organolépticas de la especia de mayor valor económico conocida actualmente se han caracterizado recientemente. La identificación y la regulación de estas enzimas las convierten en claras candidatas en aproximaciones biotecnológicas

para la modificación en distintas especies vegetales del contenido de carotenoides y derivados que, debido a sus efectos benéficos sobre la salud, contribuyen a incrementar el valor nutricional de los alimentos derivados de plantas que los contienen.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación de los proyectos BIO2003-05259 y BIO2006-00841.

## REFERENCIAS

- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Lopez, R.C., Gómez-Gómez, L. 2010. *J Exp Bot* 61: 105-119.
- Ahrazem, O., Trapero, A., Gómez, M.D., Rubio-Moraga, A., Gómez-Gómez, L. 2010a. *Genomics* 96: 239-250.
- Alder, A., Holdermann, I., Beyer, P. y Al-Babili, S. 2008. *Biochem J* 416: 289-296.
- Auldridge, M.E., Block, A., Vogel, J.T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2006. *Plant J* 45: 982-993.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., Camara, B. 2003. *Plant Cell* 15: 47-62.
- Castillo, R., Fernández, J.A. y Gómez-Gómez, L. 2005. *Plant Physiol* 139: 674-689.
- Côté, F., Cormier, F., Dufresne, C., Willemot, C. 2001. *Journal of Plant Physiology* 158: 553-560.
- D'Agostino, N., Pizzichini, D., Chiusano, M.L., Giuliano, G. 2007. *BMC Plant Biol* 7: 53.
- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., Rubio-Moraga, A., Beyer, P., Gómez-Gómez, L., Al-Babili, S., Giuliano, G. 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:12246-12251
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalfa, Z., Zamir, D., Hirschberg, J. 2006. *Plant Cell* 18: 1947-1960.
- Grilli-Caiola, M. y Canini, A. 2004. *Plant Biosystems* 138: 43-52.
- Hughes, J. y Hughes, M.A. 1994. *DNA Seq* 5: 41-49.
- Ilg, A., Beyer, P. y Al-Babili, S. 2009. *FEBS J* 276: 736-747.
- Kloer, D.P. y Schulz, G.E. 2006. *Cell Mol Life Sci* 63: 2291-2303.
- Molina, R., Valero, M., Navarro, Y., Garcia-Luis, A., Guardiola, J.L. 2004. *Scientia Horticulturae* 103: 79-91.
- Molina, R., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, J.L., Garcia-Luis, A. 2005. *Scientia Horticulturae* 103: 361-379.
- Moraga, A.R., Nohales, P.F., Perez, J.A., Gómez-Gómez, L. 2004. *Planta* 219: 955-966.
- Moraga, A.R., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A., Gómez-Gómez, L. 2009. *Phytochemistry* 70: 1009-1016.
- Negbi, M., Dagan, B., Dror, A., Basker, D. 1989. *Israel Journal of Botany* 38: 95-113.
- Pfander, H. y Schurtenberger, H. 1982. *Phytochemistry* 21: 1039-1042
- Rubio, A., Rambla, J.L., Santaella, M., Gómez, M.D., Orzaez, D., Granell, A., Gómez-Gómez, L. 2008. *J Biol Chem* 283: 24816-24825.

## REFERENCIAS

- Rubio-Moraga, A., Trapero, A., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L. 2010. *Phytochemistry* 71: 1506-1513.
- Rubio-Moraga, A., Ahrazem, O., Rambla, J.L., Granell, A., Gómez Gómez, L. 2013. *PLoS One* 8: e71946.
- Rubio-Moraga, A., Ahrazem, O., Perez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A., Yoneyama, K., López-Ráez, J.A., Molina, R.V., Gómez-Gómez, L. 2014. *BMC Plant Biol* 14: 171.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., McCarty, D. R. 1997. *Science* 276: 1872-1874.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Zeevaart, J.A. 2001. *J Biol Chem* 276: 25208-25211.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Loewen, M.C. 2004. *J Biol Chem* 279: 46940-46945.
- Sergeant, M.J., Li, J.J., Fox, C., Brookbank, N., Rea, D., Bugg, T.D., Thompson, A.J. 2009. *J Biol Chem* 284: 5257-5264.
- Simkin, A.J., Schwartz, S.H., Aldridge, M., Taylor, M.G., Klee, H.J. 2004. *Plant J* 40: 882-892.
- Straubingerr, M., Bau, B., Eckstein, S., Fink, M., Winterhalter, P. 1998. *Journal Agriculture Food Chemistry* 46: 3238-3243
- Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., McCarty, D.R. 2003. *Plant J* 35: 44-56.
- Vogel, J.T., Tan, B.C., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2008. *J Biol Chem* 283: 11364-11373.
- Walter, M.H., Floss, D.S. y Strack, D. 2010. *Planta* 232: 1-17.

## CAPÍTULO 14

# AVANCES BIOTECNOLÓGICOS PARA POTENCIAR LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE *BIXA ORELLANA* (ACHIOTE) PARA SU USO Y APROVECHAMIENTO AGROINDUSTRIAL

Renata Rivera-Madrid, Gregorio Godoy-Hernández, Margarita Aguilar-Espinosa, Yair Cárdenas-Conejo, Luz Elena Garza-Caligaris, Eugenia Lugo-Cervantes



### INTRODUCCIÓN

En la industria alimenticia, los colorantes artificiales se utilizaron durante muchos años para reemplazar a los colorantes naturales. Debido a su estabilidad a temperaturas elevadas, los diversos lotes de productos procesados presentan mayor uniformidad en comparación con los colorantes naturales, que pueden modificarse durante el procesamiento de los alimentos. Sin embargo, el número de colorantes artificiales para alimentos se ha reducido drásticamente como resultado de los estudios toxicológicos y las legislaciones más estrictas en los países industrializados. Los consumidores también prefieren los colorantes naturales a los artificiales por considerarlos más seguros, de manera que el interés en la bixina (derivada de *B. orellana*) se ha incrementado y se comercializa en grandes cantidades en todo el mundo (Spears, 1988).

*Bixa orellana* es una especie perenne nativa de la región neotropical. Comúnmente se conoce como achiote; otros nombres que recibe son anato, uruku y uñañe (Arce,

1999). Tiene interés agroindustrial por su alto contenido de carotenoides y sus derivados, como la bixina. Este pigmento, de distintas tonalidades de rojo, naranja, y amarillo, carece de toxicidad y su poder colorante es alto. Se utiliza como colorante en muy diversos productos alimenticios, como lácteos, panadería, aceites vegetales y bebidas, entre otros.

La demanda del achiote como colorante comercial va en aumento en el mercado mundial y hoy se prefiere su uso con respecto a otros colorantes sintéticos de características similares presentes en el mercado (León, 1987). Su uso en alimentos procesados ha sido aprobado sin restricciones tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos.

Se calcula una producción mundial de semillas de achiote de 10 mil toneladas anuales (Leal y Clavijo, 2010), de las cuales dos terceras partes se comercializan como semillas y el resto como pigmento. América Latina produce 60% del achiote del mundo, seguida por África (27%) y Asia (12%). En México la producción total entre 2000 y 2014 fue en promedio de 576 toneladas, con una tendencia a la baja (Sinarefi, 2014), y la producción por hectárea fue de 0.96 ton/ha, insuficiente para cubrir la demanda nacional. Los precios de las semillas de achiote dependen del contenido del pigmento; para la exportación, este contenido debe ser mayor de 2.7 por ciento.

A la fecha son pocos los estudios científicos sobre este cultivo a pesar de su importancia económica y biológica. Existe una gran diversidad de morfotipos de achiote que varían en cuanto a la producción de semilla y pigmento. Los productores de este cultivo han desarrollado cierto tipo de selección de materiales con características fenotípicas de interés agronómico, pero no existen variedades certificadas. Estamos iniciando un programa científico de mejoramiento genético del achiote,

aunque aún no se dispone de una caracterización completa de los morfotipos que permita el registro de sus variedades.

Nuestro trabajo de investigación está enfocado a la implementación de herramientas biotecnológicas para la producción de achiote con mayores niveles de bixina y en mejorar la comprensión de los procesos y mecanismos moleculares de la biosíntesis de sus carotenoides. Esto requiere obtener la secuenciación de transcriptomas y genotecas de *B. orellana*. En colaboración con el grupo del doctor Luca Comai de la Universidad de California, en Davis, nos embarcamos en la tarea de iniciar la generación de los primeros transcriptomas de *B. orellana* usando nuevas tecnologías de secuenciación (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Mediante análisis bioinformático se podrán identificar y aislar los genes que nos permitan comprender mejor los mecanismos moleculares de la carotenogénesis y obtener los genes candidatos que favorecen o limitan la síntesis de la bixina y de otros carotenoides, con el fin de optimizar la mejora genética de este cultivo. Al mismo tiempo, se desea mejorar



la micropropagación mediante metodologías *in vitro* que reduzcan el tiempo del ciclo de vida de esta planta, así como propagar las plantas élite. El objetivo de nuestro programa de mejoramiento genético es ofrecer plantas de achiote con alto contenido de bixina y con frutos indehiscentes (Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

Actualmente también evaluamos la actividad antitumoral y antioxidante de las proteínas de almacenamiento de las semillas de *Bixa orellana* L. para obtener péptidos bioactivos y estudiar su actividad citotóxica y mitogénica.

Estas investigaciones contribuirán a aumentar la producción de achiote y de bixina para responder a la demanda de colorante a escala nacional e internacional.

## LA BIXINA Y OTROS CAROTENOIDES EN *BIXA ORELLANA*

### Propiedades generales de la bixina

La bixina es el principal pigmento rojo-naranja presente en el arilo o cubierta de las semillas del achiote (McKeown y Mark, 1962; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Es un apocarotenoide de 25 átomos de carbono con 9 dobles enlaces conjugados; su fórmula molecular empírica es  $C_{25}H_{30}O_4$ , y su nombre químico metil hidrógeno (9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato éster (Preston y Rickard, 1980), con peso molecular de 394.5 g/mol (Francis, 1987). Presenta un grupo carboxílico libre y otro esterificado, los cuales le confieren funciones como ácido orgánico, y proporcionan solubilidad y estabilidad a la molécula. Está indexado con el número 75120 (OMS-FAO, 1976). Los apocarotenoides son un grupo de derivados de

la ruptura oxidativa de carotenoides; la ruptura puede ocurrir al azar a través de la fotooxidación o la co-oxidación de la lipoxigenasa (Walter, Floss y Strack, 2010). También se ha propuesto, la ruptura enzimática de los carotenoides a través de carotenoide dioxigenasas (CCD) específicas (Vogel *et al.*, 2008; Walter, Floss y Strack, 2010). En algunos casos, los apocarotenoides se derivan de la partición enzimática del licopeno (Bouvier, Dogbo y Camara, 2003; Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011), como la bixina en la planta de anato o *B. orellana*.

La bixina presenta dos configuraciones estereoquímicas: *cis* (Z) de color naranja e insoluble en aceite vegetal y *trans* (todo-E) de color rojo y soluble en aceite (Francis, 1987). En condiciones normales, en los extractos predominan los isómeros Z de bixina, conocidos también como  $\alpha$ -bixina (Tong, 1984), y corresponde a 80% de los carotenoides totales presentes en las semillas (Preston y Rickard, 1980; Rivera-Madrid *et al.*, 2006). En solución el isómero Z de bixina calentado en aceite a 70°C para quitar el pericarpio y vuelto a calentar a 130°C a vacío pasa a la configuración todo-E, más estable (McKeown y Mark, 1962; Francis, 1987); sus isómeros tienen un máxima absorción a 500 nm y 470 nm en cloroformo (McKeown y Mark, 1962). Su punto de fusión es de 189.5 °C-198.5 °C, y el coeficiente de absorción para la bixina pura es:  $E^{1\%}(470) = 2.826 \text{ cm}$  en  $CHCl_3/10 \text{ mg}$  (Belmino dos Santos, 2007). Los pigmentos en las semillas de *B. orellana* pueden extraerse mediante procesos mecánicos a través de la molienda de las semillas y por métodos físico-químicos usando disolventes o enzimas (Mercadante *et al.*, 1996). La extracción mediante disolventes puede ser efectuada usando tres métodos básicos: a) la extracción alcalina (con soluciones de NaOH o KOH), la cual da como resultado la conversión de la bixina en norbixina (tanto isómeros Z como todo-E), soluble en agua y con peso molecular de 380.5 g/

mol (Francis, 1987); *b*) la extracción con aceites comestibles de soja (soya) o maíz (Freund, Washam y Maggion, 1988) es el método más empleado a escala industrial (Figueiredo, Oliveira y Queiroz, 2000), y *c*) la extracción con disolventes orgánicos (cloroformo, acetona, acetato de etilo, metanol, éter etílico, etanol anhidro, n-hexano, propilen glicol); con este método, las concentraciones de la bixina extraída y de los otros pigmentos presentes varían en relación con el disolvente usado (Belmino dos Santos, 2007). La estabilidad química de la bixina y otros pigmentos de las semillas se ve afectada por la luz, temperaturas altas (Bittencourt *et al.*, 2005), oxígeno y cambios de pH (Bittencourt *et al.*, 2005; Belmino dos Santos, 2007); no obstante es bastante resistente a ácidos, alcoholes y a la acción microbiana (Leal y Michelangeli, 2010).

### Síntesis de bixina

Jako *et al.* (2002) y Bouvier, Dogbo y Camara (2003) establecieron la ruta biosintética de bixina usando un sistema de expresión heterólogo. En este estudio se identificaron



tres genes en *Bixa orellana* que codifican las enzimas para sintetizar bixina a partir de licopeno: licopeno dioxigenasa (BoLCD), bixina aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y norbixina metiltransferasa (BonBMT). La mayoría de los estudios relacionados con la síntesis de bixina y su regulación se han hecho en semillas. Rodríguez-Ávila *et al.* (2011) demostraron que la bixina se encuentra también en todos los tejidos de la planta de *B. orellana* en estadios jóvenes y adultos; Rodríguez-Ávila *et al.* (2011a) también plantearon la posible participación de otras enzimas CCD que se encargan de realizar cortes oxidativos en el licopeno y que están implicadas en la producción de bixina en el achiote. Sin embargo, Rivera-Madrid *et al.* (2013) demostraron que la producción de bixina puede tener lugar aun en ausencia o escasa acumulación de licopeno, pues la biosíntesis de este pigmento puede tomar una ruta alternativa con ayuda de otros precursores y otras enzimas de la familia de las CCD.

### Otros apocarotenoides en *Bixa orellana*

Se han descubierto otros apocarotenoides en la cubierta de la semilla de *B. orellana*, como refieren Mercadante *et al.* (1996), quienes aislaron el apocaroteno metil (9'Z)-apo-6'-licopenoato. Algo más tarde, Mercadante, Steck y Pfander (1997) también aislaron trazas de otros cinco apocarotenos de la cubierta de la semilla de *B. orellana*, y establecieron además sus estructuras químicas; dos de ellos resultaron ser nuevos apocarotenoides: metil (7Z,9Z,9'Z)-apo-6'-licopenoato; metil (9Z)-apo-8'-licopenoato y metil (todo-E)-apo-8'-licopenoato. Los otros dos: (todo-E)-8'-apo-β-caroteno-8'-oato y el metil (todo-E)-apo-6'-licopenoato, no habían sido encontrados antes en achiote. Mercadante, Steck y Pfander (1999) también aislaron otros tres nuevos apocarotenoides en *B. orellana* L., el 6-geranilgeranil 8-metil-6,8'-diapocaroteno-6,8'dioato, el 6'-geranilgeranil

6'-metil (9Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato y el 6-geranilgeranil 6'-metil-6,6'-diapocaroteno-6-6'-dioato.

Además de la bixina y la norbixina, actualmente se han aislado más de dos docenas de sustancias de las semillas de *B. orellana* L. Entre estos compuestos están isobixin,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orellina (color amarillo) aislados por McKeown (1961) de extractos obtenidos con cloroformo. En extractos acuosos alcalinos de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>, Mercadante (2001), Taylor (2002) y Oliveira (2005) aislaron los compuestos Z-norbixin y (todo-E)-norbixin, bixeina, bixol, crocetina, ácido salicílico, treonina, triptófano y fenilalanina.

## USOS Y APLICACIONES

La *B. orellana* se ha utilizado desde épocas precolombinas con diversos fines: alimenticios, medicinales, colorante de alimentos, cerámica y pieles, y como ornamento. Su uso y cultivo se extiende desde Paraguay hasta México (Bouvier *et al.*, 2010). Bouvier *et al* 2003. Es de origen americano y fue llevada a diversas colonias durante los siglos XVI y XVII. Actualmente se cultiva en India, Sri Lanka y Filipinas en Asia, y en Costa de Marfil, Angola y Kenia en África.

En la mayoría de los países productores representa una fuente de ingresos para pequeños agricultores que tienen la planta cerca de sus plantíos o en sus huertos. En términos generales, los pequeños productores surten la demanda local. Sólo tres países exportan el pigmento en volúmenes importantes: Brasil (el mayor exportador), Perú y Kenia. Los principales consumidores del pigmento son India, Japón, Turquía, Rusia, Argentina, Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea, donde se utiliza fundamentalmente como colorante de alimentos.

## Usos como colorante en la industria alimenticia

El extracto, obtenido de la semilla de *B. orellana* se conoce también como anato, se considera uno de los principales colorantes naturales y no parece tener ningún efecto tóxico en el ser humano. Su uso en alimentos procesados ha sido aprobado sin restricciones en la Unión Europea y en Estados Unidos. Es uno de los colorantes naturales más utilizados en la industria alimenticia. Este pigmento, al que se asocia el código E160b, se emplea en sustitución del amarillo 5 OMS/FAO, 1976. Se usa en productos lácteos, bebidas, mayonesas, pastelería, pescados y sazónadores, entre otros. A partir de la semilla de *B. orellana* se obtiene tanto la bixina, colorante liposoluble de color rojo a anaranjado, como la norbixina, colorante hidrosoluble color amarillo. Ambos pigmentos representan más de 80% de todos los carotenoides presentes en la semilla (McKeown, 1961). A partir de ellos se obtienen sal de norbixina y diversos productos liposolubles de la degradación térmica que tienen un color amarillento estable; éstos se utilizan fundamentalmente para la coloración de pastas y quesos. Una limitación para el uso de carotenoides como pigmentos es su baja solubilidad en agua; sin embargo, es posible aumentar esta propiedad utilizando emulsificantes, como los polisorbatos y el glicol propilénico, entre otros. El anato tiene la capacidad de cambiar tanto su coloración de amarillo a rojo como su solubilidad; por eso este pigmento es muy utilizado y representa un gran potencial para la industria alimenticia, que demanda cada vez más pigmentos naturales.

## Aplicaciones como ingrediente beneficioso para la salud

Los carotenoides se consideran compuestos beneficiosos para la salud, como ya se ha comentado en el capítulo 1,

de ahí que algunos de ellos (como licopeno,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, luteína, zeaxantina y astaxantina) se usen en este contexto como ingredientes en diversos productos alimenticios para humanos y piensos (Del Campo, García-González y Guerrero, 2007; Fassett y Coombes, 2011). La bixina es un apocarotenoide con nueve dobles enlaces conjugados que, al igual que otros carotenoides, podría actuar como antioxidante y proporcionar beneficios para la salud. En contraste con la diversidad de usos medicinales en la farmacopea popular, como se comenta en la sección siguiente, existe muy poca investigación científica sobre los carotenoides típicos del achiote. Cáceres *et al.* (1995) y Otero *et al.* (2000) encontraron que la evidencia experimental es negativa en el caso de la diabetes y parcialmente positiva para los otros casos. En células de *E coli* se observó un efecto protector contra mutaciones inducidas por luz ultravioleta cuando el medio contenía norbixina. Asimismo Junior *et al.* (2005) observaron un efecto inhibidor de la oxidación por  $H_2O_2$  *in vitro*. En experimentos en animales Chin e Ima-Nirwana (2014) documentaron efectos en la recalcificación de huesos. Considerando estas evidencias, puede afirmarse que el estudio de los efectos beneficiosos de bixina y norbixina aparece como un campo importante de investigación para el futuro en el contexto de la alimentación funcional.

### Usos medicinales del achiote

El achiote también forma parte del acervo de plantas medicinales precolombinas. Las diversas culturas, antes y después de la conquista, han utilizado las plantas de *B. orellana* por sus propiedades curativas. Popularmente se le atribuyen propiedades contra enfermedades como la diabetes, infecciones microbianas, mordidas de serpientes, disentería, diarrea, amigdalitis y dolores pectorales. Juárez, Morales y Chacón (1998) y Pérez, Cuen y Becerra (2003) refieren que

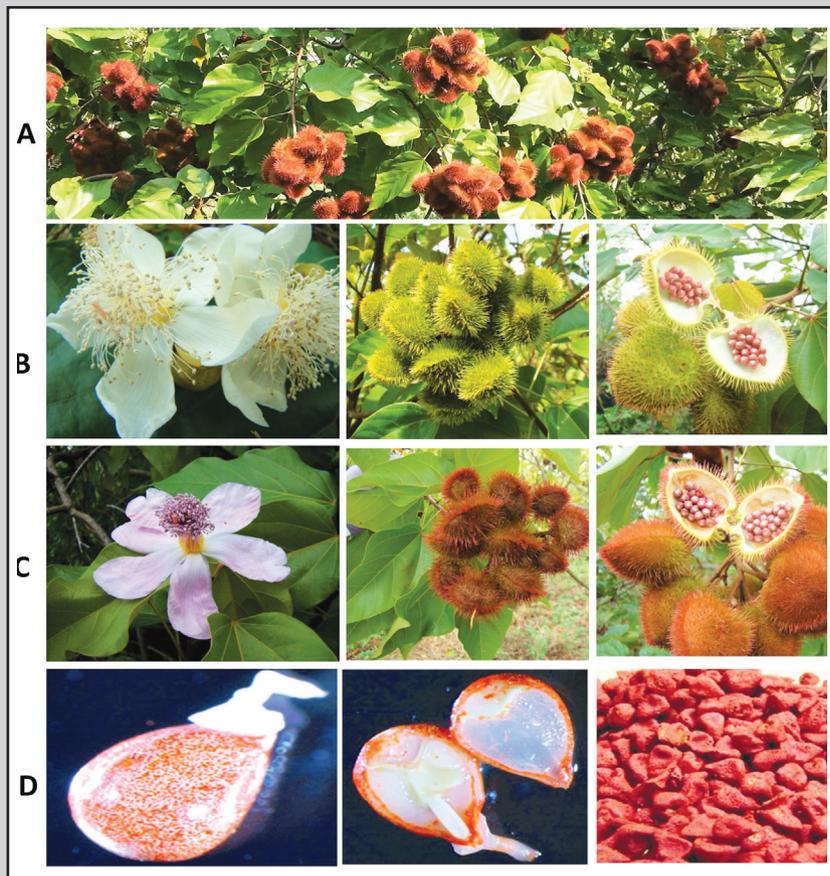
también se usa como estimulante, diurético, afrodisíaco, laxante y cicatrizante. Juárez, Morales y Chacón (1998) señalan en particular que las hojas y raíces destacan por su aplicación como cataplasmas, y en tratamientos asmáticos y bucofaríngeos, así como en la prevención de la caída del cabello.

### Otros usos

El achiote es ampliamente utilizado en la comida tradicional de algunos países como México, Guatemala, Costa Rica y Perú. En México se utiliza en la península de Yucatán, Chiapas y Tabasco para elaborar bebidas y platillos típicos, como cochinita pibil, relleno negro, tamales y la bebida tascalate, entre muchos otros (Arce 1991; Godoy-Hernández, 2000). En Bolivia se prepara el majadito (arroz al que se le incorpora el pigmento), en Venezuela se consumen “bollos” o bolitas de masa con achiote rellenas de carne, en Nicaragua se preparan nacatamales y en Ecuador, carne colorada. Muchos guisos de la comida típica de los países latinoamericanos incorporan el pigmento de *B. orellana*, sea como colorante, o mezclado con especias para dar sabor a muchos platillos típicos.

Otro uso importante del achiote es en la elaboración de alimentos para aves de corral, pues aumenta el contenido de carotenoides de los huevos y mejora el color de la yema. Al igual que otros carotenoides, el pigmento de achiote se emplea en cosméticos, como barras de labios, productos para el cuidado de la piel y el cabello, jabones y productos para pintar el cuerpo (*body paint*). Algunas etnias de Brasil, como los yawanawas, usan este tinte para la decoración corporal y del rostro. En este mismo país, otro grupo indígena incorpora el pigmento en la cerámica.

En menor medida se utiliza en peletería y textiles; también se



**FIGURA 1.** Plantas de *Bixa orellana* L. o achiote de diferentes fenotipos en floración y fructificación: *a*) frutos maduros en la planta adulta; *b*) fenotipo flor blanca fruto verde. Derecha, fruto inmaduro abierto para visualizar las semillas inmaduras; *c*) fenotipo flor rosa fruto rojo. Derecha, fruto inmaduro abierto para visualizar las semillas inmaduras; *d*) semilla inmadura (izquierda); semilla inmadura, corte transversal (centro); semilla madura seca (derecha).

usa para avivar ciertos tintes y dar color a los barnices, aceites y ceras. En Filipinas, el pigmento se emplea como componente en la cera para pisos y para calzado, barniz para bronce y tinte para madera.

Por último, vale la pena agregar que *B. orellana* también se usa con fines ornamentales, por la belleza de sus flores. En Kuala Lumpur muchas calles se adornan con la planta por los colores de sus flores y de sus frutos inmaduros.

## MEJORA GENÉTICA

### Selección de materiales promisorios

Varios investigadores (Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Aguilar-Espinosa, Rivera-Madrid y Lizama-Rivero, 2012) reportan la presencia de importantes variaciones en las características morfológicas de las plantas de achiote; existe una gama de diferencias en el color de la flor y el fruto; forma, tamaño, cantidad de espinas, dehiscencia o indehiscencia del fruto y contenido de bixina en las semillas, entre otras características (figura 1). La caracterización morfológica y genética de poblaciones fue útil para conocer la variación genética y fenotípica de este cultivo. Esto permitió seleccionar materiales útiles para el mejoramiento genético en términos de producción de pigmentos, dehiscencia e indehiscencia del fruto, contenido de semillas por fruto y contenido de bixina en semillas; Valdez-Ojeda *et al.* (2008) informaron que se generó un banco de germoplasma con una variedad de accesiones que presentan las características antes mencionadas. Partiendo de estos materiales se efectuaron las primeras cruces y se cuenta actualmente con una población segregante F1 y F2. Así, se podrá lograr un mejor manejo de la especie y entender cómo se heredan los caracteres de interés agronómico, calidad y cantidad de pigmentos, y encauzar acertadamente su mejoramiento genético.

## Caracteres de interés agronómico a mejorar

A pesar de la importancia comercial y en la comida tradicional, hasta la fecha no existen variedades agronómicas que permitan una calidad uniforme y cantidad constante en la producción de este cultivo. Actualmente las semillas de achiote disponibles para los agricultores son muy variables y se conocen más por el origen de su procedencia (ej., jamaicana, peruana, hindú, guatemalteca, entre otras) que por su selección o caracterización genética o molecular. En nuestro grupo de investigación hemos iniciado un programa de mejoramiento genético del achiote para disponer de variedades agronómicas caracterizadas por su contenido de bixina y otras características agronómicas de interés (Rivera-Madrid *et al.*, 2006, Aguilar-Espinosa, Rivera-Madrid y Lizama-Rivero, 2012). Hasta ahora no se ha logrado establecer una producción homogénea que permita la obtención de buena producción de bixina. Características agronómicas asociadas a la producción, como la dehiscencia del fruto, afectan el número y calidad de las semillas pues las exponen a la luz, el calor y el oxígeno, factores que provocan la degradación del pigmento (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008). Generar plantas con frutos indehiscentes y con mayor número de semillas permitirá mejorar la producción de bixina y conservar la calidad de sus pigmentos (Rivera-Madrid *et al.*, 2006). Hasta ahora, el cultivo del achiote en México se destina principalmente al autoconsumo y a la pequeña industria. Sin embargo, Godoy (2000) encontró que la producción, medida por cantidad de semilla de achiote, es insuficiente para abastecer a esta última. Actualmente no se cuenta con variedades agronómicas para el mejor aprovechamiento de este recurso. El objetivo de nuestro programa de mejoramiento genético es ofrecer plantas de achiote con alto contenido de bixina y con frutos indehiscentes (Rivera-Madrid *et al.*, 2006).

## Metodologías biotecnológicas para el mejoramiento

Nuestro grupo enfoca su trabajo de investigación sobre el achiote en la generación de las bases genético moleculares (Narváez *et al.*, 2001; 2002; Rivera-Madrid *et al.*, 2006; Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011) que permitan ahondar en el conocimiento de los genes implicados en la ruta de síntesis de carotenoides y sus derivados, principalmente la bixina y la norbixina o la orellina. Es necesario seguir desarrollando nuevas y mejores metodologías que nos permitan avanzar más rápido en la generación de líneas mejoradas con características agronómicas deseables, para obtener más pigmento de mejor calidad y para promover la producción de precursores de vitamina A como el  $\beta$ -caroteno.

El tiempo necesario para lograr resultados en los programas de mejoramiento genético puede ser considerable debido a que el achiote es una planta leñosa y perenne. La primera producción de semillas ocurre entre el tercer y cuarto año de vida, dependiendo de las condiciones, y es seguida de ciclos de floración y fructificación anual; por eso estamos trabajando en la implementación de metodologías biotecnológicas más novedosas que permitan acortar el tiempo de obtención de resultados en el mejoramiento genético. Es fundamental contar con un germoplasma de esta especie enfocado a la diversidad de pigmentos e implementar un protocolo de androgénesis *in vitro* para generar dobles haploides en esta planta y obtener líneas puras. La generación de un banco de mutantes para diversidad de pigmentos permitirá no sólo producir más bixina, sino también otros pigmentos en esta planta. Estamos trabajando para obtener marcadores moleculares para la detección temprana del tipo y cantidad de pigmento o apertura y cierre de fruto y en la identificación de genes candidatos para

síntesis de bixina en achiote mediante la secuenciación masiva de transcriptomas clave y la generación un mapa genético de ligamiento para ubicar los genes candidatos en el programa de mejoramiento genético (proyecto en curso).

## LA IMPORTANCIA DE LA SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA PARA EL ESTUDIO DE LOS GENES DE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES DE *BIXA ORELLANA*

### Genes implicados en la producción de bixina aislados en la actualidad

Para emprender un programa de mejoramiento genético que ofrezca plantas de achiote con alto contenido de bixina y frutos indehiscentes es de suma importancia identificar los genes involucrados en estas características morfológicas. Las rutas metabólicas MEP y carotenoides de las cuales deriva el licopeno, precursor de bixina, no se han caracterizado completamente. Jako *et al.* (2002) y Rodríguez-Ávila *et al.* (2011a) informan que se han logrado identificar algunas secuencias parciales de los genes de estas rutas biosintéticas. Una biblioteca sustractiva de *expressed sequenced tags* (EST) construida a partir de semilla inmadura identificó grupos de transcritos correspondientes a genes de las rutas MEP y carotenoides (NCBI, núm. de acc.: LIBEST\_025681 BIXA). De la ruta de MEP se identificó un *cluster* correspondiente al gen DXS (1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa), dos del gen DXR (1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa), uno del gen MCT (2-metileritritol 4-fosfato citidililtransferasa) y dos *clusters* para de los genes HDS (4-Hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa) y GGPS (Geranilgeranil difosfato sintasa). De la ruta de los carotenoides se identificaron uno, tres y dos *clusters*

de los genes *PSY* (fitoeno sintasa), *PDS* (fitoeno desaturasa) y *ZDS* ( $\zeta$  catoroteno desaturasa) respectivamente, mientras que para la ruta de la bixina se identificaron los genes caroteno dioxigenasa con cinco *clusters*, aldehído deshidrogenasa con cinco *clusters* y metiltransferasa con cinco *clusters* (Jako *et al.*, 2002). El número de *clusters* se puede relacionar con el número de copias que un gen tiene en el genoma o con el número de copias del gen que se están expresando en la semilla inmadura (Jako *et al.*, 2002; Bouvier *et al.*, 2003; Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011).

Además, Rodríguez-Ávila *et al.* (2011) aislaron fragmentos de genes de las rutas MEP (*DXS*, AF479589) y de carotenos (*PSY*, AF196963; *PDS*, DQ924534;  $\beta$ LCY, ( $\beta$ -licopeno ciclasa), AY836587;  $\epsilon$ LCY, ( $\epsilon$ -licopeno ciclasa), DQ145558), con la finalidad de medir los patrones de expresión de los genes en diferentes tejidos de plantas con fenotipos contrastantes de bixina.

Hasta la fecha sólo las secuencias de algunos genes de la ruta biosintética de la bixina se han aislado completamente; Bouvier *et al.* (2003) aislaron los genes de una caroteno dioxigenasa (BoLCD; AJ489277), una aldehído deshidrogenasa (BoBADH; AJ548846) y una metiltransferasa (BonBMT; AJ548847). Los productos de estos genes lograron producir bixina en *Escherichia coli* (Bouvier *et al.*, 2003). Recientemente se asilaron tres genes que posiblemente estén involucrados en la ruta de la bixina, su expresión se incrementa en los estadios de la semilla inmadura donde existe mayor producción del pigmento. Las enzimas aisladas son una caroteno dioxigenasa 1 (EF493219), una caroteno dioxigenasa 4 y una metiltransferasa (Soares *et al.*, 2011; Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011).

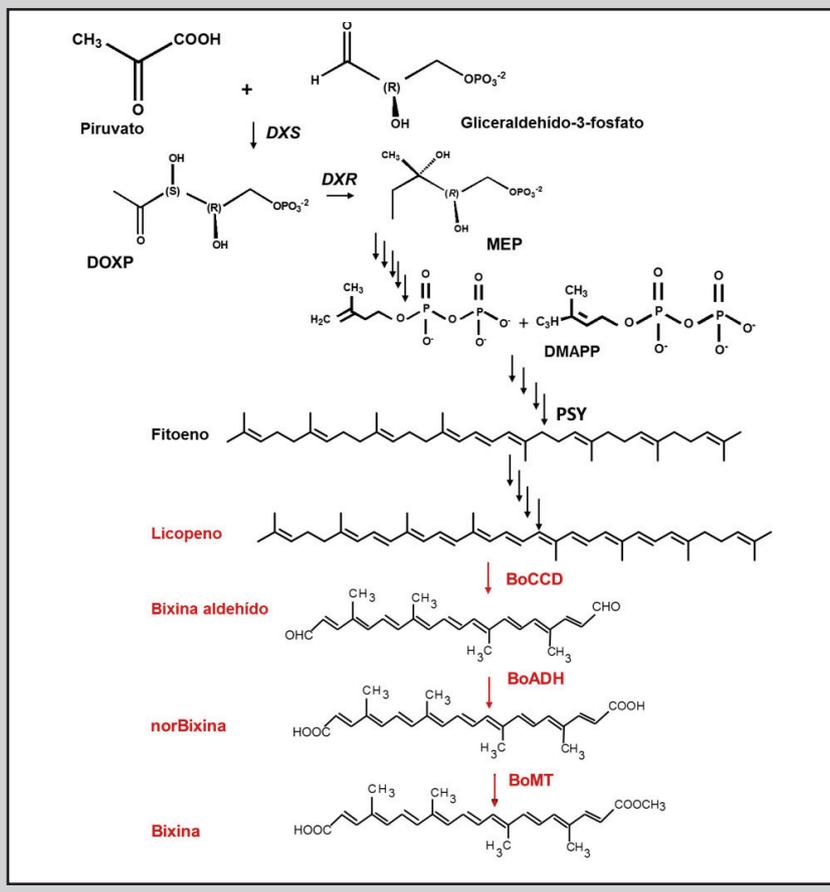
## Importancia de la secuenciación del transcriptoma de *Bixa orellana*

Con las nuevas tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés), ahora es posible la secuenciación a gran escala de genomas y transcriptomas de plantas no-modelo, como *B. orellana*. Los transcriptomas son útiles para determinar la estructura de los transcritos, como identificar los sitios de inicio de la transcripción, modificaciones post-transcripcionales, *splicing*, las regiones no traducidas (UTR) y —lo más importante— pueden determinar las secuencias de los marcos de lecturas abiertos (ORF, por sus siglas en inglés).

Al comparar transcriptomas obtenidos de diferentes tejidos, condiciones fisiológicas o estados de desarrollo, se puede cuantificar el cambio en la actividad de un gen y saber qué genes están expresados o no bajo las condiciones comparadas. Actualmente, se han secuenciado genomas y transcriptomas de varias plantas, lo que ha impulsado su estudio. Por ejemplo, la secuenciación del transcriptoma de *Momordica cochinchinensis* (Hyun *et al.*, 2012), *Citrus sinensis* (Pan, *et al.*, 2012) y *Citrullus lanatus* (Grassi, *et al.*, 2013) permitió obtener los genes implicados en la rutas de la biosíntesis de los carotenoides. Aplicar las nuevas tecnologías de secuenciación NGS para obtener el transcriptoma de *B. orellana* permitirá avanzar considerablemente en la dilucidación de las rutas biosintéticas implicadas en la síntesis de bixina, lo que potenciará el estudio de esta planta.

## Secuenciación del transcriptoma de *Bixa orellana* L.

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del doctor Luca Comai de la Universidad de California, en Davis, USA, obtuvo el transcriptoma *B. orellana* con el objetivo de identificar los genes de las rutas biosintéticas de la vía MEP, carotenoides y bixina (figura 2), (proyecto en curso). El análisis del transcriptoma nos ha permitido identificar la mayoría de los genes de las rutas biosintéticas de la bixina, así como los genes candidatos para el mejoramiento del cultivo. Mediante una búsqueda BLASTx hemos logrado identificar las secuencias completas de los marcos de lectura abiertos de los genes que participan en las tres rutas metabólicas. Para la búsqueda utilizamos genes ortólogos de las tres rutas biosintéticas de *T. cacao* y *Arabidopsis thaliana*. Hemos identificado los siete genes canónicos que conforman la ruta MEP. Encontramos tres copias del gen DXS, y una copia de los genes que codifican para DXR, MCT, CMK, MDS, HDS, HDR, IDI y GGPS (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real identificamos que los genes DXS2 se expresan preferentemente en semilla inmadura, la expresión de DXS2 pero no la de DXS1 está relacionada con la producción de apocarotenoides (Floss *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2013; Saladié, *et al.*, 2014). En la ruta de los carotenoides identificamos 21 ORF pertenecientes a los genes de todas las enzimas de la ruta. Encontramos una copia de los genes ZISO, ZDS, εLCY, BCH, CYP97A3, CYP97C1, CYP97B3 y NSY e identificamos cinco genes con dos copias (PSY, PDS, βLCY, ZEP y VDE) (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). De manera interesante, encontramos que *B. orellana* tiene tres copias del gen CRTISO; el achote es la primera planta en la que se pone de manifiesto la presencia de este número de



**Figura 2.** Biosíntesis de carotenoides (nombres de enzimas, resaltado en rojo) de *Bixa orellana* L. DXS, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa; MEP, 2-C-metil-Deritritol-4-fosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; PSY, fitoeno sintasa. BoCCD, caroteno dioxigenasa; BoADH, aldehído deshidrogenasa; BoMT, metiltransferasa. Cada flecha indica una reacción enzimática. Las flechas indican la sustitución de las reacciones enzimáticas correspondientes.

copias, ya que las especies disponibles en las bases de datos Phytozome 10 y Plaza 3.0 cuentan con dos copias de CRTISO. De los genes de las enzimas de la ruta de los carotenoides identificamos que *PDS* y *ZDS* mostraron un incremento en

su expresión mientras que los genes  $\beta\text{LCY}1$ ,  $\beta\text{LCY}2$  y  $\epsilon\text{LCY}$  se redujeron. El patrón de expresión de estos genes parece emular los patrones de expresión de los genes en el proceso de maduración del tomate, en el cual se acumulan grandes cantidades de licopeno (Pecker, *et al.*, 1996; Ronen, *et al.*, 1999; Bramley, 2002; Simkin, *et al.*, 2003;). Sobre la ruta de la bixina identificamos las secuencias de los ORF de nueve enzimas caroteno dioxigenasas, 20 aldehído deshidrogenasas y 12 metiltransferasas de la familia SABATH. De estos genes identificados, posiblemente nueve se encuentran directamente relacionados con la producción de la bixina. El análisis de PCR en tiempo real muestra que estos nueve genes (dos caroteno dioxigenasas del grupo 1, dos caroteno dioxigenasa del grupo 4; dos, dos aldehído deshidrogenasas de la familia 3; dos metiltransferasas) se expresan de preferencia en semilla inmadura en donde se produce la mayor cantidad del pigmento (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

Con la reciente secuenciación del transcriptoma se están logrando avances en la identificación de los transcritos y proteínas codificadas en los genes de las rutas metabólicas que derivan el colorante bixina. Las secuencias de los ORF de la ruta de la bixina identificados sirvieron para diseñar oligonucleótidos que permitieron medir la expresión de genes, lo que nos ha ayudado a identificar los posibles genes involucrados en la síntesis del pigmento bixina. La identificación de estos genes nos permitirá comparar sus patrones de expresión en plantas con alto rendimiento y bajo rendimiento de bixina. Otros genes que controlan características agronómicas de interés en el mejoramiento del cultivo, como son la dehiscencia e indehiscencia del fruto y número de semillas que repercuten en la calidad y cantidad de pigmento, también deberán analizarse con la finalidad de seleccionar genes candidatos para mejorar estas

características morfológicas. Los genes con cambios en su expresión génica podrán ser objeto de esta selección para el mejoramiento. Identificar marcadores moleculares es otro reto que podrá ser superado con NGS. La secuenciación del genoma completo y del transcriptoma de fenotipos contrastantes de *B. orellana* y el análisis de la genómica comparada permitirán encontrar e identificar polimorfismos de un nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) útiles para identificar marcadores moleculares de selección de variantes con alto rendimiento de bixina. Herramientas basadas en la PCR o en enzimas de restricción podrán diseñarse fácilmente para detectar estos marcadores moleculares. La genómica comparada también podrá detectar posibles aneuploidias que puedan afectar la producción del colorante, ya que se ha visto que en *Arabidopsis thaliana* el cambio en el número cromosómico afecta el fenotipo (Henry, *et al.*, 2010). La secuenciación del genoma completo nos proporcionará la información que el transcriptoma no puede brindar, como las regiones que regulan la expresión de los genes implicados en la síntesis de la bixina.

## CULTIVOS IN VITRO DE *BIXA ORELLANA* L. PARA LA PRODUCCIÓN DE BIXINA

La principal limitante para la producción de bixina es la colecta de semillas de *B. orellana* que sólo ocurre durante los meses de enero a marzo. Una alternativa para evitar la dependencia anual es establecer cultivos *in vitro* que produzcan todo el año. En esta sección se presenta una revisión de los trabajos publicados al respecto en revistas internacionales y en tesis realizadas en el grupo de investigación de Gregorio Godoy-Hernández.

## Callos

Los primeros trabajos de cultivos *in vitro* de achiote en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. se iniciaron en 1991 en el grupo de investigación del doctor Gregorio Godoy Hernández, con el establecimiento de callos a partir de explantos de hojas, hipocotilos y raíces obtenidos a partir de semillas de achiote germinadas *in vitro* en condiciones asépticas (Minero-García, 1993). Sin embargo, al evaluar las concentraciones de bixina en los callos, en general se encontraba una disminución del contenido de bixina (0.00030%, 0.00024% y 0.00019%), al compararlos con el contenido de bixina de sus respectivos explantos de hoja (0.032 %), hipocótilos (0.019 %) y raíces (0.004 %).

En trabajos como el de Alarcón *et al.* (2006), se han utilizado combinaciones de reguladores de crecimiento en medio MS, para establecer callos de hoja, hipocotilo y raíz de achiote; Castello, Shara y Sharon (2012) los utilizaron para estudios de la adición de precursores en la acumulación de bixina en callos de hipocotilo y raíz.

## Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares de achiote obtenidas a partir de callos de hojas (0.00030 % de bixina), aunque mantenían niveles de bixina de 0.000030-0.00065%, tampoco se consideraron útiles para la producción de bixina (Galaz-Ávalos, 1993). Sin embargo, las suspensiones celulares obtenidas a partir de callos de hojas de *Bixa orellana* se han utilizado para producir compuestos fenólicos potencialmente antifúngicos (Jiménez *et al.*, 2008).

Por lo anterior, el grupo de investigación del doctor Godoy

Hernández optó por establecer cultivos de raíces normales. Estos cultivos producían un 0.005% de bixina, un valor similar al detectado en los explantos originales de raíz con un 0.004% de bixina. Aunque los cultivos de órganos producen mejores contenidos de bixina que los callos y suspensiones celulares, el cultivo de raíces normales produce aproximadamente 200 veces menos bixina que la que está presente en las semillas del morfotipo criolla de achiote (1.07%) (Galaz-Ávalos, 1993), por lo que tampoco son un modelo útil para la producción de bixina *in vitro*. En un trabajo más reciente, Mahendranath *et al.* (2011) proponen al cultivo de raíces normales con un contenido de bixina de 0.346% como una opción alternativa para la producción de bixina durante todo el año.

## Morfogénesis

En virtud de que los cultivos de callos, suspensiones celulares o raíces normales de achiote producen bixina a concentraciones inferiores a las presentes en las semillas, el grupo de investigación de Godoy-Hernández reportó el establecimiento de protocolos de regeneración a partir de diversos explantes de hipocótilo (Zaldívar-Cruz, 2004; Canul-Canché, 2004; Rodríguez-Vera, 2012; Mian-Mian, 2014); mientras que Canul-Canché (2004) y Rodríguez-Vera (2012) partieron de raíces para micropropagar los morfotipos más sobresalientes en cuanto al contenido de bixina en sus semillas, con el fin de establecer plantaciones comerciales de morfotipos con altos contenidos de este pigmento. En la actualidad, D'Souza y Sharon (2001) y Parimalan, Giridhar y Ravishankar (2011) han mostrado la morfogénesis de achiote vía organogénesis a partir de ápices meristemáticos; Paiva Neto *et al.* (2003) en hipocótilos; Parimalan *et al.* (2007) en cotiledones; Joseph, Siril y Nair (2011) y Siril y Joseph (2013) en explantos nodales y Ferreira da Cruz *et al.* (2014) en raíces. Michelangeli de Clavijo, Artioli y Medina (2002)

publicaron el primer trabajo de embriogénesis somática indirecta a partir de anteras; Parimalan *et al.* (2011a) lo hicieron a partir de hipocótilos; Paiva Neto *et al.* (2003a) y Parimalan *et al.* (2011a) realizaron embriogénesis somática directa a partir de embriones somáticos inmaduros.

En los trabajos del grupo de investigación del doctor Godoy-Hernández, el medio de cultivo empleado es el medio Phillips y Collins (PC-L2), mientras que en otros grupos, los medios más comúnmente empleados han sido el Murashige y Skoog (MS) y/o en combinación con el Gamborg (B5) y el Nitsch y Nitsch (NN).

## Transformación genética

A pesar del éxito de la propagación *in vitro* de morfotipos de achiote, ya sea vía organogénesis o embriogénesis, para establecer plantaciones comerciales de achiote, los morfotipos con los más altos contenidos de bixina en sus semillas presentan el fenómeno de dehiscencia de sus frutos, lo que representa pérdidas en la colecta anual de las semillas. Por tal motivo, el grupo de trabajo del doctor Godoy-Hernández optó por el establecimiento de protocolos de regeneración *in vitro* (Zaldívar-Cruz, 2004; Canul-Canché, 2004) para emplearlos en el establecimiento de un protocolo de transformación genética estable del achiote, con la finalidad de transformar morfotipos de frutos indehiscentes con genes de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides plastídicos, para favorecer la producción de bixina en los morfotipos con frutos indehiscentes.

El primer trabajo de transformación de *B. orellana*, vía *Agrobacterium tumefaciens*, lo reportaron Zaldívar-Cruz *et al.* (2003), con la transformación transitoria de hipocótilos con el gen reportero *GUS* con los vectores pBI.121 y pCAMBIA 2301; sin embargo, Zaldívar-Cruz (2004) indica que no se logró la

obtención de brotes transgénicos a GUS a partir de dicho explante. Recientemente, Parimalan *et al.* (2011a) muestran la regeneración de brotes transgénicos al gen reportero *GUS* a partir de embriones somáticos con el vector pCAMBIA 1305.2 vía *A. tumefaciens*; Zhai *et al.* (2014) obtuvieron raíces peludas de *B. orellana* vía *Agrobacterium rhizogenes*. Sin embargo, no se ha informado sobre su transformación con genes de la ruta de los isoprenoides plastídicos.

Puesto que únicamente se han publicado dos trabajos sobre la transformación genética estable de *B. orellana* con *A. tumefaciens* (Parimalan *et al.*, 2011a) y *A. rhizogenes* (Zhai *et al.*, 2014), se puede considerar que el achiote es una especie recalcitrante a la transformación genética. Por lo que habría que detectar genotipos susceptibles a la transformación genética estable, ya que ello podría ser la limitante en su transformación con genes de la ruta de isoprenoides plastídicos.

## PERSPECTIVAS

El achiote es un cultivo promisorio por el alto contenido de pigmentos que produce. Nuestro grupo de investigación ha generado resultados interesantes que permitirán avanzar más rápido en su mejora genética, así como en su micropropagación *in vitro*; ambos aspectos son de vital importancia para este cultivo. También se cuenta con la caracterización de los morfotipos y con un banco de germoplasma de accesiones con variación de las características morfológicas incluyendo variación en contenido de carotenoides y bixina (Valdez-Ojeda *et al.*, 2008; Aguilar-Espinosa, Rivera-Madrid y Lizama-Rivero, 2012). A nivel molecular, principalmente en la variación genética, contamos

con potenciales marcadores moleculares que diferencian el color de la flor, el fruto y el contenido de bixina (proyecto en curso). Este resultado abre las perspectivas para hacer genómica comparativa que nos permita encontrar más marcadores que diferencien características agronómicas de interés y nos sirvan como marcadores asistidos de selección (MAS) para esta planta leñosa que da su primera floración tres o cuatro años después de su germinación. Finalmente, los estudios están dirigidos a la obtención de mayores rendimientos en pigmentos y mayor diversificación de estos compuestos, que poseen alta variación en los colores de sus diferentes morfotipos. Esta característica es muy importante pues de ella depende el valor agregado de la bixina.

A nivel de la carotenogenesis el achiote es la única especie que produce el pigmento bixina en cantidades elevadas. La bixina es un derivado de los productos de la ruta de carotenoides y nuestro reto está enfocado a la producción de plantas de achiote con mayor cantidad de pigmento así como promover la síntesis de otros apocarotenoides con color como la orellina, de color amarillo. Al mismo tiempo, se está trabajando en la micropropagación de *B. orellana* para multiplicar de manera eficiente los materiales más productores de bixina u otro pigmento en particular.

Por último, en colaboración con la doctora Lugo del CIATJ, (Coronado-Cáceres *et al.*, 2013), hemos comenzado a explorar las semillas de achiote como alimento funcional, ya que las semillas de achiote de alguna forma se consumen en su totalidad en la preparación de plátillos. Los resultados preliminares indican que las semillas podrían poseer cualidades antioxidantes y antitumorales. Es necesario estudiar esto con más detalle y con mayor rigor.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en varias ocasiones por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) 31602B y 46541; The International Foundation for Science (IFS) F/2932-2, 3 y UC Mexus-Conacyt.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Espinosa, M.L., Rivera-Madrid, R. y Lizama-Rivero, O. 2012. *Revista Latinoamericana de Química*, 39. ISSN0370-5943, Suplemento especial.
- Alarcón, P.J.C., Castaño, P.H.I., Corrales, G.L.L., Jiménez, R.S.L. Díaz C. A. 2006. *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 13: 17-23.
- Arce, J. 1999. *El achiote Bixa orellana L. Cultivo promisorio para el trópico*. San José: Editorial Guácimo.
- Bramley, P.M. 2002. *J Exp Bot* 53: 2073-2087.
- Belmino dos Santos, J.A. 2007. *Análise comparativa entre técnicas de processamentos para extração de pigmentos nas sementes de urucum*. Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Ciencias e Tecnologia. Programa de Doutorado em Engenharia de Processo. Área de Processos Químicos.
- Bittencourt, C., Felicissimo, M.P., Pireaux, J.J., Houssiau, L. 2005. *J Agric Food Chem* 53: 16-19.
- Bouvier, F., Dogbo, O. y Camara, B. 2003. *Science* 300: 2089-2091.
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez E., Cohobón, E., Samayoa, B.E., Jáuregui, E., Peralta, E., Carrillo, G. 1995. *J Ethnopharmacol* 48: 85-88.
- Canul-Canché, J. 2004. Tesis de licenciatura. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Cárdenas-Conejo, Y., Carballo-Uicab, V., Lieberman, M., Aguilar-Espinosa, M., Comai, L., Rivera-Madrid, R. 2015. "De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis". *BMC-Genomics* 10.1186/s12864-015-2065-4
- Castello, M., Shara, M. y Sharon, M. 2012. *Eur J Exp Biol*. 2: 151-155.
- Chin, K. e Ima-Nirwana, S. 2014. *Clinical Intervention in Aging* 9: 1247-1259.
- Coronado-Cáceres, L.J., Lugo-Cervantes, E., Puebla-Pérez, A.M., Aguilar-Espinosa, M., Alcaraz-López O.M., Mateos-Díaz, J.C., Rivera-Madrid, R. 2013. *Memorias en extenso del 4º Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía: innovación para el desarrollo sustentable*. pp 432-445. ISBN: 978-607-719-003-5
- Del Campo, J., García-González, M. y Guerrero, M. 2007. *Appl. Microbiology Biotechnology* 74: 1163-1174.
- D'Souza, M. y Sharon, M. 2001. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 37: 168-172.
- Fassett, R.G. y Coombes, J.S. 2011. *Marine Drugs* 9: 447-465.
- Ferreira da Cruz, A.C., Rocha, D.I., Iarema, L., Contim Ventrella, M., Cardoso Costa M.C., Paiva Neto, V. B., Campos Otoni, W. 2014. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 50: 76-83.

## REFERENCIAS

- Figueiredo, R.M.F., Oliveira, F.M.N., Queiroz, A.J.M. 2000. *Revista Brasileira de Corantes Naturais* 4: 77-81.
- Francis, F.J. 1987. *Food Technology* 41: 62-88.
- Freund P.R., Washam C.J. y Maggion M. 1988. *Cer. Foods World* 33: 553-559.
- Floss D.S., Hause B., Lange P.R., Küster H., Strack D. Walter M.H. 2008. *Plant J* 56: 86-100.
- Galaz-Ávalos, R. 1993. Tesis de licenciatura. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Godoy, G. 2000. *Ciencia y Desarrollo* XXVI 152: 34-39.
- Grassi, S., Piro, G., Lee, J.M., Zheng, Y., Fei, Z., Dalessandro, G., Giovannoni, J.J., Lenucci, M.S. 2013. *BMC genomics* 14: 781.
- Henry, I.M. *et al.*, 2010. *Genetics*. 186: 1231-1245.
- Hyun, T. K., Rim, Y., Jang, H., Kim, C.H., Park, J., Kumar, R., Lee, S., Kim, B.C., Bhak, J., Nguyen-Quoc, B., Kim, S., Lee, S.Y., Kim, J. 2012. *Plant Molecular Biology* 79: 413-427.
- Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D.W., Pelcher, L.E., Covello, P.S. 2002. *Plant Science* 163: 141-145.
- Jiménez, R.S.L., Castaño P.H.I., Quintana, J.C., Ciro, G.G.L., Quinchía, L., Estrada S. 2008. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 15: 70-76.
- Joseph, N., Siril, E.A., Nair, G.M. 2011 *Physiol Mol Biol Plants* 17: 263-270.
- Juárez, R., Morales, R. y Chacón, E. 1998. "Manual para el Cultivo de Achiote (*Bixa orellana* L.) en el Estado de Tabasco". Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Protección del Trópico Húmedo de Tabasco. Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. pp. 3-15.
- Junior, A., Asad, L., Oliveira, E., Kovary, K., Asad, N., Felzenszwab, I. 2005. *Genetics and Molecular Research* 4: 94-99.
- Leal, F. y Clavijo, C. 2010. *Chronica Horticulturae* 50: 34-36.
- Leal, F. y Michelangeli, C. 2010. *Rev. Unell. Cienc. Tec.* 28: 78-86.
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. San José: IICA.
- Mahendranath, G., Venugopalan, A., Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G. 2011. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 106: 517-522.
- McKeown, G.G. y Mark, E. 1962. *J. Ass. Offic. Agric. Chem.* 45: 761-766.
- Mckeown, G.G. 1961. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 44:347-431

## REFERENCIAS

- Mercadante, A.Z. 2001. *ACS Symposium Series 775*: 92-101.
- Mercadante, A.Z., Steck, A., Pfander, H., Rodríguez-Amaya D., Britton, G. 1996. *Phytochemistry* 41: 1201-1203.
- Mercadante, A.Z., Steck, A. y Pfander, H. 1997. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1050-1054.
- Mercadante, A.Z. y Pfander, H. 1998. *Recent Research Development of Agricultural Food Chemistry* 2:79-91.
- Mercadante, A.Z., Steck, A. y Pfander, H. 1999. *Phytochemistry* 52: 135-139.
- Mian-Mian, M.A. 2014. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.
- Michelangeli de Clavijo, C.C., Artioli G., P.I., Medina M., A.M., 2002. *Agronomía Tropical* 52: 523-541.
- Minero-García, Y. 1993. Tesis de licenciatura. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Narváez, J., Flores, P., Herrera-Valencia, V., Castillo., F., Ku-Cahuich, R., Canto-Canché, B., Santana-Buzzy, N., Rivera-Madrid, R. 2001. *HortScience* 36: 982-986.
- Narváez, J.A., Canto-Canché, B., Flores, P., Rivera-Madrid, R. 2002. *Journal of Plant Physiology* 158: 1471-1477.
- Oliveira, J.S. 2005. Tesis doctoral, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- OMS/FAO. 1976. Specifications for the Identify and Purity of some Food Colours, Flavours Enhancers. Thickening Agents, and Certain Food Additives. *WHO Food Additives Series 7*: 3-10.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Osorio, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A. 2000. *J Ethnopharmacol.* 73: 233-241.
- Paiva Neto, V.B., Botelho, M.N., Aguiar, R., Silva, E.A.M., Otoni, W.C. 2003. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39: 629-634.
- Paiva Neto, V.B., Ribeiro de Mota, T., Campos Otoni, W. 2003a. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 159-167.
- Pan, Z., Zeng, Y., An, J., Ye, J., Xu, Q., Deng, X. 2012. *Journal of Proteomics* 75: 2670-2684.
- Parimalan, R., Giridhar, P., Gururaj, H.B., Ravishankar G.A. 2007., *Acta Botánica Croatica.* 66: 153-160.
- Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. 2011. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105: 285-290.
- Parimalan, R., Venugopalan, A., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. 2011a. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 105: 317-328.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F.J., Hirschberg, J. 1996. *Plant Mol Biol* 30: 807-819.

## REFERENCIAS

- Peng, G., Wang, C., Song, S., Fu, X., Azam, M., Grierson, D., Xu, C. 2013. *Plant Physiol Biochem* 71: 67-76.
- Pérez, S., Cuen, M. y Becerra, R. 2003. *Biodiversitas* 46: 7-11.
- Preston, H.D. y Rickard, M.D. 1980. *Food Chemistry* 5: 47-56.
- Rivera-Madrid, R., Escobedo-GM, R.M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., Harries, H. 2006. *Scientia Horticulturae* 109: 165-172.
- Rivera-Madrid, R., Burnell, J., Aguilar-Espinosa M., Rodríguez-Ávila, N.L., Lugo-Cervantes, E., Sáenz-Carbonell, L.A. 2013. *Plant Mol Biol Rep* 31: 1422-1432.
- Rodríguez-Ávila, N.L., Narváez-Zapata, J.A., Ramírez-Benítez, J.E., Aguilar-Espinosa, M.L., Rivera-Madrid, R. 2011. *Journal of Experimental Botany* 62: 5385-5395.
- Rodríguez-Ávila, N.L., Narvaez-Zapata, J.A., Aguilar-Espinosa, M.L., Rivera-Madrid, R. 2011a. *Plant Molecular Biology Reporter* 29: 43-50.
- Rodríguez-Vera, M.A. 2012. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.
- Ronen, G., Cohe, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. *Plant J* 17: 341-351.
- Saladié, M., Wright, L.P., García-Mas, J., Rodríguez-Concepción, M., Philips, M.A. 2014. *J Exp Bot* 65: 5077-5092.
- Sinarefi. Sistema Nacional de Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 2014. Red Achiote. [http://www.sinarefi.org.mx/redes/red\\_achiote.html](http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_achiote.html) [consultado el 19 de noviembre de 2014].
- Simkin, A.J., Laboure, A.M., Kuntz, M., Sandmann, G. 2003. *Zeitschrift für Naturforsch C A J Biosci* 58: 371-380.
- Siril, E. A. y Joseph N. 2013. *Physiol Mol Biol Plants* 19: 147-155.
- Soares, V. L.F., Rodrigues, S.M., de Oliveira, T.M., de Queiroz, T.O., Lima, L.S., Hora-Júnior, B.T., Gramacho, K.P., Micheli, F., Cascardo, J.C M., Otoni, W.C., Gesteira, A.S., Costa, M.G. C. 2011. *Molecular biology reports* 38: 1329-1340.
- Spears, K. 1988. *Trends in Biotechnology* 6: 283-288.
- Taylor, L. 2002. *Herbal Secrets of the Rainforest*. Rocklin: Sage Press.
- Tong, L.B. 1984. *Mardi Res. Bull* 12: 298-304.
- Uloa, C. 2006. *Botánica Económica de los Andes Centrales*: 313-328.

## REFERENCIAS

- Valdez-Ojeda, R., Hernandez-Stefanoni, J.L., Aguilar-Espinosa, M., Rivera-Madrid R., Ortis, R., Quiros, C.F. 2008. *HortScience*. 43 (7):2013-2017.
- Vogel, J.T., Tan, B.C., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2008. *J Biol Chem* 283: 11364-11373.
- Walter, M.H., Floss, D.S., Strack, D. 2010. *Planta* 232: 1-17
- Zahi, B., Clark J., Ling, T., Connelly, M., Medina-Bolívar, F., Rivas, F. 2014. *Molecules* 19: 756-766.
- Zaldívar-Cruz, J.M., Ballina-Gómez, H., Guerrero-Rodríguez, C., Avilés-Berzunza, E., Godoy Hernández, G. 2003. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 73: 281-284.
- Zaldívar-Cruz, J.M., 2004. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

# BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN HONGOS

Javier Ávalos y M. Carmen Limón



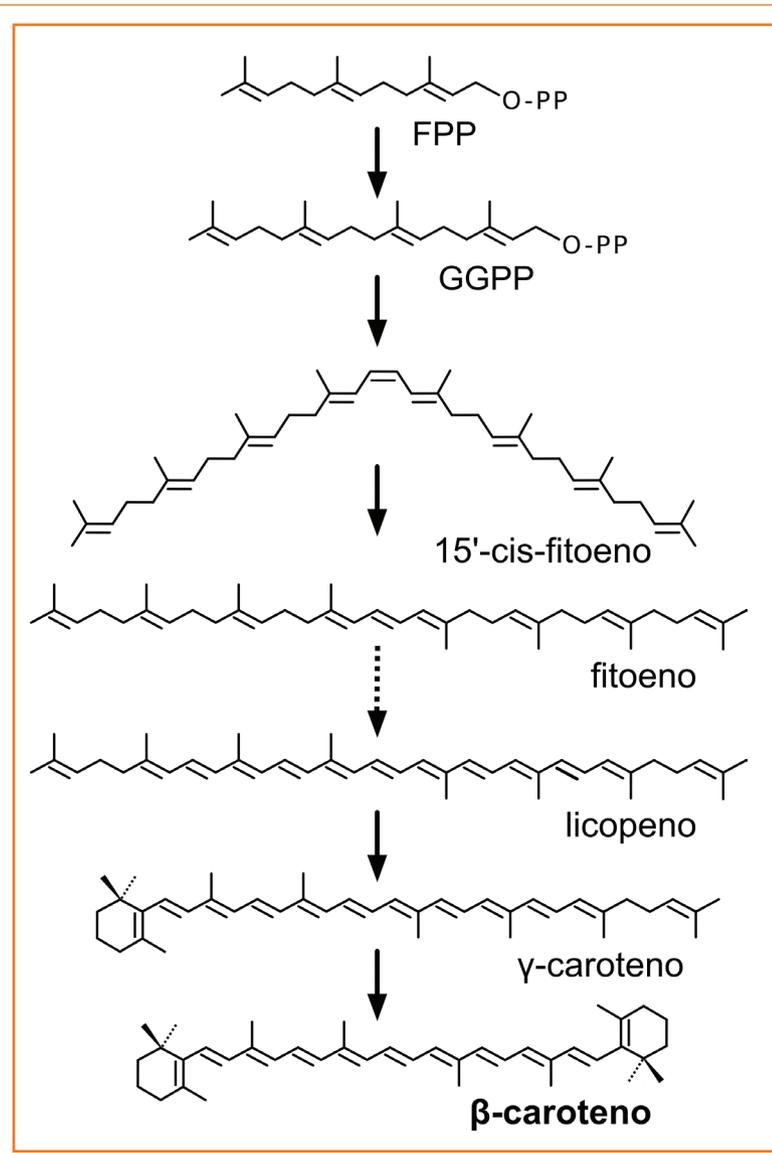
## INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos no fotosintéticos que forman un reino dentro de los eucariotas y que poseen una enorme versatilidad metabólica y capacidad de adaptación a ambientes ecológicos muy diversos. En muchos casos, su metabolismo incluye la capacidad de sintetizar carotenoides, objeto de este capítulo. Los hongos se dividen en varios grupos taxonómicos, entre los que figuran los ascomicetos, que deben su nombre a la formación de ascas, los basidiomicetos, que forman basidios, y los zigomicetos, que forman zigosporas. Con independencia del grupo taxonómico, los hongos pueden desarrollarse formando filamentos (hongos filamentosos) o células individuales (levaduras). Por sus facilidades de cultivo y manipulación en el laboratorio, los investigadores prefieren estudiar algunos hongos. Además, la diversidad de su metabolismo hace de ellos organismos de gran interés biotecnológico; algunas especies se han empleado como modelos de investigación en la síntesis de carotenoides.

La síntesis de carotenoides en hongos se produce a partir del pirofosfato de geranylgeraniol (GGPP). El GGPP se sintetiza tras cuatro pasos consecutivos de condensación a partir de un precursor de cinco átomos de carbono, el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Este compuesto se sintetiza en diferentes organismos mediante dos rutas biosintéticas diferentes. La primera deriva del hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a través del mevalonato, y la segunda, de la condensación de la hidroxietil-tiamina y el gliceraldehído 3-fosfato, con la D-1-deoxixilulosa 1-fosfato como intermediario (Rohmer *et al.*, 1993). En los casos investigados, la síntesis de carotenoides en los hongos ocurre a través de la ruta del mevalonato.

Todos los carotenoides tienen su origen en el fitoeno, un carotenoide incoloro de 40 átomos de carbono que se sintetiza por condensación de dos unidades de GGPP a través de un intermediario en conformación *cis* (figura 1). La introducción de dobles enlaces conjugados a esta molécula aporta a los subsiguientes carotenoides la capacidad de absorber luz visible, dándoles las características pigmentaciones amarilla, anaranjada o rojiza. La ruta difiere después en distintos hongos en función de las modificaciones químicas que se introducen, que normalmente incluyen la ciclación de uno o los dos extremos de la cadena lineal (anillos  $\epsilon$  o  $\beta$ ) o la introducción de grupos oxigenados.

Aunque la capacidad de producir carotenoides es una característica frecuente en los hongos, no todos poseen esta ruta biosintética. Algunas especies muy empleadas en investigación, como *Aspergillus nidulans* o *Saccharomyces cerevisiae*, carecen de los genes para esta ruta. En este capítulo se resume el conocimiento sobre los carotenoides producidos por hongos, prestando especial atención a aquellos en los que se ha profundizado más a nivel bioquímico y genético.



**FIGURA 1.** Biosíntesis del  $\beta$ -caroteno en hongos. La flecha discontinua resume los cuatro pasos consecutivos de desaturación, cuyos intermediarios son el fitoflueno, el  $\zeta$ -caroteno y el neurosporeno (no mostrados).

## PRODUCCIÓN DE $\beta$ -CAROTENO

El  $\beta$ -caroteno es uno de los carotenoides más extendidos en la naturaleza y su síntesis se lleva a cabo en diferentes hongos. La síntesis de  $\beta$ -caroteno a partir de fitoeno requiere cuatro pasos de desaturación, que dan como intermediario el licopeno y dos ciclaciones de tipo  $\beta$  (figura 1). A diferencia de otros organismos, las cuatro desaturaciones las lleva a cabo una misma desaturasa. Las dos ciclaciones las produce también una misma ciclasa.

### Síntesis de $\beta$ -caroteno en mucorales

En los zigomicetos, el  $\beta$ -caroteno parece ser el caroteno más frecuente, y se ha descrito su síntesis en varias especies del orden mucorales, como *Phycomyces blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987), *Blakeslea trispora* (Navarro *et al.*, 1995; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004) y *Mucor circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996). El gen responsable de la desaturasa se ha estudiado en detalle en los tres mucorales mencionados, donde se denomina *carB* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Velayos *et al.*, 2000; Rodríguez-Saiz *et al.*, 2004). A diferencia de las enzimas de la carotenogénesis de bacterias y organismos fotosintéticos, en los hongos la actividad ciclasa se encuentra en el extremo amino de una enzima bifuncional, cuya región del extremo carboxilo lleva a cabo la síntesis de fitoeno a partir del GGPP. Esta doble actividad se descubrió inicialmente en la levadura *Xhantophyllomyces dendrorhous* (Verdoes *et al.*, 1999) y se confirmó posteriormente en los genes *carRA* de *P. blakesleeanus* (Arrach *et al.*, 2001) y *carRP* de *M. circinelloides* (Velayos *et al.*, 2000a; Sanz *et al.*, 2011). Un gen similar se ha identificado también en *B. trispora* (Rodríguez-Saiz *et al.*, 2004). En *P. blakesleeanus* se asume que los dos dominios proteicos

de CarRA se separan como proteínas independientes (Torres-Martínez, Murillo y Cerdá-Olmedo, 1980), probablemente por digestión proteolítica (Arrach *et al.*, 2001). Dicha separación física se ha demostrado recientemente en *B. trispora* mediante el reconocimiento con anticuerpos específicos para cada dominio proteico (Breitenbach, Fraser y Sandmann, 2012).

La organización genética de los dos genes de la síntesis de  $\beta$ -caroteno es similar en las tres especies mucorales investigadas, con ambos genes transcritos de forma divergente a partir de una única secuencia reguladora. La ruta biosintética en estos organismos se ha contrastado sólidamente por estudios genéticos y bioquímicos, alcanzando su mayor detalle en *P. blakesleeanus*. Se conocen desde hace varias décadas los mutantes albinos del gen *carB* (que acumulan fitoeno) y los mutantes del gen *carRA* que pueden ser albinos (porque no acumulan ningún carotenoide) o rojos (porque acumulan licopeno) en función del dominio enzimático afectado (Cerdá-Olmedo, 1985; 1987). Dichos mutantes se obtuvieron posteriormente en *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Velayos *et al.*, 1997) y en *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta, Obratzsova y Cerdá-Olmedo, 2003). El mismo resultado se obtuvo mediante el empleo de inhibidores químicos de estas enzimas, como la difenilamina para la desaturasa (Salgado, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989) o el CFTA [2-(4-clorofenil)-tiotrietilamina • HCl] para la ciclasa (Goodwin, 1980). Los mutantes *carB* de *P. blakesleeanus* acumulan el isómero 15-*cis* del fitoeno (Goodwin, 1980), pero los intermediarios posteriores tienen configuración todo-*cis*. Este hecho, unido a que todos los mutantes que poseen fitoeno están afectados en el mismo gen *carB* (Ootaki *et al.*, 1973) y que la desaturasa CarB es capaz de reconocer la forma *cis* del fitoeno (Fraser y Bramley, 1994), sugiere que la isomerización a la forma todo-*trans* la realiza

la propia desaturasa. Diferentes evidencias experimentales demuestran que en *P. blakesleeanus*, y posiblemente también en las otras especies mucorales estudiadas, las enzimas de la carotenogénesis se organizan como un complejo multimérico, formado por cuatro desaturasas y dos ciclasas, que se transfieren los sustratos entre sí (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976; Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; Sanz *et al.*, 2002). La situación es algo más compleja en *B. trispora*, donde se han encontrado evidencias de dos ciclasas diferentes, una encargada de realizar las dos ciclaciones y otra capaz de hacer sólo la primera ciclación para producir  $\gamma$ -caroteno.

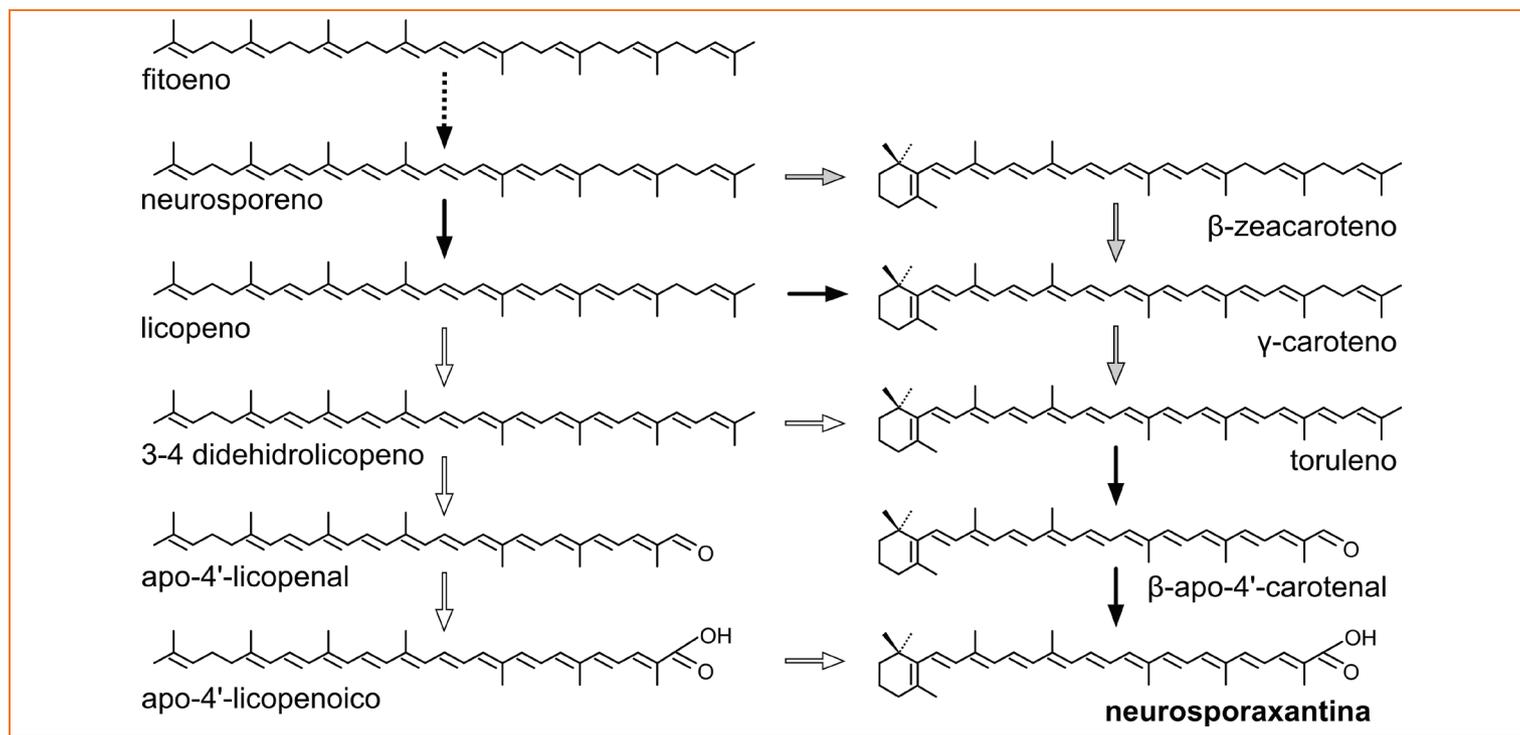
### Síntesis de $\beta$ -caroteno en otros hongos

Además de los zigomicetos, algunos hongos de otros grupos taxonómicos también producen  $\beta$ -caroteno como caroteno predominante. Entre ellos figuran los basidiomicetos *Rhodospiridium* sp. (De Miguel *et al.*, 1997), *Sclerotinia sclerotiorum* (Georgiou *et al.*, 2001), *Sclerotium rolfsii* (Georgiou *et al.*, 2001a), *Sporidiobolus pararoseus* (Han, He y Hang, 2012), *Ustilago maydis* (Estrada *et al.*, 2010) y *Ustilago* sp. (Will, Garber y Kezdy, 1984; Will y Newland, 1985) y los ascomicetos *Leptosphaeria michotii* (Jerebzoff-Quintin y Jerebzoff, 1980), *Aspergillus giganteus* (El-Jack, Mackenzie y Bramley, 1988), *Cercospora nicotianae* (Daub y Payne, 1989), *Aschersonia aleyroides* (Van Eijk *et al.*, 1979) y *Penicillium* sp. (Han *et al.*, 2005). Los genes responsables de esta ruta han recibido escasa atención a nivel molecular en estos organismos, y sólo se ha descrito el gen de la desaturasa en *C. nicotianae* (Ehrenshaft y Daub, 1994). Como se describirá más adelante, el  $\beta$ -caroteno puede estar presente además como intermediario o producto lateral de la síntesis de xantofilas en otros hongos. También acumulan  $\beta$ -caroteno algunos mutantes de *X. dendrorhous* (Johnson, 2003) o *Rhodotorula glutinis* (Bhosale y Gadre, 2001).

## PRODUCCIÓN DE NEUROSPORAXANTINA EN ASCOMICETOS

La neurosporaxantina es un apocarotenoide monocíclico de 35 átomos de carbono con un grupo carboxilo en el extremo lineal de la molécula (figura 2). Su nombre proviene de su descubrimiento en *Neurospora crassa*, donde se encontró junto con otros carotenoides (Zalokar, 1957). El análisis posterior de su estructura química reveló que se trata del ácido  $\beta$ -apo-4'-carotenoico (Aasen y Jensen, 1965). La neurosporaxantina es producida también por los géneros *Fusarium* (Bindl, Lang y Rau, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1986), *Verticillium* (Valadon y Mummery, 1969; Valadon *et al.*, 1982) y *Podospora* (Strobel *et al.*, 2009). En algunos hongos, la neurosporaxantina es objeto de modificaciones químicas secundarias, como la esterificación con un grupo metilo en *Verticillium agaricinum* (Valadon y Mummery, 1977) o con un grupo glucosilo en *Fusarium* sp. (Sakaki *et al.*, 2002).

El análisis de los carotenoides intermediarios detectados en *Neurospora* (Harding *et al.*, 1969; Mitzka y Rau, 1977) y en *Fusarium* (Bindl, Lang y Rau, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987), sugieren rutas biosintéticas de neurosporaxantina muy parecidas en ambas especies, con cinco desaturaciones y un paso de ciclación, aunque con diferencias en el orden en que ocurren algunas de las reacciones (figura 2). Así, entre los carotenoides encontrados en *N. crassa* figura el 3,4-didehidrolicopeno, resultado de cinco desaturaciones en la molécula de fitoeno. Sin embargo, la ciclación puede producirse en pasos anteriores, como demuestra la detección de  $\gamma$ -caroteno o  $\beta$ -zeacaroteno, procedentes de la ciclación del neurosporeno o el licopeno. Estos compuestos se encuentran también en *Fusarium*, mientras que el 3,4-didehidrolicopeno no ha sido aún descrito en este hongo (Bindl *et al.*, 1970; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987).



**FIGURA 2.** Biosíntesis de la neurosporaxantina en *Fusarium* y *Neurospora*. Los intermediarios pueden variar según el orden en que se produzcan las reacciones. De acuerdo con los intermediarios detectados en las distintas especies, los pasos indicados con flechas blancas sólo se han observado en *Neurospora*, con flechas grises sólo en *Fusarium*, y con flechas negras en ambos géneros. Como rama lateral, el  $\gamma$ -caroteno puede ser convertido también en  $\beta$ -caroteno (reacción no mostrada en la figura).

Los primeros pasos de la ruta coinciden con los de la síntesis de  $\beta$ -caroteno, empezando por la síntesis de fitoeno a partir de GGPP (Spurgeon, Turner y Harding, 1979). Los genes responsables de los primeros pasos se identificaron inicialmente en *N. crassa* gracias al análisis genético de mutantes albinos, denominados *al-1*, *al-2* (Huang, 1964) y *al-3* (Goldie y Subden, 1973). Sus posteriores estudios a nivel molecular mostraron que AL-1 es la desaturasa responsable de las reacciones de desaturación (Bartley *et al.*,

1990; Schmidhauser *et al.*, 1990), AL-2 la sintasa de fitoeno (Schmidhauser *et al.*, 1994) y AL-3 la transferasa de prenilo que sintetiza GGPP a partir de FPP (Sandmann *et al.*, 1993). Mientras que los mutantes nulos para los genes *al-1* y *al-2* son viables, sólo se obtienen mutantes con actividad residual de AL-3 (Barbato *et al.*, 1996), un resultado coherente con la utilización del GGPP para la síntesis de otros terpenoides esenciales. Análisis más detallados confirmaron que AL-1 es capaz de llevar a cabo las cinco desaturaciones de la ruta



(Hausmann y Sandmann, 2000) y que AL-2 posee también actividad ciclasa (Arrach, Schmidhauser y Ávalos, 2002), como ya se ha mencionado para la enzima ortóloga de otros hongos. Esta función dual de AL-2 se ha confirmado además mediante análisis de nuevos alelos mutantes del gen (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011a) y mediante ensayos enzimáticos en un sistema heterólogo (Sandmann *et al.*, 2006). Este último estudio mostró además que AL-2 lleva a cabo preferentemente una única ciclación, como cabe esperar de su participación en la síntesis de un apocarotenoide monocíclico como la neurosporaxantina. Se han identificado también genes similares a *al-1*, *al-2* y *al-3* en *Fusarium fujikuroi*, donde se han denominado respectivamente *carB*, *carRA* (Linnemannstöns *et al.*, 2002; Prado-Cabrero *et al.*, 2009) y *ggs1* (Mende, Homann y Tudzynski, 1997), habiéndose identificado también en otras especies de *Fusarium* (Jin, Lee y Lee, 2010; Ádám *et al.*, 2011; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). En el caso de *al-2* y *carRA*, a diferencia de su homólogo de mucorales, no hay datos que

apoyen la separación física de los dominios sintasa de fitoeno y ciclasa como polipéptidos independientes.

Las cinco desaturaciones y la ciclación dan lugar al toruleno, el precursor de la neurosporaxantina. La síntesis de esta xantofila requiere dos actividades enzimáticas adicionales. Una oxigenasa de carotenoides, codificada por los genes *cao-2* en *Neurospora* (Saelices *et al.*, 2007) y *carT* en *Fusarium* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007), produce una rotura asimétrica en el extremo lineal de la molécula de toruleno para producir  $\beta$ -apo-4'-carotenal, que tiene 35 átomos de carbono. CAO-2 no es capaz de reconocer como sustrato al  $\gamma$ -caroteno, por lo cual son necesarias las cinco desaturaciones para que esta enzima pueda llevar a cabo su reacción. Sin embargo, es capaz de producir el corte oxidativo en ausencia de ciclación, como indica la introducción de la ciclación al final de la ruta en *Neurospora* cuando este hongo se incubaba a baja temperatura (Estrada *et al.*, 2008a). El  $\beta$ -apo-4'-carotenal es sustrato de una deshidrogenasa de aldehído, codificada por los genes *ylo-1* en *Neurospora* (Estrada *et al.*, 2008b) y *carD* en *Fusarium* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011), y que oxida el grupo aldehído a carboxilo para generar finalmente la neurosporaxantina.

La participación de estos genes en la ruta biosintética fue confirmada por el fenotipo de sus pérdidas de función por mutación. Los mutantes albinos o carecen de caroteno (*al-2*, *al-3*, *carRA*) o acumulan fitoeno (*al-1*, *carB*), indistinguible a simple vista. Los mutantes *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) y *carT* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007) presentan una pigmentación rojiza, causada por la acumulación de toruleno. Finalmente, los mutantes de los genes *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b) y *carD* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011) muestran una pigmentación amarillenta, causada por una mezcla compleja de carotenoides. La carencia de la deshidrogenasa de aldehído

debería dar lugar a la acumulación de  $\beta$ -apo-4'-carotenal carotenal, por lo que estos mutantes deberían tener un color anaranjado, pero la inestabilidad de este carotenoide provoca la acumulación de otros derivados. En el caso del mutante *ylo-1*, en función de las condiciones de cultivo, se ha detectado apo-4'-licopenal, apo-4'-licopenol (Estrada *et al.*, 2008a), apo-4'- $\gamma$ -carotenal, apo-4'- $\gamma$ -carotenol, y derivados esterificados, como 4'-apolicopeno-4'-miristato o 4'-apo- $\gamma$ -caroteno-4'-miristato (Sandmann, Takaichi y Fraser, 2008). La complejidad química de este mutante, conocido hace más de cuarenta años (Goldie y Subden, 1973), retrasó mucho la identificación de la actividad enzimática afectada. Sin embargo, el mutante del gen ortólogo en *Fusarium*, *carD*, presenta un color anaranjado en la fase inicial de cultivo, pero vira a un color amarillento a medida que envejece debido a la conversión del  $\beta$ -apo-4'-

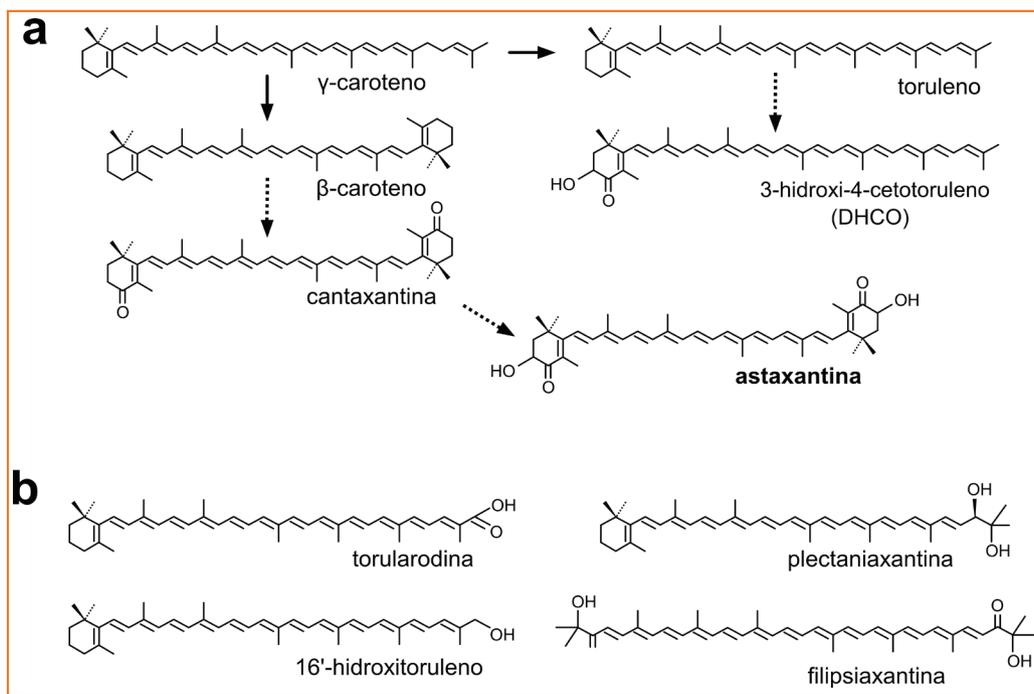


carotenal a  $\beta$ -apo-4'-carotenol y, presumiblemente, a derivados esterificados (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011). La mayoría de estos genes también mutan en *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), confirmando los fenotipos observados en *F. fujikuroi* (Jin, Lee y Lee, 2010).

## SÍNTESIS DE ASTAXANTINA Y OTRAS XANTOFILAS

La astaxantina es una xantofila de color rojizo producida por microalgas y bacterias, con frecuencia en ecosistemas acuáticos, en los que a través de la cadena alimentaria acaban siendo fuente de pigmentación (color "salmón") en muchos peces y crustáceos, así como en algunas aves, como los flamencos. La astaxantina es producida también por la levadura *X. dendrorhous*, anteriormente conocida como *Phaffia rhodozyma* (Johnson, 2003). Esta xantofila posee un notable interés biotecnológico, especialmente debido a su empleo en acuicultura para proporcionar pigmentación en truchas y salmones (Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela y Goycoolea, 2006). Su producción industrial se basa en gran medida en cultivos de *X. dendrorhous* y del alga *Haematococcus pluvialis* (Domínguez-Bocanegra, Ponce-Noyola y Torres-Muñoz, 2007).

La astaxantina se sintetiza a partir del  $\beta$ -caroteno mediante la introducción de grupos ceto e hidroxilo en sus anillos  $\beta$  (figura 3a). La síntesis de  $\beta$ -caroteno es llevada a cabo en *X. dendrorhous* por la desaturasa CrtI (Verdoes *et al.*, 1999a) y la sintasa de fitoeno-ciclasa CrtYB (Verdoes *et al.*, 1999). Como ya se ha indicado, el análisis bioquímico de CrtYB permitió asignar por primera vez la actividad ciclasa en hongos a la región del extremo amino de la sintasa de fitoeno. En *X. dendrorhous* la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina la



**FIGURA 3.** Biosíntesis de otras xantofilas en hongos: *a*) biosíntesis de la astaxantina en *X. dendrorhous*. Sólo se indican los pasos a partir del  $\gamma$ -caroteno. En una rama lateral, el  $\gamma$ -caroteno puede sufrir una quinta desaturación para producir toruleno, el cual puede ser objeto de las reacciones de hidroxilación y cetolización en el anillo  $\beta$  para producir 3-dihidroxi-4-cetotoruleno como producto secundario; *b*) estructura química de otras xantofilas fúngicas.

realiza una sola enzima de la familia de las oxigenasas P450 (Álvarez *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2006), codificada por el gen *crtS/ast*, con la participación de al menos una reductasa de citocromo P450 para proporcionar los electrones en las reacciones de oxigenación (Alcaíno *et al.*, 2008). Este paso biosintético difiere en algas y bacterias productoras de astaxantina, donde su síntesis a partir de  $\beta$ -caroteno es mediada por dos enzimas independientes con actividades hidrolasa y cetolasa (Fraser, Miura y Misawa, 1997).

El interés biotecnológico de las xantofilas ha justificado numerosos estudios para su búsqueda en otras levaduras. Tras la astaxantina destaca la torularodina, un derivado carboxílico del toruleno de estructura similar a la neurosporaxantina (figura 3b). La síntesis de torularodina ha recibido especial atención en el género *Rhodotorula* (Frenгова y Beshkova, 2009; Moliné, Libkind y Van Broock, 2012), pero también se ha encontrado en otras levaduras, como *Peniophora* (Arpin, Lebreton y Fiasson., 1966), *Cystofilobasidium*, *Rhodospodium*, *Sporobolomyces*, y *Sporidiobolus* (Davoli, Mierau y Weber, 2004; Buzzini *et al.*, 2007; Iurkov *et al.*, 2008). También se han identificado otras xantofilas en hongos, como la cantaxantina en *Cantharellus cinnabarinus* (Haxo, 1950), el 16'-hidroxitoruleno en *Cystofilobasidium* (Herz *et al.*, 2007), la plectanixantina en *Dioszegia* sp. (Madhour *et al.*, 2005) y la filipsiixantina en *Phillipsia carminea* (Arpin y Liaaen-Jensen, 1967).

La disponibilidad de herramientas moleculares permite modificar genéticamente otros hongos para producir xantofilas. La introducción en *M. circinelloides* de genes heterólogos de origen bacteriano ha permitido la producción de cantidades variables de  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, equinenona, cantaxantina y astaxantina además de su producto habitual, el  $\beta$ -caroteno (Papp *et al.*, 2006; 2013; Csernetics *et al.*, 2011). Los mismos carotenoides los sintetizan estirpes de *S. cerevisiae* a las que se han introducido genes bacterianos y la levadura *X. dendrorhous* para la producción de xantofilas (Ukibe *et al.*, 2009).

## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN HONGOS

Debido al interés en las aplicaciones de los carotenoides y al uso de algunos hongos para su producción biotecnológica, la regulación de su síntesis ha recibido especial atención en estos organismos. En función de las especies, la síntesis se estimula mediante la luz o por algunas condiciones adversas de cultivo, como la escasez de nutrientes o el estrés oxidativo. En algunos casos se conocen los mecanismos de regulación asociados a determinadas etapas del desarrollo o del ciclo de vida. La existencia de proteínas reguladoras específicas se evidencia debido a la existencia de mutantes regulatorios, algunos de los cuales se han estudiados con especial detalle. Se describen a continuación los principales aspectos de los mecanismos de regulación.

### Estimulación mediante la luz

La inducción por luz es un carácter frecuente en los hongos productores de carotenoides (Ávalos, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1993). Entre los casos mejor conocidos figuran la fotoinducción de la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1991), *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Velayos *et al.*, 1997) y *A. giganteus* (El-Jack, Mackenzie y Bramley, 1988) junto con la de neurosporaxantina en *N. crassa* (Ávalos y Corrochano, 2013) y en distintas especies de *Fusarium* (Ávalos y Estrada, 2010). También se ha descrito fotoinducción de la síntesis de astaxantina en mutantes de *X. dendrorhous* (Meyer y Du Preez, 1994). Sin embargo, la inducción por luz no es una regla general. Así, por ejemplo, la síntesis de  $\beta$ -caroteno no aumenta significativamente en *B. trispora* (Sutter, 1970) o en *U. maydis* (Estrada *et al.*, 2010) cuando se cultivan bajo iluminación continua.

En algunos casos la fotoinducción se ha estudiado con gran detalle. En *P. blakesleeanus*, la fotorrespuesta se limita a una etapa concreta del desarrollo, antes de la formación de los esporangióforos, estructuras en las que se desarrollan las esporas asexuales (Bejarano *et al.*, 1991). En esta fase del desarrollo, la aplicación de distintos flujos de luz al mismo tiempo permitió detectar dos niveles de sensibilidad, con distintos umbrales y rangos de respuesta. Una exposición a luz muy débil produce una pequeña estimulación que se satura a flujos mayores, hasta alcanzar un umbral capaz de producir una respuesta mucho más fuerte. Se ha encontrado también una respuesta bifásica al flujo luminoso en *N. crassa* (Schrott, 1980). La fotoinducción es particularmente eficaz en este hongo, capaz de producir un incremento sensible de la carotenogénesis después de sólo un minuto de exposición a la luz (Zalokar, 1955) o incluso menos (Rau, Lindemann y Rau-Hund, 1968), alcanzando su valor máximo aproximadamente 6-8 horas después del estímulo. Sin embargo, una vez disparada la respuesta a un pulso de luz, el hongo es insensible temporalmente a un segundo pulso (Schrott, 1981), indicando un bloqueo temporal del sistema de fotorrecepción. La respuesta es menos eficaz en *Fusarium aquaeductuum* (Bindl, Lang y Rau, 1970) y *F. fujikuroi* (Ávalos y Schrott, 1990), y en estos casos es necesario al menos una hora de iluminación para una respuesta detectable.

En los casos investigados, la inducción mediante la luz tiene lugar a nivel de transcripción de los genes estructurales. En los hongos mucorales, el incremento es particularmente fuerte en *M. circinelloides*, y es suficiente un pulso de 10 minutos de luz azul para que los niveles de ARNm de los genes *carB* y *carRA* aumenten hasta 300 veces (Velayos *et al.*, 2000; 2000a), mientras que el incremento no es tan acusado en *P. blakesleeanus* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001;

Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). Un estudio más detallado en este hongo mostró dos picos en la cinética de fotoinducción, uno en los primeros dos minutos y otro a los 20 minutos, y detectó la unión de un posible complejo inhibidor a la doble región promotora *carB/carRA* (Sanz *et al.*, 2010). Los ARNm de los genes *carRA* y *carB* también aumentan tras la exposición a la luz en *B. trispora*, a pesar de que sus cultivos con luz continua no acumulan más carotenoides que los incubados en la oscuridad (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005). Esta discrepancia parece deberse a la transitoriedad de la fotorrespuesta, un fenómeno conocido como fotoadaptación, observado también en otros hongos, que permite la atenuación de la expresión de los genes de la carotenogénesis tras exposiciones prolongadas a la luz. Sin embargo, la iluminación de micelio de *B. trispora* previamente incubado en la oscuridad produce un aumento significativo en el contenido de carotenoides (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005), lo que obliga a reconsiderar su supuesta falta de fotoinducción.

En los ascomicetos se han descrito también fotorrespuestas similares para los genes de la carotenogénesis. En *N. crassa*, los niveles de ARNm de los genes *al-1* (Schmidhauser *et al.*, 1990), *al-2* (Schmidhauser *et al.*, 1994) y *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) aumentan enormemente al exponer el hongo a la luz, pero no se ha detectado fotoinducción para el último gen de la ruta, *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b). Como en los hongos mucorales, el aumento es transitorio, ya que disminuye a niveles casi basales unas horas después del estímulo. El mecanismo molecular de la fotoadaptación se ha estudiado en especial detalle en este hongo (He y Liu, 2005), donde implica cambios en la actividad de su complejo fotorreceptor WC. En el proceso participan otras proteínas reguladoras, y tiene un papel importante la flavoproteína VIVID (VVD) (Shrode *et al.*, 2001; Schwerdtfeger y Linden, 2003), llamada así por el mayor

contenido en carotenoides de sus mutantes en condiciones de iluminación.

Los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB* (Linnemannstöns *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2004) y *carT* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007) de *F. fujikuroi* manifiestan una fotorregulación similar a la de sus ortólogos *al-1*, *al-2* y *cao-2* en *N. crassa*. Sin embargo, los del gen *carD*, ortólogo de *ylo-1*, no están influidos por la luz de forma significativa (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011). Una fotoinducción similar de *carRA* y *carB* se ha descrito en *Fusarium oxysporum* (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012) y en *Fusarium verticillioides* (Ádám *et al.*, 2011). La regulación por luz se ha estudiado también para los genes de la síntesis de GGPP, un sustrato que no es exclusivo de la síntesis de carotenoides. Los niveles de ARNm de estos genes son fotoinducibles en *N. crassa*, *al-3*, (Nelson *et al.*, 1989; Baima, Macino y Morelli, 1991), y *M. circinelloides*, *carG* (Velayos *et al.*, 2003), pero no en *F. fujikuroi*, *ggs1* (Mende, Homann y Tudzynski, 1997). En este último hongo hay un segundo gen presuntamente implicado en la síntesis de GGPP en la ruta biosintética de giberelinas, *ggs2* (Tudzynski, 2005), pero no se ha estudiado su posible regulación mediante la luz.

## Fotorreceptores responsables de la inducción mediante la luz

Uno de los aspectos de mayor interés en los estudios de la regulación mediante luz es la identificación de los fotorreceptores responsables. El espectro de acción de la fotorrespuesta se ha determinado para *F. aquaeductuum* (Rau, 1967), *N. crassa* (De Fabo, Harding y Shropshire, 1976) y para los dos niveles de sensibilidad de *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1991). Los espectros obtenidos son comparables, teniendo en cuenta las diferencias experimentales, y compatibles con

la participación de una flavina como pigmento responsable de la absorción de luz. La mediación de una flavina quedó en evidencia en *N. crassa* por la menor fotoinducción observada en mutantes con un contenido reducido de este compuesto (Paietta y Sargent, 1981) y por la no recuperación de la respuesta por adición de análogos de la riboflavina (Paietta y Sargent, 1983).

El primer fotorreceptor se identificó en *N. crassa*, donde la respuesta es mediada por el complejo "white collar" (WC). El nombre proviene del fenotipo de sus mutantes, que en los cultivos en tubos de agar muestran un anillo blanco de micelio en la base debido a la ausencia de fotoinducción de la carotenogénesis, mientras que la masa de micelio aéreo es de color anaranjado debido a la inducción de la síntesis de carotenoides durante la conidiación. El complejo WC es un heterodímero formado por dos proteínas, llamadas WC-1 y WC-2, identificadas mediante el análisis de los mutantes afectados en los correspondientes genes, *wc-1* y *wc-2*. Los estudios moleculares mostraron que ambos mutantes habían perdido la inducción por luz de la actividad biosintética del fitoeno (Harding y Turner, 1981), así como la propia síntesis de los carotenoides (Degli-Innocenti y Russo, 1984) y la transcripción de los genes estructurales (Saelices *et al.*, 2007). Cuando detecta la luz, el complejo WC se une a los promotores de los genes diana (He y Liu, 2005), habiéndose identificado en algunos de ellos posibles elementos reguladores responsables de dicha unión (Carattoli *et al.*, 1994). Dentro del complejo, la función fotorreceptora la desempeña WC-1, que es la que contiene el cromóforo de flavina.

Estudios posteriores en otros hongos han identificado sistemas fotorreceptores similares. En *P. blakesleeanus*, los mutantes regulatorios *madA* y *madB* muestran una disminución en

la inducción por luz de la carotenogénesis, y los dobles mutantes *madA madB* están más fuertemente afectados en la fotorrespuesta (Jayaram, Leutwiler y Delbrück, 1980; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). La disponibilidad de la secuencia del genoma permitió identificar los genes responsables: *madA* resultó ser homólogo de *wc-1* (Idnurm *et al.*, 2006) y *madB* de su correspondiente pareja *wc-2*, una conclusión apoyada por la capacidad de las proteínas MadA y MadB para interaccionar y formar un complejo (Sanz *et al.*, 2009). El análisis del genoma de *P. blakesleeanus* reveló la existencia de cinco genes para otras dos proteínas del tipo WC-1, que se denominaron WcoA y WcoB, y para otras tres proteínas de tipo WC-2, que se denominaron WctB, WctC y WctD (Corrochano y Garre, 2010). La existencia de esta variedad permitiría múltiples combinaciones en la formación de complejos WC, aunque hasta ahora sólo se ha demostrado la formación del complejo MadA-MadB (Sanz *et al.*, 2009). La regulación mediante luz puede implicar la participación de otras proteínas, como indica la identificación de otros mutantes con menor sensibilidad a la luz, como los afectados en los genes *picA*, *picB* (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980) y *pimA* (Flores Cerdá-Olmedo y Corrochano, 1998), cuyos productos no han sido aún identificados.

*M. circinelloides* posee un juego similar de genes *wc* (Corrochano y Garre, 2010). En este caso, la disponibilidad de herramientas de transformación permitió su mutagénesis dirigida, y por lo tanto el estudio de sus funciones. Así, los mutantes nulos de *mcwc-1c* (ortólogo de *wcoA*) carecen de fotoinducción de la síntesis de  $\beta$ -caroteno, y los de *mcwc-1a* (ortólogo de *madA*) están específicamente afectados en la respuesta a la luz del desarrollo de los esporangióforos, mientras que los mutantes de *mcwc-1b* (ortólogo de *wcoB*) carecen de fenotipo detectable (Silva, Torres-Martínez y

Garre, 2006). Sin embargo, aunque el mutante nulo de *mcwc-1a* muestre fotoinducción de la carotenogénesis, la proteína MCWC-1A participa en la inducción por luz del gen *mcwc-1c*, por lo cual la fotoinducción de la transcripción de los genes estructurales *carB* y *carRP* baja considerablemente tanto en los mutantes carentes de MCWC-1A como de MCWC-1C, implicando a ambas proteínas en su mecanismo de regulación por luz.

También se han encontrado diferencias en la función del complejo WC en el género *Fusarium*, cuyos genomas poseen un solo juego de genes de tipo *wc-1* y *wc-2* (Ávalos y Estrada, 2010). Los mutantes de *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* carentes de proteína funcional WC-1 (llamadas WcoA y Wc1 respectivamente) muestran todavía un nivel significativo de fotocarotenogénesis (Estrada y Ávalos, 2008; Ruiz-Roldán *et al.*, 2008), sugiriendo la participación de al menos un segundo fotorreceptor. En *F. fujikuroi* se han obtenido mutantes de otros tres fotorreceptores, el criptocromo DASH CryD (Castrillo, García-Martínez y Ávalos, 2013) y las rodopsinas CarO (Prado *et al.*, 2004) y OpsA (Estrada y Ávalos, 2009), pero todos ellos conservan la capacidad de fotoinducir la fotocarotenogénesis. Sin embargo, los mutantes del gen de la adenilato ciclasa, *acyA*, de *F. fujikuroi* (García-Martínez, Ádám y Ávalos, 2012) o del gen *MAT1-2-1* del locus sexual de *F. verticillioides* (Ádám *et al.*, 2011), muestran niveles menores de fotoinducción, lo que indica la existencia de una regulación más compleja que la observada en *N. crassa* o en *P. blakesleeanus*. Datos recientes de *F. fujikuroi* indican que WcoA juega un papel similar al de WC-1 en *N. crassa* y que el criptocromo CryD es capaz de llevar a cabo una fotoinducción por un mecanismo molecular que no actúa a nivel de la transcripción (Castrillo y Ávalos, 2015).

## Mutantes superproductores de carotenoides

Los mutantes afectados en genes de reguladores positivos de la carotenogénesis, como los fotorreceptores MadA y MadB en *P. blakesleeanus* o WC-1 y WC-2 en *N. crassa*, presentan caídas en las cantidades de carotenoides en la luz. La base molecular de otros mutantes con menores cantidades de carotenos, como los del gen *carC* de *P. blakesleeanus* (Revuelta y Eslava, 1983), u otros de *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995) o *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996; Velayos *et al.*, 1997), es desconocida. Sin embargo, debido a sus implicaciones biotecnológicas, son de especial interés las mutaciones en genes de reguladores negativos de la carotenogénesis, ya que se espera que den lugar a incrementos en la producción de carotenoides. Tales tipos de mutantes se han descrito en distintos hongos. En *P. blakesleeanus* los análisis genéticos de mutantes con un mayor contenido en  $\beta$ -caroteno en la oscuridad los han distribuido en tres genes, *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976), *carD* (Salgado, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989) y *carF* (Mehta *et al.*, 1997). Se han descrito mutantes similares en *B. trispora* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003) y *M. circinelloides* (Navarro, Sandmann y Torres-Martínez, 1995; Fraser *et al.*, 1996), pero el aumento en la producción respecto a la estirpe silvestre es sólo de tres a cuatro veces, comparado con las cien veces de diferencia que se llega a alcanzar en algunos mutantes *carS* o *carF* en *P. blakesleeanus*. Los mutantes *carS* de *P. blakesleeanus* están afectados en una enzima que utiliza el  $\beta$ -caroteno para la síntesis de otros compuestos no coloreados y no en una proteína reguladora. Por ese mismo motivo, los mutantes de los genes *carB* o del dominio ciclasa de *carRA* acumulan los sustratos de las correspondientes enzimas (fitoeno y licopeno, respectivamente)

en cantidades muy superiores a las de  $\beta$ -caroteno en la estirpe silvestre de la que proceden.

El primer gen implicado en la regulación de la síntesis de carotenoides en los hongos, ajeno a la regulación por luz, fue *crgA* de *M. circinelloides* (Navarro *et al.*, 2000), que codifica una proteína de la familia “RING finger” con un dominio LON. La pérdida de CrgA produce un incremento en los niveles de ARNm de los genes estructurales *carRA* y *carB*, aunque siguen conservando su respuesta a la luz (Navarro, Ruiz-Pérez y Torres-Martínez, 2001; Lorca-Pascual *et al.*, 2004). De acuerdo con las características de la proteína, se ha propuesto que CrgA ejerce su función interaccionando con proteínas diana y provocando su ubiquitinación, lo que puede conducir a su degradación por el proteosoma (Lorca-Pascual *et al.*, 2004). Además, se ha observado que CrgA inactiva a MCWC-1B por proteólisis independiente de ubiquitinación (Silva *et al.*, 2008). CrgA no es un regulador exclusivo de la carotenogénesis, ya que afecta también a otros procesos, como el crecimiento vegetativo y la esporulación (Quiles-Rosillo, Torres-Martínez y Garre, 2003; Murcia-Flores *et al.*, 2007). Proteínas similares a CrgA se encuentran en otros mucorales, como *B. trispora* (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005).

En *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* se han descrito mutantes superproductores de neurosporaxantina, genéricamente llamados *carS* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). Los mutantes *carS*, que acumulan cantidades elevadas de carotenoides con independencia de las condiciones de cultivo, poseen niveles anormalmente altos de los ARNm de los genes de la ruta (Prado *et al.*, 2004; Thewes *et al.*, 2005; Prado-Cabrero *et al.*, 2007a), lo que se refleja en una elevada actividad carotenogénica *in vitro* (Ávalos *et al.*, 1988). De forma similar a como se observó para los mutantes

*crgA* de *M. circinelloides*, los genes estructurales de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* son capaces aun de responder a la luz en los mutantes *carS* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). El fenotipo *carS* de ambas especies suele deberse a mutaciones en un gen para una proteína de la familia RING Finger, emparentada con CrgA y denominada CarS (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012; Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2013). El grado de similitud de CarS con CrgA no es muy alto, pero cubre toda la proteína y sus dominios principales, lo que sugiere un origen evolutivo común. A pesar de su llamativo fenotipo, no se han descrito mutantes *carS* en otras especies de *Fusarium*. En *F. fujikuroi*, los mutantes *carS* están también afectados en la producción de otros metabolitos secundarios, como las giberelinas y las bikaverinas, (Candau, Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1991; Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2009), pero no muestran alteraciones en el desarrollo o en la esporulación.

En *N. crassa* no existen mutantes superproductores de neurosporaxantina equiparables a los mutantes *carS* de *Fusarium*, pero se han descrito mutantes con patrones parcialmente desregulados en la oscuridad o en la luz. Los mutantes *ccb-1* y *cbb-2* poseen niveles de carotenoides ligeramente desregulados en la oscuridad, aunque no muestran más cantidad de ARNm de los genes estructurales (Linden, Rodríguez-Franco y Macino, 1997). De ellos, sólo *ccb-2* acumula más cantidad de carotenoides también en la luz, en este caso con un aumento apreciable de los niveles de ARNm. Otros mutantes no muestran cambios en la oscuridad pero producen más carotenoides en la luz. A esta clase pertenecen los mutantes *ovc* (Harding *et al.*, 1984) y *vvd*, este último ya mencionado por su participación en el mecanismo de fotoadaptación. El mutante *ovc* es más complejo, ya que presenta además alteraciones del desarrollo y en la sensibilidad

al estrés osmótico (Youssar *et al.*, 2005) y se debe a una delección que abarca una veintena de genes (Youssar y Ávalos, 2007). Entre ellos se encuentra el gen *cut-1*, responsable de las alteraciones adicionales e indirectamente también de la superproducción de carotenoides. También se puede aumentar la producción de carotenoides en *Neurospora* al mejorar la provisión de sustrato mediante el incremento de la actividad biosintética de mevalonato a partir del HMG-CoA (Wang y Keasling, 2002), o sometiendo el hongo a estrés oxidativo.

### Activación química de la carotenogénesis

En los hongos mucorales *P. blakesleeanus* y *B. trispora*, la presencia de algunos compuestos químicos aumenta la producción de la síntesis de  $\beta$ -caroteno. En el caso de *P. blakesleeanus* hay al menos dos familias de compuestos químicos inductores con distintos mecanismos de acción: los retinoides y los fenoles (Bejarano *et al.*, 1988). Los retinoides, como el retinol y la  $\beta$ -ionona (Eslava, Álvarez y Cerdá-Olmedo, 1974), tienen en común la presencia de un anillo  $\beta$  y pueden actuar compitiendo con el  $\beta$ -caroteno para unirse a alguna enzima o proteína reguladora. Por otra parte, los compuestos fenólicos poseen una eficacia muy variable y no se ha identificado una característica química común que esté ausente en los fenoles inactivos y que se pueda, por lo tanto, asociar a su actividad (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). Los más eficientes son el veratrol y el ftalato de dimetilo, cuya acción independiente de los retinoides se pone de manifiesto por el efecto aditivo producido en presencia de ambos tipos de activadores (Bejarano *et al.*, 1988).

Debido al uso biotecnológico de *B. trispora* para la producción de carotenoides, la activación química de la carotenogénesis ha recibido una atención muy considerable en esta especie.

El retinol ejerce también un efecto activador (Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008), aunque no es tan eficaz como en *P. blakesleeanus* (Bejarano *et al.*, 1988), y los fenoles carecen de efecto. Una búsqueda sistemática de activadores de la carotenogénesis en *B. trispora* encontró un efecto estimulador en la  $\beta$ -ionona así como en una gran diversidad de compuestos químicos, entre los que figuran amidas, imidas, lactamas, hidrazidas y derivados de las piradinas (Ninet, Renaut y Tissier, 1969). Más recientemente, se han encontrado también efectos inductores en el uso de surfactantes, como el monolaureato de sorbitano (Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008), el ácido araquidónico (Hu, Sun *et al.*, 2012) y el fungicida ketoconazol (Dong *et al.*, 2008), cada uno de ellos atribuible a distintos mecanismos de acción.

Un caso especialmente relevante de activación química de la carotenogénesis es el llevado a cabo en los mucorales por los ácidos trispóricos, hormonas sexuales sintetizadas tras la interacción entre estirpes de sexo contrario (Sutter, Harrison y Galasko, 1974; Sutter, 1987). En algunas especies, dichas hormonas provocan una fuerte activación en la acumulación de  $\beta$ -caroteno (Blakeslee, 1904). En *P. blakesleeanus*, los cultivos conjuntos de dos estirpes de sexo opuesto (cultivos "mixtos") contienen cinco veces más carotenoides que los cultivos individuales (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986), un aumento debido a un mayor nivel de expresión de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008), y al consiguiente incremento en actividad enzimática (Salgado *et al.*, 1991). La estimulación es producida también por la adición de las hormonas o de moléculas análogas a éstas a los cultivos individuales tanto de *P. blakesleeanus* (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) como de otros mucorales (Sahadevan *et al.*, 2013). En *P. blakesleeanus* la estimulación sexual de la carotenogénesis en los cultivos mixtos es aún mayor en los

heterocariontes sexuales, es decir, aquellos con núcleos de ambos sexos en el mismo citoplasma, muy especialmente si los núcleos llevan mutaciones en el gen *carS* (Murillo *et al.*, 1978).

La estimulación de la producción de  $\beta$ -caroteno en los cultivos mixtos es particularmente eficaz en *B. trispora* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004), una circunstancia aprovechada por la industria para su producción a gran escala. Como en *P. blakesleeanus*, la estimulación es una consecuencia del fuerte incremento en los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* (Schmidt *et al.*, 2005) y de las consiguientes actividades enzimáticas (Breitenbach, Fraser y Sandmann, 2012). La estimulación es aún mayor si los cultivos mixtos se realizan con mutantes con mayor contenido de caroteno, tanto empleando cultivos mixtos como heterocariontes (Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003). Los mismos métodos de cultivo permiten usar *B. trispora* para la producción de licopeno en lugar de  $\beta$ -caroteno bloqueando la actividad ciclasa por medios químicos o genéticos (Mehta, Obraztsova y Cerdá-Olmedo, 2003; Choudhari, Ananthanarayan y Singhal, 2008). La existencia del mismo mecanismo de estimulación sexual haría de *P. blakesleeanus* un organismo igualmente propicio para la producción industrial de carotenoides, y sus mutantes superproductores alcanzan niveles de carotenoides mayores que sus equivalentes en *B. trispora*. Sin embargo, la síntesis de carotenoides en *P. blakesleeanus* es particularmente eficaz en cultivos en superficie, pero no tanto en cultivos sumergidos (Lilly, Barnett y Krause, 1960), usualmente preferidos por la industria fermentativa.

## Regulación a nivel de desarrollo

Los hongos poseen distintas etapas de desarrollo en sus ciclos de vida, en algunos casos asociados a la regulación

de la síntesis de carotenoides. Como ya se mencionó, en *P. blakesleeanus* el micelio se vuelve insensible a la fotoinducción de la síntesis de  $\beta$ -caroteno cuando se inicia la formación de los esporangióforos (Bejarano *et al.*, 1991). Por el contrario, en *Sclerotinia sclerotiorum*, el contenido en  $\beta$ -caroteno aumenta en la fase de diferenciación, en la que se forman los esclerocios (Georgiou *et al.*, 2001a).

En *N. crassa*, la producción de neurosporaxantina está asociada a la producción de conidios de forma independiente a la presencia de luz. Ambos tipos de regulación se ponen en evidencia en los mutantes *wc-1*, incapaces de fotoinducir la síntesis de esta xantofila en las hifas, pero capaces de acumularla en las esporas tanto en presencia de luz como en oscuridad. La conidiación está reprimida en los cultivos sumergidos y se estimula en las hifas aéreas. A las 16 horas de exposición al aire se induce la expresión de los genes *al-1* y *al-2*, aunque el micelio esté en la oscuridad (Li y Schmidhauser, 1995). Dicha inducción no se observa en los mutantes *fluffy* o *fluffyoid*, los cuales están bloqueados en la inducción del proceso de conidiación. La regulación independiente por luz y desarrollo es especialmente patente en el caso del gen *al-3*, para el que se han encontrado transcritos específicos para cada activación debidos a sitios distintos de inicio de la transcripción (Arpaia, Carattoli y Macino, 1995; Li, Sachs y Schmidhauser, 1997), lo que implica mecanismos reguladores independientes. Además de los diferentes sitios de inicio de la transcripción, se han encontrado indicios de sitios alternativos de inicio de la traducción en el mismo gen, que podrían indicar también diferencias regulatorias (Vittorioso *et al.*, 1994). No se han detectado transcritos de *al-3* en los conidios maduros, lo que sugiere que los carotenoides se acumulan durante su proceso de desarrollo, pero el gen conserva la capacidad para responder a la luz en el conidio (Baima *et al.*, 1992).

El AMP cíclico (AMPc) es una importante señal en el desarrollo de los hongos. Las mutaciones en el gen de la ciclasa de adenilato en algunas especies dan lugar a alteraciones en el desarrollo y el crecimiento y a cambios en la síntesis de carotenoides. Así, los mutantes de dicho gen, *cr-1* en *N. crassa* (Kritsky *et al.*, 1982) y *acyA* en *F. fujikuroi* (García-Martínez, Ádám y Ávalos, 2012), contienen más carotenoides en la oscuridad. En *F. fujikuroi*, además, da lugar a una menor respuesta a la luz, mientras que en *N. crassa* los niveles de AMPc aumentan durante la fotoinducción de la carotenogénesis y la fotorrespuesta se reduce en presencia de AMPc exógeno (Harding, 1973). También se han observado conexiones regulatorias en otros genes asociados a la señalización por AMPc. La sobreexpresión del gen *gna-1* de *N. crassa*, que codifica la proteína G $\alpha$  de un complejo G heterotrimérico, da lugar a hifas aéreas más largas y a una reducción en el desarrollo de conidios y en la producción de carotenoides (Yang y Borkovich, 1999). Por otra parte, la mutación del gen *dcc-1*, que codifica una quinasa de histidina, produce un aumento tanto de la conidiación como de la producción de carotenoides, y este efecto es revertido por adición de AMPc exógeno (Barba-Ostria, Lledias y Georgellis, 2011).

## Regulación por condiciones ambientales

Las condiciones de cultivo pueden afectar a la producción de carotenoides de forma distinta en diferentes hongos. Un ejemplo significativo se encuentra en el efecto de la temperatura. La síntesis de neurosporaxantina en respuesta a la luz se reduce en *F. aquaeductuum* cuando disminuye la temperatura (Rau, 1962), sin embargo, en *N. crassa* se observa el efecto contrario: la fotoinducción es tanto más eficiente cuanto más baja es la temperatura a la que se ilumina el cultivo, alcanzado la respuesta óptima entre 6 y 12 °C

(Harding, 1974). Este efecto requiere síntesis de proteínas *de novo*, ya que no tiene lugar en presencia de cicloheximida. Es interesante resaltar que la iluminación de *N. crassa* a baja temperatura no sólo produce la síntesis de mayores cantidades de carotenoides, sino que la proporción de neurosporaxantina en la mezcla de carotenoides es mayor. Esta circunstancia ha facilitado el estudio de mutantes en pasos tardíos de la ruta, como los afectados en los genes *cao-2* (Saelices *et al.*, 2007) e *ylo-1* (Estrada *et al.*, 2008b), que acumulan así el carotenoide intermediario de forma más limpia. Además, en *N. crassa* se ha observado que la temperatura determina el orden en el que se producen las reacciones (Estrada *et al.*, 2008a): a baja temperatura la ciclación por AL-2 se produce en último lugar y CAO-2 lleva a cabo la rotura oxidativa sobre el 3,4-didehidrolicopeno en lugar de sobre el toruleno. De esta forma, los precursores inmediatos de la neurosporaxantina son el apo-4'-licopenal y el ácido apo-4'-licopenoico (figura 2). Por el contrario, a alta temperatura el 3,4-didehidrolicopeno es reconocido preferentemente por el dominio ciclasa de AL-2 para producir toruleno.

En *F. fujikuroi*, la síntesis de neurosporaxantina es estimulada por la escasez de nitrógeno, una señal nutricional que controla la síntesis de otros metabolitos, como las giberelinas o la bikaverina. Este efecto a nivel de carotenogénesis se descubrió inicialmente en cultivos con micelio inmovilizado, en los que se observó que la mayor producción de carotenoides en escasez de nitrógeno decae si se añade este nutriente (Garbayo *et al.*, 2003). Resultados similares se encontraron en experimentos de intercambio del micelio inmovilizado entre condiciones de presencia o ausencia de nitrógeno. En otros experimentos se observó que la síntesis de carotenoides, tanto de la estirpe silvestre como de mutantes superproductores, es mayor en medio con una baja relación N/C, y que la inducción

por escasez de nitrógeno es independiente y aditiva con la inducción por la luz (Rodríguez-Ortiz, Limón y Ávalos, 2009). Además, la transferencia del micelio de un medio con nitrógeno a una solución de glucosa produce un aumento rápido aunque transitorio de los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB*. La carotenogénesis también es reprimida por nitrógeno en *N. crassa*, como indican los mayores niveles de ARNm de los genes *al-1* y *al-2* en condiciones de escasez de este nutriente (Sokolovsky *et al.*, 1992). Este efecto se observa también en los mutantes del complejo WC, indicando que también en *N. crassa* la inducción por escasez de nitrógeno es independiente de la inducción por luz.

## FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS CAROTENOIDES EN LOS HONGOS

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides desempeñan papeles importantes en la fotosíntesis, como por ejemplo en la captación de luz y en la fotoprotección de la maquinaria fotosintética, entre otros procesos (Domonkos *et al.*, 2013). Además, en las plantas superiores, los carotenoides proporcionan colores llamativos a muchas flores y frutos, ayudando a su ciclo de vida mediante la atracción de insectos para la polinización y la dispersión de las semillas. En los animales, los carotenoides ingeridos en la dieta sirven de fuente de retinoides, con importantes papeles en la visión (vitamina A) y en el desarrollo (ácido retinoico) (Blomhoff y Blomhoff, 2006), además de proporcionar pigmentación en algunos casos. En lo que respecta a los hongos, los carotenoides no desempeñan funciones vitales. Así lo indica tanto la ausencia de estos pigmentos en algunas especies como la viabilidad de los mutantes albinos, como los descritos en *F. fujikuroi* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987),

*P. blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987) o *X. dendrorhous* (Johnson, 2003). Sin embargo, la frecuencia de la síntesis de carotenoides en los hongos sugiere funciones biológicas relevantes. Se resumen a continuación las funciones mejor conocidas.

## El $\beta$ -caroteno como precursor de las hormonas sexuales en los mucorales

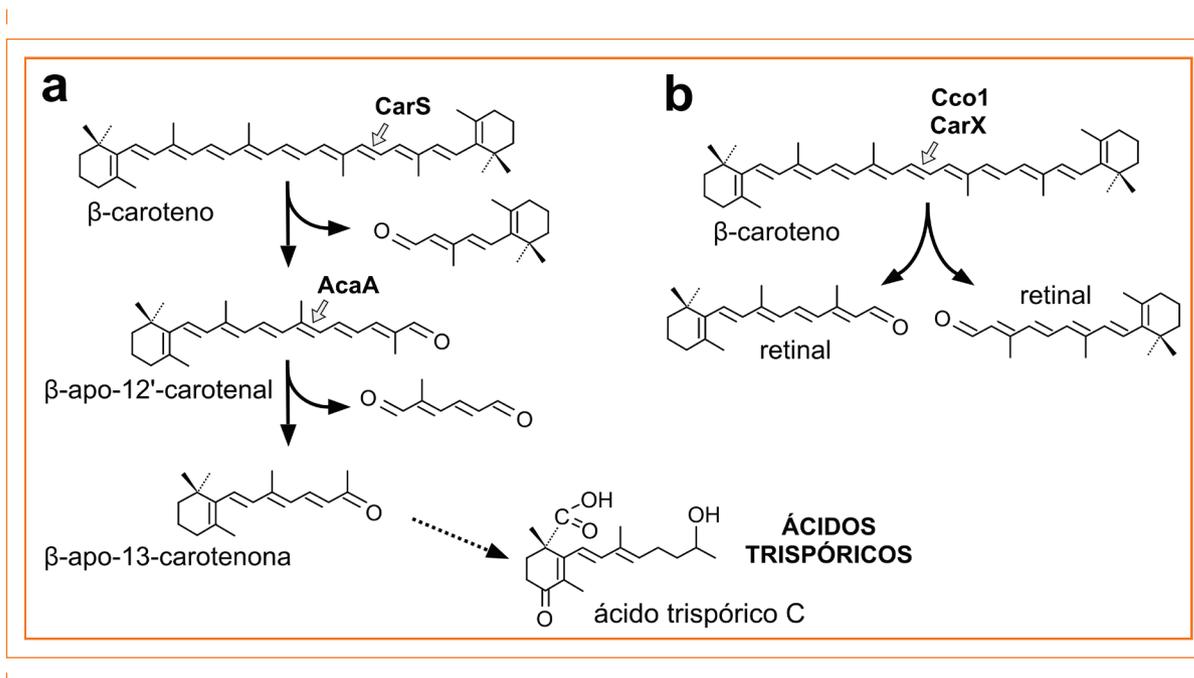
Los ácidos trispóricos, hormonas sexuales de los mucorales mencionadas antes, se sintetizan a partir de  $\beta$ -caroteno, y ésta es posiblemente la principal función de este caroteno en dicho grupo taxonómico. Estos compuestos pertenecen a una familia químicamente compleja (Austin, Bu'Lock y Winstanley, 1969; Austin, Bu'Lock y Drake, 1970), denominada trisporoides. En función de diferentes modificaciones químicas, los ácidos trispóricos se clasifican en varios tipos, denominados por las letras A, B, C, D y E (Caglioti *et al.*, 1966; Austin, Bu'Lock y Winstanley, 1969; Sutter *et al.*, 1989). La síntesis de estas hormonas se ha estudiado en detalle en *B. trispora*, en cuyos cultivos se encuentran diferentes derivados del metabolismo del  $\beta$ -caroteno, incluyendo trisporoides de 18 carbonos, ciclofarnesoides de 15 carbonos y metilhexanoides de siete carbonos (Barrero *et al.*, 2011). Compuestos parecidos se han identificado en los cultivos de *P. blakesleeanus* (Polaino *et al.*, 2012).

La ruta biosintética de los ácidos trispóricos comienza con la rotura oxidativa del  $\beta$ -caroteno, un tipo de reacción llevada a cabo por enzimas de la familia de las oxigenasas de carotenoides. La enzima a cargo de esta reacción se identificó por primera vez en *Rhizopus oryzae* y *B. trispora*, y se denominó Tsp3 (Burmester *et al.*, 2007). El gen *tsp3* se activa en los cultivos mixtos en ambas especies y en el caso

de *B. trispora*, mediante su expresión heteróloga en una estirpe de *E. coli* productora de  $\beta$ -caroteno, se demostró la capacidad de la enzima Tsp3 para cortar dicha molécula. Posteriormente, el análisis químico de los apocarotenoides presentes en cultivos mixtos de *P. blakesleeanus*, muy especialmente el hallazgo de derivados de siete átomos de carbono, llevó a postular la existencia de dos reacciones de corte consecutivas sobre los dobles enlaces 11',12' y 12,13 de la molécula (Polaino *et al.*, 2010) (figura 4). El gen *tsp3* de *P. blakesleeanus* resultó ser *carS*, ya mencionado, y el fenotipo superproductor de  $\beta$ -caroteno de los mutantes de este gen se debe por lo tanto a la ausencia de su rotura enzimática (Tagua *et al.*, 2012). La identidad del gen se confirmó tanto por el hallazgo de mutaciones en varios mutantes *carS* independientes como por la capacidad de producir  $\beta$ -apo-12'-carotenal cuando se expresa en *E. coli*

modificada para producir  $\beta$ -caroteno (Medina, Cerdá-Olmedo y Al-Babili, 2011). Posteriormente se confirmó la misma reacción enzimática para Tsp3 en *B. trispora* (Sahadevan *et al.*, 2013). En *P. blakesleeanus*, el  $\beta$ -apo-12'-carotenal es objeto de una nueva reacción de corte, llevada a cabo por una segunda oxigenasa de carotenoides, AcaA, para producir un apocarotenoide de 18 átomos de carbono, la  $\beta$ -apo-13-carotenona (Medina, Cerdá-Olmedo y Al-Babili, 2011), que es objeto de nuevas reacciones químicas para dar lugar a los ácidos trispóricos. El otro apocarotenoide resultante de esta serie de reacciones posee 15 átomos de carbono, y es el precursor de los ciclofarnesoides, una familia de compuestos químicos cuya función es desconocida. Reacciones similares muy probablemente se producen en otros mucorales, como *B. trispora*.

**FIGURA 4.** Metabolismo del  $\beta$ -caroteno como intermediario en la síntesis de otros compuestos: a) primeros pasos del corte oxidativo del  $\beta$ -caroteno para la síntesis de los ácidos trispóricos. Se muestra el ácido trispórico B como ejemplo representativo de esta familia. Se indican con flechas grises los sitios de corte reconocidos por las oxigenasas CarS y AcaA en *P. blakesleeanus*; b) producción de retinal tras el corte simétrico del  $\beta$ -caroteno realizado por las enzimas CarX de *F. fujikuroi* y Cco1 de *U. maydis*.



Los genes y enzimas responsables de los pasos posteriores en la ruta de los ácidos trispóricos son actualmente objeto de investigación. Entre las enzimas figura la deshidrogenasa de 4-dihidrometiltrisporato, Tsp1, purificada de cultivos de *Mucor mucedo* estimulados por ácidos trispóricos (Czempinski *et al.*, 1996). El análisis del gen *tsp1* mostró que la estimulación sexual se produce a nivel de actividad enzimática y no de transcripción (Schimek *et al.*, 2005). Experimentos similares permitieron identificar también *tsp2*, el gen de la deshidrogenasa de 4-dihidrotrisporina, en este caso regulado tanto a nivel de transcripción como de actividad enzimática (Wetzel *et al.*, 2009). Genes similares se encuentran en *P. blakesleeanus* (Polaino, 2009) y en otros mucorales (Schimek y Wöstemeyer, 2009).

## El $\beta$ -caroteno como precursor de retinal

El retinal es un apocarotenoide de 20 átomos de carbono, procedente normalmente de la rotura simétrica del  $\beta$ -caroteno (figura 4b) (Von Lintig, 2012). Además del precursor de otros apocarotenoides, el retinal es el cromóforo de las opsinas, una extensa familia de fotorreceptores de membrana con diferentes funciones en los principales grupos taxonómicos, tanto en bacterias y arqueas como en eucariotas (Ernst *et al.*, 2014). En los animales, las opsinas desempeñan un papel fundamental en la visión, ya que son responsables de la detección de luz en la retina. Muchos hongos poseen también proteínas de la familia de las opsinas, supuestamente dependientes de retinal para ejercer su función (Brown, 2004). Entre ellas han recibido especial atención NOP-1 en *N. crassa* (Bieszke *et al.*, 1999; 1999a), OPS en *Leptosphaeria maculans* (Waschuk *et al.*, 2005) y CarO (Prado *et al.*, 2004) y OpsA (Estrada y Ávalos, 2009) en *F. fujikuroi*. La presencia de opsinas sugiere la existencia en estos hongos de una oxigenasa de carotenoides capaz de

formar retinal. Aunque la neurosporaxantina es el carotenoide acumulado mayoritariamente en *F. fujikuroi* y *N. crassa*, en estos hongos se han detectado pequeñas cantidades de  $\gamma$ -caroteno (Mitzka y Rau, 1977; Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987), lo que implica que sus ciclasas pueden introducir un segundo anillo en la molécula de  $\gamma$  caroteno. En el caso de *N. crassa*, estudios *in vitro* mostraron que la desaturasa AL-1 no reconoce el  $\gamma$ -caroteno como sustrato para producir toruleno (Hausmann y Sandmann, 2000), lo que indica que la neurosporaxantina se sintetiza a través del 3,4-didehidrolicopeno y que el destino del  $\gamma$ -caroteno es su acumulación o su conversión a  $\beta$ -caroteno. A diferencia de *N. crassa* y *F. fujikuroi*, no hay información sobre síntesis de carotenoides en *L. maculans*, aunque la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *L. michotii* (Jerebzoff-Quintin y Jerebzoff, 1980) sugiere una actividad biosintética similar en el primero.

La primera oxigenasa de carotenoides identificada en hongos capaz de producir retinal fue CarX en *F. fujikuroi* (Thewes *et al.*, 2005; Prado-Cabrero *et al.*, 2007a). En este hongo, la función de la carotenogénesis para producir retinal se pone en evidencia por la organización genética del gen *carX* formando un agrupamiento génico (*cluster*) con los dos genes necesarios para producir  $\beta$ -caroteno, *carRA* y *carB*, y con el gen de la opsina CarO. Los cuatro genes del *cluster* están sujetos a un mismo mecanismo de regulación por luz, bajo control del producto del gen *carS*. El basidiomiceto *U. maydis* posee tres genes para opsinas, y una enzima capaz también de producir retinal a partir de  $\beta$ -caroteno (Estrada *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha identificado aún la enzima responsable de la síntesis de retinal en *N. crassa*.

El papel del  $\beta$ -caroteno como precursor de retinal traslada su función biológica al papel que desempeñan las opsinas en los hongos. Sin embargo, los intentos por averiguar el papel

biológico de opsinas fúngicas mediante experimentos de mutagénesis dirigida no han dado resultados (Bieszke *et al.*, 1999a; Prado *et al.*, 2004; Estrada y Ávalos, 2009), ya que los mutantes muestran fenotipo silvestre en las condiciones de cultivo en laboratorio.

## Los carotenoides como antioxidantes

Una característica especialmente conocida de los carotenoides es su potencial como agentes protectores frente al estrés oxidativo (Edge, McGarvey y Truscott, 1997; Young y Lowe, 2001). Como todos los seres vivos, los hongos poseen enzimas destinadas a contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por el metabolismo normal de la célula. Entre ellas han recibido especial atención las catalasas y las dismutasas de superóxido (SOD) (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002; Hansberg, Salas-Lizana y Domínguez, 2012). Sin embargo, numerosas pruebas indirectas apoyan un papel auxiliar de los carotenoides como protectores del estrés oxidativo en hongos de diferentes grupos taxonómicos. En muchos casos se ha observado una correlación positiva entre los niveles de estrés oxidativo y la acumulación de carotenoides. Como ejemplos representativos, la presencia de peróxido de hidrógeno en los cultivos incrementa la producción de  $\beta$ -caroteno en *B. trispora* (Jeong *et al.*, 1999), astaxantina en *X. dendrorhous* (Liu y Wu, 2006) 2 y neurosporaxantina en *N. crassa* (ligusa, Yoshida y Hasunuma, 2005) y en *F. aquaeductuum* (Bindl, Lang y Rau, 1970). Un efecto parecido se observa en las estirpes afectadas en su capacidad de actuar contra las ROS, como los mutantes carentes de la enzima SOD-1 (Yoshida y Hasunuma, 2004) o de la catalasa CAT-3 (Michán, Lledías y Hansberg, 2003) en *N. crassa*. En *B. trispora* varios indicios asocian el estrés oxidativo al contenido en  $\beta$ -caroteno: el aumento de oxígeno en el cultivo (Nanou y

Roukas, 2011) o la adición de hydroxitolueno butilado (Nanou y Roukas, 2010) aumentan los niveles tanto de catalasa y SOD como de  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, dichas actividades enzimáticas son menores en los cultivos mixtos que en los cultivos individuales, mientras que la adición de inhibidores de actividad SOD produce un aumento en el contenido en  $\beta$ -caroteno (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002). Un resultado especialmente concluyente es el aumento en la resistencia al peróxido de hidrógeno manifestado por estirpes de *S. cerevisiae* a las que se han introducido artificialmente genes para la producción de carotenoides (Ukibe *et al.*, 2009).

La inducción de la síntesis de carotenoides por la luz puede estar asociada a un aumento de la oxidación. En *N. crassa*, la luz produce un efecto negativo sobre la respiración, tanto en micelio como en preparaciones de mitocondrias, y este efecto es más acusado en los mutantes albinos que en los controles silvestres (Ramadan-Talib y Prebble, 1978). En consonancia con su efecto perjudicial, la luz aumenta los niveles de catalasas y de SOD (Gessler, Sokolov y Belozerskaya, 2002), y además los efectos del estrés oxidativo sobre la síntesis de carotenoides son sólo patentes en estas condiciones (Yoshida y Hasunuma, 2004; ligusa, Yoshida y Hasunuma, 2005). Los efectos pueden ser especialmente acusados en el caso de la radiación UV. Como ya se ha indicado, los conidios de *N. crassa* acumulan carotenoides con independencia de la iluminación. Es muy significativo que los conidios albinos sean más sensibles que los pigmentados a la exposición a luz blanca en presencia de agentes fotosensibilizadores, como el azul de metileno, o la radiación UV-A en ausencia de estos compuestos. En consonancia con este resultado, se ha encontrado una correlación entre el contenido en carotenoides de diferentes estirpes silvestres de *Neurospora* y la latitud a la que se aislaron (Luque *et al.*, 2012). Las estirpes procedentes

de latitudes más altas producen menos carotenoides y sus conidios son más sensibles a la radiación UV. Resultados parecidos se han obtenido en otros hongos. Así, las células de *Wangiella dermatidis* que contienen carotenoides son más resistentes a la radiación UV que las no pigmentadas (Geis y Szanislo 1984), y las estirpes naturales de *Sporobolomyces*

*ruberrimus* y *Cystofilobasidium capitatum* son tanto más resistentes a la radiación UV-B cuanto mayor es su contenido en carotenoides (Moliné *et al.*, 2009). Considerados en su conjunto, estos y otros datos publicados respaldan un efecto protector de la carotenoides frente a daños producidos por la luz visible y por la radiación UV.

### AGRADECIMIENTOS

El trabajo de los coautores ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (proyectos BIO2006-01323, y BIO2009-11131, BIO2012- 39716) y la Junta de Andalucía (proyectos P07-CVI-02813 y CTS-6638).

## REFERENCIAS

- Aasen, A.J. y Jensen, S.L. 1965. *Acta Chem. Scand.*, 19: 1843-1853.
- Ádám, A.L., García-Martínez, J., Szücs, E.P., Ávalos, J., Hornok, L. 2011. *FEMS Microbiol. Lett.*, 318: 76-83.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., *et al.* 2008. *BMC Microbiol.*, 8: 169.
- Almeida, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. 2008. *Curr. Genet.*, 53: 129-137.
- Álvarez, V., Rodríguez-Sáiz, M., De la Fuente, J.L., Gudina, E.J., Godio, R.P., Martín, J.F., *et al.* 2006. *Fungal Genet. Biol.*, 43: 261-272.
- Aragón, C.M., Murillo, F.J., De la Guardia, M.D., Cerdá-Olmedo, E. 1976. *Eur. J. Biochem.*, 63: 71-75.
- Arpaia, G., Carattoli, A., Macino, G. 1995. *Dev. Biol.*, 170: 626-635.
- Arpin, N., Lebreton, P., Fiasson, J.L. 1966. *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, 82: 450-459.
- Arpin, N. y Liaaen-Jensen, S. 1967. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49: 527-536.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E., Ávalos, J. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1687-1692.
- Arrach, N., Schmidhauser, T.J., Ávalos, J. 2002. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 914-921.
- Austin, D.G., Bu'Lock, J.D., Winstanley, D.J. 1969. *Biochem. J.*, 113: 34P.
- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D., Drake, D. 1970. *Experientia*, 26: 348-349.
- Ávalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. 1986. *Phytochemistry*, 25: 1837-1841.
- Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 1987. *Curr. Genet.*, 25: 1837-1841.
- Ávalos, J., Mackenzie, A., Nelki, D.S., Bramley, P.M. 1988. *Biochim. Biophys. Acta*, 966: 257-265.
- Ávalos, J., Schrott, E.L. 1990. *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 295-298.
- Ávalos, J., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1993. *Methods Enzymol.*, 214: 283-294.
- Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 2004. En D.K. Arora (ed.). *Handbook of Fungal Biotechnology*, pp. 367-378. Nueva York: Marcel Dekker.
- Ávalos, J. y Estrada, A.F. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 930-938.
- Ávalos, J. y Corrochano, L.M. 2013. En D.P. Kasbekar y K. McCluskey (eds.). *Neurospora: Genomics and Molecular Biology* pp. 227-241. Norfolk: Caister Academic Press.

## REFERENCIAS

- Baima, S., Macino, G., Morelli, G. 1991. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 11: 107-115.
- Baima, S., Carattoli, A., Macino, G., Morelli, G. 1992. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 15: 233-238.
- Barba-Ostria, C., Lledias, F., Georgellis, D. 2011. *Eukaryot. Cell*, 10: 1733-1739.
- Barbato, C., Calissano, M., Pickford, A., Romano, N., Sandmann, G., Macino, G. 1996. *Mol. Gen. Genet.*, 252: 353-361.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Gil, J., González, J.A., Alcalde, E., et al. 2011. *Org. Biomol. Chem.*, 9: 7190-7195.
- Bartley, G.E., Schmidhauser, T.J., Yanofsky, C., Scolnik, P.A. 1990. *J. Biol. Chem.*, 265: 16020-16024.
- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1988. *Arch. Microbiol.*, 150: 209-214.
- Bejarano, E.R., Ávalos, J., Lipson, E.D., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Planta*, 183: 1-9.
- Bhosale, P.B. y Gadre, R. V. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 423-427.
- Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., Orkovich, K.A. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8034-8039.
- Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A., Spudich, J.L. 1999a. *Biochemistry*, 38: 14138-14145.
- Bindl, E., Lang, W., Rau, W. 1970. *Planta*, 94: 156-174.
- Blakeslee, A.F. 1904. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 40: 205-319.
- Blasco, J.L., Roessink, D., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., Galland, P. 2001. *J. Plant Res.*, 114: 25-31.
- Blomhoff, R. y Blomhoff, H.K. 2006. *J. Neurobiol.*, 66: 606-630.
- Breitenbach, J., Fraser, P.D., Sandmann, G. 2012. *Phytochemistry*, 76: 40-45.
- Brown, L.S. 2004. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3: 555-565.
- Burmester, A., Richter, M., Schultze, K., Voelz, K., Schachtschabel, D., Boland, W., et al. 2007. *Fungal Genet. Biol.*, 44: 1096-1108.
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M., Mulinacci, N. 2007. *Can. J. Microbiol.*, 53: 1024-1031.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., et al. 1966. *Tetrahedron*, 22: 175-187.
- Candau, R., Ávalos, J., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3378-3382.

## REFERENCIAS

- Candau, R., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4936-4940.
- Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G., Macino, G. 1994.. *Mol. Microbiol.*, 13: 787-795.
- Castrillo, M., García-Martínez, J., Ávalos, J. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 2777-2788.
- Castrillo, M. y Ávalos, J. 2015. *PLoS One* 10: e0119785.
- Cerdá-Olmedo, E. 1985. *Methods Enzymol.*, 110: 220-243.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. 1986. *Angew. Bot.*, 60: 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. 1987. En E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson (eds.). *Phycomyces*, pp. 199-222. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, L., Singhal, R.S. 2008. *Bioresour. Technol.*, 99: 3166-3173.
- Corrochano, L.M. y Garre, V. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 893-899.
- Csérnetics, A., Nagy, G., Iturriaga, E.A., Szekeres, A., Eslava, A.P., Vágvölgyi, C., et al. 2011. *Fungal Genet. Biol.*, 48: 696-703.
- Czempinski, K., Kruft, V., Wöstemeyer, J., Burmester, A. 1996. *Microbiology*, 142: 2647-2654.
- Daub, M.E. y Payne, G.A. 1989. *Phytopathology*, 79: 180-185.
- Davoli, P., Mierau, V., Weber, R.W.S. 2004. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 40: 392-397.
- De Fabo, E.C., Harding, R.W., Shropshire Jr., W. 1976. *Plant Physiol.*, 57: 440-445.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 2012-2015.
- De Miguel, T., Calo, P., Díaz, A., Villa, T.G. 1997. *Microbiologia*, 13: 67-70.
- Degli-Innocenti, F. y Russo, V.E. 1984. *J. Bacteriol.*, 159: 757-761.
- Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Trautmann, D., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2011. *FEBS J.*, 278: 3164-3176.
- Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Trautmann, D., Limón, M.C., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2011a. *PLoS One*, 6: e21948.
- Domínguez-Bocanegra, A.R., Ponce-Noyola, T., Torres-Muñoz, J.A. 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 783-791.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., Ughy, B. 2013. *Prog. Lipid Res.*, 52: 539-561.

## REFERENCIAS

- Dong, W., Tang, X., Yu, Y., Nilsen, R., Kim, R., Griffith, J., et al. 2008. *PLoS One*, 3: e3105.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 41: 189-200.
- Ehrenshaft, M. y Daub, M.E. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2766-2771.
- El-Jack, M., Mackenzie, A., Bramley, P.M. 1988. *Planta*, 174: 59-66.
- Ernst, O.P., Lodowski, D.T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L.S., Kandori, H. 2014. *Chem. Rev.*, 114: 126-163.
- Eslava, A.P., Álvarez, M.I., Cerdá-Olmedo, E. 1974. *Eur. J. Biochem.*, 48: 617-623.
- Estrada, A.F. y Ávalos, J. 2008. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 705-718.
- Estrada, A.F., Maier, D., Scherzinger, D., Ávalos, J., Al-Babili, S. 2008a. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 1497-1505.
- Estrada, A.F., Youssar, L., Scherzinger, D., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2008b. *Mol. Microbiol.*, 69: 1207-1220.
- Estrada, A.F. y Ávalos, J. 2009. *J. Mol. Biol.*, 387: 59-73.
- Estrada, A.F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., et al. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 46: 803-813.
- Flores, R., Cerdá-Olmedo, E., Corrochano, L.M. 1998. *Phycomyces. Photochem. Photobiol.*, 67: 467-472.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 1994. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212: 59-66.
- Fraser, P.D., Ruiz-Hidalgo, M.J., López-Matas, M.A., Álvarez, M.I., Eslava, A.P. Bramley, P.M. 1996. *Biochim. Biophys. Acta*, 1289: 203-208.
- Fraser, P.D., Miura, Y., Misawa, N. 1997. *J. Biol. Chem.*, 272: 6128-6135.
- Frengova, G.I. y Beshkova, D.M. 2009. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 163-180.
- Garbayo, I., Vilchez, C., Nava-Saucedo, J.E., Barbotin, J.N. 2003. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 629-634.
- García-Martínez, J., Ádám, A.L., Ávalos, J. 2012. *PLoS One*, 7: e28849.
- Geis, P.A. y Szaniszló, P.J. 1984. *Mycologia*, 76: 268-273.
- Georgiou, C.D., Tairis, N., Polycratis, A. 2001. *Mycol. Res.*, 105: 1110-1115.
- Georgiou, C.D., Zervoudakis, G., Tairis, N., Kornaros, M. 2001a. *Fungal Genet. Biol.*, 34: 11-20.
- Gessler, N.N., Sokolov, A. V, Y., B. V, Belozerskaya, T.A. 2002. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38: 205-209.
- Goldie, A.H. y Subden, R.E. 1973. *Biochem. Genet.*, 10: 275-284.

## REFERENCIAS

- Goodwin, T.W. 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids*, Londres: Chapman & Hall.
- Govind, N.S., Cerdá-Olmedo, E. 1986. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2775-2780.
- Han, J.R., Zhao, W.J., Gao, Y.Y., Yuan, J.M. 2005. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 412-417.
- Han, M., He, Q., Hang, W.G. 2012. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 42: 293-303.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. 2012. *Arch. Biochem. Biophys.*, 525: 170-180.
- Harding, R.W., Huang, P.C., Mitchell, H.K. 1969. *Arch. Biochem. Biophys.*, 129: 696-707.
- Harding, R.W. 1973. *Neurospora Newsl.*, 20: 20-21.
- Harding, R.W. 1974. *Plant Physiol.*, 54: 142-147.
- Harding, R.W. y Turner, R. V. 1981. *Plant Physiol.*, 68: 745-749.
- Harding, R.W., Philip, D.Q., Drozdowicz, B.Z., Williams, N.P. 1984. *Neurospora Newsl.*, 31: 23-25.
- Hausmann, A. y Sandmann, G. 2000. *Fungal Genet. Biol.*, 30: 147-153.
- Haxo, F. 1950. *Bot. Gaz.*, 112: 228-232.
- He, Q. y Liu, Y. 2005. *Genes Dev.*, 19: 2888-2899.
- Herz, S., Weber, R.W., Anke, H., Mucci, A., Davoli, P. 2007. *Phytochemistry*, 68: 2503-2511.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M. 2006. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46: 185-196.
- Hu, X., Sun, J., uan, Q. 2012. *Biotechnol. Lett.*, 34: 2107-2111.
- Huang, P.C. 1964. *Genetics*, 49: 453-469.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L.M., Sanz, C., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., *et al.* 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4546-4551.
- Iigusa, H., Yoshida, Y., Hasunuma, K. 2005. *FEBS Lett.*, 579: 4012-4016.
- Iurkov, A.M., Vustin, M.M., Tiaglov, B. V, Maksimova, I.A., Sineokii, S.P. 2008. *Mikrobiologija*, 77: 5-10.
- Jayaram, M., Leutwiler, L., Delbrück, M. 1980. *Photochem. Photobiol.*, 32: 241-245.
- Jeong, J.C., Lee, I.Y., Kim, S.W., Park, Y.H. 1999. *Biotechnol. Lett.*, 21: 683-686.
- Jerebzooff-Quintin, S. y Jerebzooff, S. 1980. *Protoplasma*, 104: 43-54.
- Jin, J.M., Lee, J., Lee, Y.W. 2010. *FEMS Microbiol. Lett.*, 302: 197-202.

## REFERENCIAS

- Johnson, E.A. 2003. *Int. Microbiol.*, 6: 169-174.
- Kritsky, M.S., Sokolovsky, V.Y., Belozerskaya, T.A., Chernysheva, E.K. 1982. *Arch. Microbiol.*, 133: 206-208.
- Li, C. y Schmidhauser, T.J. 1995. *Dev. Biol.*, 169: 90-95.
- Li, C., Sachs, M.S., Schmidhauser, T.J. 1997. *Fungal Genet. Biol.*, 21: 101-108.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L., Krause, R.F. 1960. *Bull. West Virginia Agric. Exp. Stn.*, 441T: 1-80.
- Linden, H., Rodríguez-Franco, M., Macino, G. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 254: 111-118.
- Linnemannstöns, P., Prado, M.M., Fernández-Martín, R., Tudzynski, B., Ávalos, J. 2002. *Mol. Genet. Genomics*, 267: 593-602.
- Liu, Y.S. y Wu, J.Y. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 663-668.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. 1980. *Planta*, 150: 134-139.
- Lorca-Pascual, J.M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M. 2004. *Mol. Microbiol.*, 52: 1463-1474.
- Luque, E.M., Gutiérrez, G., Navarro-Sampedro, L., Olmedo, M., Rodríguez-Romero, J., Ruger-Herreros, C., et al. 2012. *PLoS One*, 7: e33658.
- Madhour, A., Anke, H., Mucci, A., Davoli, P., Weber, R.W.S. 2005. *Phytochemistry*, 66: 2617-2626.
- Medina, H.R., Cerdá-Olmedo, E., Al-Babili, S. 2011. *Mol. Microbiol.*, 82: 199-208.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. 1995. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 836-838.
- Mehta, B.J., Salgado, L.M., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3657-3661.
- Mehta, B.J., Obratsova, I.N., Cerdá-Olmedo, E. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4043-4048.
- Mende, K., Homann, V., Tudzynski, B. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 255: 96-105.
- Meyer, P.S. y Du Preez, J.C. 1994. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17: 24-31.
- Michán, S., Lledías, F., Hansberg, W. 2003. *Eukaryot. Cell*, 2: 798-808.
- Mitzka, U. y Rau, W. 1977. *Arch. Microbiol.*, 111: 261-263.
- Moliné, M., Libkind, D., Diéguez, M.C., Van Broock, M. 2009. *J. Photochem. Photobiol. B*, 95: 156-161.
- Moliné, M., Libkind, D., Van Broock, M. 2012. *Methods Mol. Biol.*, 898: 275-283.

## REFERENCIAS

- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J.M., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M. 2007. *J. Biol. Chem.*, 282: 15394-15403.
- Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. 1976. *Mol. Gen. Genet.*, 148: 19-24.
- Murillo, F.J., Calderón, I.L., López-Díaz, I., Cerdá-Olmedo, E. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 639-642.
- Nanou, K. y Roukas, T. 2010. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 2415-2423.
- Nanou, K. y Roukas, T. 2011. *Bioresour. Technol.*, 102: 8159-8164.
- Navarro, E., Sandmann, G., Torres-Martínez, S. 1995. *Exp. Mycol.*, 19: 186-190.
- Navarro, E., Ruiz-Pérez, V.L., Torres-Martínez, S. 2000. *Eur. J. Biochem.*, 267: 800-807.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J.M., Quiles-Rosillo, M.D., Nicolás, F.E., Garre, V., Torres-Martínez, S., et al. 2001. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 463-470.
- Nelson, M.A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N., Macino, G. 1989. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1271-1276.
- Ninet, L., Renaut, J., Tissier, R. 1969. *Biotechnol. Bioeng.*, 11: 1195-1210.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., et al. 2006. *Mol. Genet. Genomics*, 275: 148-158.
- Ootaki, T., Crafts-Lighty, A., Delbrück, M., Hsu, W.J. 1973. *Mol. Gen. Genet.*, 121: 57-70.
- Paietta, J., Sargent, M.L. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 5573-5577.
- Paietta, J., Sargent, M.L. 1983. *Plant Physiol.*, 72: 764-766.
- Papp, T., Velayos, A., Bartok, T., Eslava, A.P., Vagvolgyi, C., Iturriaga, E.A. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 526-531.
- Papp, T., Csernetics, A., Nagy, G., Bencsik, O., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., et al. 2013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 4937-4950.
- Polaino, S. 2009. Tesis doctoral Universidad de Sevilla.
- Polaino, S., Herrador, M.M., Cerdá-Olmedo, E., Barrero, A.F. 2010. *Org. Biomol. Chem.*, 8: 4229-4231.
- Polaino, S., González-Delgado, J.A., Arteaga, P., Herrador, M.M., Barrero, A.F., Cerdá-Olmedo, E. 2012. *Org. Biomol. Chem.*, 10: 3002-3009.
- Prado, M.M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R., Ávalos, J. 2004. *Curr. Genet.*, 46: 47-58.

## REFERENCIAS

- Prado-Cabrero, A., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2007. *Mol. Microbiol.*, 64: 448-460.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Ávalos, J., Al-Babili, S. 2007a. *Eukaryot. Cell*, 6: 650-657.
- Prado-Cabrero, A., Schaub, P., Díaz-Sánchez, V., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2009. *FEBS J.*, 276: 4582-4597.
- Quiles-Rosillo, M.D., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2003. *Fungal Genet. Biol.*, 38: 122-132.
- Quiles-Rosillo, M.D., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. Garre, V. 2005. *Fungal Genet. Biol.*, 42: 141-153.
- Ramadan-Talib, Z., Prebble, J. 1978. *Biochem. J.*, 176: 767-775.
- Rau, W. 1962. *Planta*, 59: 123-137.
- Rau, W. 1967. *Planta*, 72: 14-28.
- Rau, W., Lindemann, I., Rau-Hund, A. 1968. *Planta*, 80: 309-316.
- Revuelta, J.L. y Eslava, A.P. 1983. *Mol. Gen. Genet.*, 192: 225-229.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M.C., Ávalos, J. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 405-413.
- Rodríguez-Ortiz, R., Michielse, C., Rep, M., Limón, M.C., Ávalos, J. 2012. *Fungal Genet. Biol.*, 49: 684-696.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M.C., Ávalos, J. 2013. *Mol. Genet. Genomics*, 288: 157-173.
- Rodríguez-Saiz, M., Paz, B., De La Fuente, J.L., López-Nieto, M.J., Cabri, W., Barredo, J.L. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5589-5594.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. 1993. *Biochem. J.*, 15: 517-524.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann, G., Eslava, A.P. 1997. *Mol. Gen. Genet.*, 253: 734-744.
- Ruiz-Roldán, M.C., Garre, V., Guarro, J., Mariné, M., Roncero, M.I. 2008. *Eukaryot. Cell*, 7: 1227-1230.
- Saelices, L., Youssar, L., Holdermann, I., Al-Babili, S., Ávalos, J. 2007. *Mol. Genet. Genomics*, 278: 527-537.
- Sahadevan, Y., Richter-Fecken, M., Kaerger, K., Voigt, K., Boland, W. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 7466-7475.
- Sakaki, H., Kaneno, H., Sumiya, Y., Tsushima, M., Miki, W., Kishimoto, N., et al. 2002. *J. Nat. Prod.*, 65: 1683-1684.
- Salgado, L.M., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1989. *Exp. Mycol.*, 13: 332-336.
- Salgado, L.M., Ávalos, J., Bejarano, E.R., Cerdá-Olmedo, E. 1991. *Phytochemistry*, 30: 2587-2591.

## REFERENCIAS

- Sandmann, G., Misawa, N., Wiedemann, M., Vittorioso, P., Carattoli, A., Morelli, G., *et al.* 1993. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 18: 245-251.
- Sandmann, G., Zhu, C., Krubasik, P., Fraser, P.D. 2006. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 1085-1092.
- Sandmann, G., Takaichi, S., Fraser, P.D. 2008. *Phytochemistry*, 69: 2886-2890.
- Sanz, C., Álvarez, M.I., Orejas, M., Velayos, A., Eslava, A.P., Benito, E.P. 2002. *Eur. J. Biochem.*, 269: 902-908.
- Sanz, C., Rodríguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J.M., Heitman, J., Corrochano, L.M., *et al.* 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 7095-7100.
- Sanz, C., Benito, E.P., Orejas, M., Álvarez, M.I., Eslava, A.P. 2010. *Fungal Genet. Biol.*, 47: 773-781.
- Sanz, C., Velayos, A., Álvarez, M.I., Benito, E.P., Eslava, A.P. 2011. *PLoS One*, 6: e23102.
- Schimek, C., Petzold, A., Schultze, K., Wetzels, J., Wolschendorf, F., Burmester, A., *et al.* 2005. *Fungal Genet. Biol.*, 42: 804-812.
- Schimek, C. y Wöstemeyer, J. 2009. *Phytochemistry*, 70: 1867-1875.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E., Yanofsky, C. 1990. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5064-5070.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E., Yanofsky, C. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269: 12060-12066.
- Schmidt, A.D., Heinekamp, T., Matuschek, M., Liebmann, B., Bollschweiler, C., Brakhage, A.A. 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67: 549-555.
- Schrott, E.L. 1980. *Planta*, 150: 174-179.
- Schrott, E.L. 1981. *Planta*, 151: 371-374.
- Schwerdtfeger, C. y Linden, H. 2003. *EMBO J.*, 22: 4846-4855.
- Shrode, L.B., Lewis, Z.A., White, L.D., Bell-Pedersen, D., Ebbole, D.J. 2001. *Fungal Genet. Biol.*, 32: 169-181.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2006. *Mol. Microbiol.*, 61: 1023-1037.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2008. *Mol. Microbiol.*, 70: 1026-1036.
- Sokolovsky, V.Y., Lauter, F.R., Müller-Röber, B., Ricci, M., Schmidhauser, T.J., Russo, V.E.A. 1992. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2045-2049.
- Spurgeon, S.L., Turner, R. V., Harding, R.W. 1979. *Arch. Biochem. Biophys.*, 195: 23-29.
- Strobel, I., Breitenbach, J., Scheckhuber, C.Q., Osiewacz, H.D., Sandmann, G. 2009. *Curr. Genet.*, 55: 175-184.

## REFERENCIAS

- Sutter, R.P. 1970. *Gen. Microbiol.*, 64: 215-221.
- Sutter, R.P., Harrison, T.L., Galasko, G. 1974. *J. Biol. Chem.*, 249: 2282-2284.
- Sutter, R.P. 1987. En E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson (eds.). *Phycomyces*, pp. 317-336. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sutter, R.P., Dadok, J., Bothner-By, A.A., Smith, R.R., Mishra, P.K. 1989. *Biochemistry*, 28: 4060-4066.
- Tagua, V.G., Medina, H.R., Martín-Domínguez, R., Eslava, A.P., Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E., *et al.* 2012. *Fungal Genet. Biol.*, 49: 398-404.
- Thewes, S., Prado-Cabrero, A., Prado, M.M., Tudzynski, B., Ávalos, J. 2005. *Mol. Genet. Genomics*, 274: 217-228.
- Torres-Martínez, S., Murillo, F.J., Cerdá-Olmedo, E. 1980. *Genet. Res.*, 36: 299-309.
- Tudzynski, B. 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66: 597-611.
- Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7205-7211.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. 1969. *Microbios*, 1A: 3-8.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. 1977. *Phytochemistry*, 16: 613-614.
- Valadon, L.R.G., Osman, M., Mummery, R.S., Jerebzooff-Quintin, S., Jerebzooff, S. 1982. *Physiol. Plant.*, 56: 199-203.
- Van Eijk, G.W., Mummery, R.S., Roeymans, H.J., Valadon, L.R. 1979. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45: 417-422.
- Velayos, A., López-Matas, M.A., Ruiz-Hidalgo, M.J., Eslava, A.P. 1997. *Fungal Genet. Biol.*, 22: 19-27.
- Velayos, A., Blasco, J.L., Álvarez, M.I., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P. 2000. *Planta*, 210: 938-946.
- Velayos, A., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A. 2000a. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5509-5519.
- Velayos, A., Papp, T., Aguilar-Elena, R., Fuentes-Vicente, M., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A., *et al.* 2003. *Curr. Genet.*, 43: 112-120.
- Verdoes, J.C., Krubasik, P., Sandmann, G., Van Ooyen, A.J.J. 1999. *Mol. Gen. Genet.*, 262: 453-461.
- Verdoes, J.C., Misawa, N., Van Ooyen, A.J.J. 1999a. *Biotechnol. Bioeng.*, 63: 750-755.
- Vittorioso, P., Carattoli, A., Londei, P., Macino, G. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269: 26650-26654.
- Von Lintig, J. 2012. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96: 1234S-1244S.
- Wang, G.Y. y Keasling, J.D. 2002. *Metab. Eng.*, 4: 193-201.
- Waschuk, S.A., Bezerra Jr., A.G., Shi, L., Brown, L.S. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 6879-6883.

## REFERENCIAS

- Wetzell, J., Scheibner, O., Burmester, A., Schimek, C., Wöstemeyer, J. 2009. *Eukaryot. Cell*, 8: 88-95.
- Will, O.H., Garber, E.D., Kezdy, F.J. 1984. *Curr. Microbiol.*, 10(2): 57-63.
- Will, O.H. y Newland, N.A. 1985. *Bot. Gaz.*, 146: 204-207.
- Yang, Q. y Borkovich, K.A. 1999. *Genetics*, 151: 107-117.
- Yoshida, Y. y Hasunuma, K. 2004. *J. Biol. Chem.*, 279: 6986-6993.
- Young, A.J. y Lowe, G.M. 2001. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385: 20-27.
- Youssar, L. y Ávalos, J. 2007. *Curr. Genet.*, 51: 19-30.
- Youssar, L., Schmidhauser, T.J., Ávalos, J. 2005. *Mol. Microbiol.*, 55: 828-838.
- Zalokar, M. 1955. *Arch. Biochem. Biophys.*, 56: 318-325.
- Zalokar, M. 1957. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70: 568-571.

# INGENIERÍA GENÉTICA DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LOS CAROTENOIDES

Judit Berman, Uxue Zorrilla-Lopez, Gemma Farré, Teresa Capell,  
Paul Christou y Changfu Zhu



## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se producen predominante, pero no exclusivamente, en organismos fotosintéticos. En las plantas su presencia se observa por sus llamativos colores en las flores, frutos y órganos de almacenaje y abarcan un amplio espectro de tonalidades, que pueden ir desde el amarillo hasta el rojo.

En las plantas, los carotenoides desempeñan funciones esenciales durante la fotosíntesis. Así, entre otros procesos, participan en la captación de luz y protegen la maquinaria fotosintética de la fotooxidación (Demmig-Adams y Adams, 1996). También son precursores de moléculas señalizadoras que influyen en el desarrollo y en la respuesta al estrés abiótico y biótico; facilitan la fotomorfogénesis; la extinción no fotoquímica y la peroxidación lipídica; así como la atracción de los polinizadores (Park *et al.*, 2002; Pogson *et al.*, 1998; Franco, Matsubara y Orthen, 2007; McNulty *et al.*, 2007).

La importancia de los carotenoides en plantas y animales y sus amplias aplicaciones comerciales en el campo de la salud y la nutrición ha generado interés por la posibilidad de aumentar sus niveles en los cultivos alimenticios mediante la mejora clásica o la ingeniería genética (Sandmann, Römer y Fraser, 2006, Zhu *et al.*, 2007). Los investigadores han estudiado la ruta metabólica de los carotenoides en microorganismos y plantas y han aislado sus genes, enzimas y elementos reguladores en una amplia variedad de organismos. En muchos casos, los genes carotenogénicos se han introducido en organismos diferentes de los de su origen para estudiar su función o para aumentar la acumulación de carotenoides.

La regulación endógena de la ruta metabólica de los carotenoides es compleja y aún hay mucha información por descubrir, hecho que ha limitado hasta ahora el aumento del contenido de carotenoides en los cultivos a través de la ingeniería genética (Zhu *et al.*, 2007; Fraser, Enfissi y Bramley, 2009), aunque recientemente se han publicado estudios relacionados con progresos realizados en cereales, concretamente en maíz, donde se han superado ciertas limitaciones (Aluru *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Naqvi *et al.*, 2009).

En este capítulo ofrecemos una guía de los recursos disponibles y presentamos las estrategias más eficaces para la investigación de los carotenoides en plantas.

## ESTRATEGIAS PARA ALTERAR LA COMPOSICIÓN Y EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN PLANTAS

La ruta metabólica de los carotenoides es extremadamente compleja, caracterizada por múltiples ramificaciones, competiciones entre intermediarios, pasos limitantes y bucles de retroalimentación que limitan la síntesis de la molécula deseada. Se han realizado experimentos, con diferentes niveles de éxito, para superar estas barreras en plantas (Zhu *et al.*, 2007, 2013; Farré *et al.*, 2010, 2011, 2014; Bai *et al.*, 2011, 2014).

Una estrategia para aumentar los carotenoides en las plantas es a través del incremento del flujo de forma no selectiva aportando elevados niveles de precursores. Por ejemplo, si aumentamos la disponibilidad del isopentenilo difosfato (IPP) hará que aumente el flujo hacia la síntesis de terpenoides, incluyendo los carotenoides. Esto se consiguió al eliminar importantes pasos limitantes en la ruta plastidial metileritritol 4-fosfato (MEP). Por ejemplo, la expresión de la 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato (DXP) sintasa para aumentar DXP en *Arabidopsis* resultó en plantas transgénicas con elevado contenido en distintos terpenoides, con hasta 1.5 veces más de clorofilas, el doble de tocoferoles, cuatro veces más de ácido abscísico y aproximadamente 1.5 veces más del total de carotenoides (Estevez *et al.*, 2001). Resultados similares se obtuvieron en tomate (Enfissi *et al.*, 2005). Un inconveniente de esta estrategia es que la ruta del MEP alimenta diferentes rutas metabólicas, las cuales tienen como precursor común el IPP. Para concentrar el flujo sólo en la ruta metabólica de los carotenoides es necesario modificar un paso obligado de la ruta. En el caso de la síntesis de carotenoides el primer paso obligado de la ruta es la conversión de geranylgeranyl difosfato

(GGPP) en (15Z)-fitoeno a través de fitoeno sintasa (PSY), por lo tanto, esta enzima es una diana útil para la sobreexpresión. Esta estrategia se utilizó en el maíz blanco (M37W) ya que su endospermo carece de la actividad de la primera enzima de la ruta metabólica (PSY1), la introducción de este gen ayudó a superar el paso limitante y aumentó el contenido total de carotenoides hasta 52 veces comparado con el control, con una acumulación predominantemente de luteína y zeaxantina (Zhu *et al.*, 2008). Resultados similares se obtuvieron al expresar el gen *CRTB* (el gen bacteriano de función equivalente a PSY) en la semilla de colza, incrementando el contenido total de carotenoides 50 veces, predominando las formas  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno (Shewmaker *et al.*, 1999).

Otras estrategias se basan en controlar el flujo metabólico en favor de la producción de una molécula deseada o en bloquear los pasos siguientes de conversión del metabolito deseado para prevenir la pérdida de éste. En el tubérculo de patata o papa, los genes  $\beta$ -caroteno hidrolasa (*CHY1* y *CHY2*) se silenciaron con la tecnología del RNA antisentido, resultando en un aumento de 38 veces de los niveles de  $\beta$ -caroteno y 4.5 veces más de carotenoides totales (Diretto *et al.*, 2007). De manera similar, el silenciamiento del gen zeaxantina epoxidasa (*ZEP*) evitó la conversión de zeaxantina en violaxantina e incrementó los niveles de zeaxantina hasta 130 veces comparado con el control (Romer *et al. et al.*, 2002).

Igual que se desea aumentar el contenido total de carotenoides, también es interesante poder modificar el flujo, de forma que se canalice para la producción de carotenoides específicos, como los que tienen un elevado valor comercial o beneficios para la salud. Cuando se elimina un paso limitante, como por ejemplo en el caso de la expresión de PSY mencionada antes, la tendencia es que aparezcan nuevos

pasos limitantes en reacciones posteriores, que favorecen la acumulación de ciertos metabolitos con respecto a otros (Farré *et al.*, 2013; Naqvi *et al.*, 2011). La composición exacta de carotenoides depende de la actividad relativa de las diferentes enzimas en pasos posteriores de la ruta metabólica, así se explica porqué la expresión de *PSY* en maíz y colza resultó en la acumulación de diferentes metabolitos finales, imitando la situación que se observa en las plantas no transformadas, en las que diferentes carotenoides se acumulan en distintas proporciones en función de la especie que los produzca. Modulaciones posteriores con enzimas del final de la ruta metabólica pueden cambiar el perfil de los carotenoides de una forma predecible. Se han generado líneas transgénicas de plantas de colza que expresaban genes bacterianos equivalentes a PSY (*CRTB*), desaturasas e isomerasas (*CRTI*) y licopeno  $\beta$ -ciclase (*CRTY*). Las semillas transgénicas que expresaban estos tres genes no sólo contenían niveles elevados de carotenoides y un aumento general del flujo comparándolo con el control, como era de esperar, sino que también la ratio entre  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno aumentó de 2:1 hasta 3:1, lo que demuestra que la actividad adicional de la licopeno  $\beta$ -ciclase (LYCB) proveniente del gen bacteriano *CRTY* hizo que el flujo aumentara especialmente hacia  $\beta$ -caroteno (Ravanello *et al.*, 2003). Se puede deducir que la producción de  $\beta$ -caroteno se verá incrementada expresando LYCB o la enzima equivalente en bacterias *CRTY*, teóricamente a expensas de  $\alpha$ -caroteno y luteína (Rosati *et al.*, 2000, D'Ambrosio *et al.*, 2004; Diretto *et al.*, 2006). La sobreexpresión de la licopeno  $\beta$ -ciclase en tomates también resultó en un incremento de los niveles de  $\beta$ -caroteno (Rosati *et al.*, 2000; D'Ambrosio *et al.*, 2004).

El resultado de estos experimentos no es siempre predecible ya que la modulación de la ruta metabólica de los carotenoides

mediante la introducción de nuevas enzimas puede inducir mecanismos de retroalimentación desconocidos que generen resultados impredecibles (Bramley, 2002). Por ejemplo, las pruebas con tomate resultaron en una acumulación de licopeno en vez de  $\beta$ -caroteno, lo que indica que la falta de actividad ciclasa evitó la acumulación de  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno (Ronen *et al.*, 1999). Así pues, se esperaba que tomates transgénicos expresando *CRTI* acumularan más licopeno, ya que este gen aumenta el flujo hasta licopeno pero no afecta a las enzimas que se encuentran más delante de la ruta metabólica. Sorprendentemente, los resultados mostraron que las plantas sólo contenían 30% del contenido normal de carotenoides pero la cantidad de  $\beta$ -caroteno se había triplicado (Romer *et al.*, 2000). Estos inesperados resultados indican que la LYCB endógena incrementó su actividad en los frutos, esta hipótesis fue apoyada por los análisis de expresión a nivel de ARNm (Romer *et al.*, 2000).

En algunos casos, en vez de modular una ruta metabólica existente, el objetivo es introducir una nueva función, por ejemplo, introducir el metabolismo de los carotenoides en plantas que carecen de estas moléculas. El ejemplo más representativo sería el arroz, el cual puede acumular fitoeno en el endospermo si se expresa *PSY*, pero no otros carotenoides, lo que indica que carece de capacidad metabólica posterior (Burkhardt *et al.*, 1997). La expresión simultánea en el endospermo de arroz de los genes *PSY* de narciso y *CRTI* de una bacteria resultó en la acumulación de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -xantofilas en el “*Golden Rice 1*” (Ye *et al.*, 2000). Cuando se sustituyó el *PSY* de narciso por el de maíz, para producir el “*Golden Rice 2*” el arroz fue mejorado al incrementar los niveles de  $\beta$ -caroteno hasta 37 veces comparado con el control y resultó una estrategia más efectiva (Paine *et al.*, 2005). La presencia de un carotenoide cíclico, como el  $\beta$ -caroteno, en

el endospermo del arroz transgénico sugirió la expresión de *LYCB* endógena, lo cual se confirmó con análisis de expresión de genes (Schaub *et al.*, 2005). El mismo experimento reveló la expresión de otros genes endógenos *PDS*, *ZDS* y *CRTISO*, los cuales deberían proporcionar un potencial carotenogénico incluso sin la presencia del gen bacteriano *CRTI*. La ausencia de otros carotenoides en plantas transgénicas expresando solamente *PSY* indica que la actividad de las enzimas *PDS*, *ZDS* o *CRTISO* es probablemente muy baja.

Se puede utilizar el mismo método para extender rutas parcialmente y generar carotenoides adicionales en plantas con un repertorio limitado. La mayoría de las plantas sintetizan carotenoides hidroxilados, pero pocas pueden sintetizar cetocarotenoides complejos (excepciones conocidas son el pimiento y *Adonis aestivalis*), aunque muchos microorganismos carotenogénicos tienen esta habilidad. Se han usado varias estrategias para extender la ruta metabólica de los carotenoides en plantas para producir cetocarotenoides con importancia nutricional e industrial (Berman *et al.*, 2014). Una línea de patata transgénica que acumulaba zeaxantina debido a la supresión de la actividad *ZEP* fue retransformada con un gen de *Synechocystis* PPC 6803 *CRTO* que codificaba para  $\beta$ -caroteno cetolasa, resultando en la acumulación de equinona de manera constitutiva, y 3'-hidroxiequinona 4'-cetozeaxantina y astaxantina en los tubérculos (Gerjets, Sandmann y Sandmann, 2007). El nuevo cetocarotenoide formado representaba 10-12% del total de los carotenoides. Un cultivar maya de patata dorada que acumula naturalmente niveles elevados de violaxantina y luteína en los tubérculos, y otro cultivar estándar Desiree, con bajo contenido de carotenoides, fueron transformados con un gen ( $\beta$ -caroteno cetolasa) de una cianobacteria resultando en la acumulación de cetoluteína y astaxantina (Morris *et al.*, 2006). La colza fue transformada con *CRTZ*

( $\beta$ -caroteno hidroxilasa, BCH) y *CRTW* ( $\beta$ -caroteno cetolasa) de la bacteria marina *Brevundimonas* SD212, y también el gen de *Paracoccus* N81106 *IPI* y los genes de la ruta metabólica de los carotenoides *CRTE*, *CRTB*, *CRTI* y *CRTY* de *Pantoea ananatis*. Las plantas que expresan los siete genes acumularon 18.6 veces más carotenoides totales, comparándolos con la planta no transformada, incluyendo cetocarotenoides, como equinona, cantaxantina, astaxantina y adonixantina, que no se encuentran en las semillas de las plantas control (Morris *et al.*, 2006). Recientemente, la expresión del gen de maíz *PSY*, *Paracoccus CRTW* y *Paracoccus CRTI* y los genes *LYCB* y *BCH* de *Gentiana lutea*, resultaron en la acumulación de cetocarotenoides, como adonixantina, equinona y astaxantina en maíz transgénico (Zhu *et al.*, 2008).

La ingeniería genética para aumentar los cetocarotenoides ha sido un éxito en bacterias (Misawa y Shimada, 1998), levaduras (Visser, Van Ooyen y Verdoes, 2003), en plantas modelo y cultivos como arroz, patata, zanahoria, tabaco, colza y maíz (Zhong *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012, 2013; Cunnihgam y Gantt, 2011; Zhu *et al.*, 2009).

Una última estrategia para aumentar la acumulación de carotenoides en plantas es modificar su capacidad de almacenaje. Los carotenoides se acumulan en los cromoplastos (Goodwin y Britton, 1988), que a menudo se derivan de cloroplastos completamente desarrollados durante la maduración del fruto y el desarrollo floral. No obstante, también se pueden formar a partir de proplastidos en tejidos en división y de plastidos no fotosintéticos como los leucoplastos y amiloplastos (Marano *et al.*, 1993). En todos los casos, los cromoplastos acumulan grandes cantidades de carotenoides en estructuras especializadas que secuestran lipoproteínas (Bartley y Scolnik, 1995). Una mutación espontánea en el gen

naranja (*OR*) produjo una coliflor de color naranja, que se asoció con la acumulación de carotenoides en los cromoplastos, aumentando la actividad carotenogénica y la aparición de estructuras secuestrantes de carotenoides en forma de cristales (Li *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006). La expresión del gen *OR* en patata, conducida por el promotor *granule-bound starch synthase* (GBSS) produjo tubérculos naranjas que acumulaban diez veces más  $\beta$ -caroteno comparado con el control (López *et al.*, 2008). Los plastos de las células de los tubérculos control contenían gránulos de almidón de distintos tamaños. En cambio, los plastos de las células de las plantas transgénicas contenían plastos naranjas y fragmentos derivados (López *et al.*, 2008).

## RECURSOS DISPONIBLES PARA LA INVESTIGACIÓN APLICADA A LOS CAROTENOIDES

### Clonación de genes y enzimas

La fuente más importante de enzimas carotenogénicas utilizadas en la ingeniería genética de esta ruta en plantas es la colección de genes que han sido clonados de bacterias, hongos, algas y plantas superiores. La mayoría de estos genes han sido expresados en *E. coli*, sistema en el que se pueden realizar estudios de caracterización funcional y complementación metabólica.

Los genes microbianos poseen varias ventajas respecto a los equivalentes en plantas. Primero, su menor tamaño hace que sean más fáciles de manipular y su aislamiento en bacterias está facilitado, en muchos casos, por el *clustering* o agrupamiento genómico en islas metabólicas u operones (Misawa *et al.*, 1990; Lee y Kim, 2006). Otra ventaja particular

de los genes microbianos es la naturaleza multifuncional que poseen. Por ejemplo, el gen *CRTI* combina tres funciones enzimáticas que se representan por tres enzimas independientes en las rutas metabólicas endógenas vegetales (PDS, ZDS y CRTISO), lo cual significa que se necesitaran menos genes para la ingeniería de carotenoides. Un gen aislado de un hongo combina las funciones de *CRTB* y *CRTY* (*PSY* y *LYCB*) (Verdoes *et al.*, 2003) y ofrece la posibilidad de que la ruta entera de GGPP hasta  $\beta$ -caroteno se pueda reconstruir con sólo dos genes.

Los genes carotenogénicos microbianos son también muy diversos funcionalmente, siendo la única fuente de muchas enzimas involucradas en la producción de cetocarotenoides. Aunque estas enzimas tienen actividad hidroxilasa o cetolasa parecida a la de otros organismos, su preferencia estricta por sustrato y actividad en ambientes diferentes hace posible ajustar el metabolismo de las plantas para producir perfiles carotenogénicos altamente específicos. Esto refleja la compleja ruta metabólica hasta astaxantina, en la que múltiples enzimas pueden actuar sobre múltiples intermediarios y generar como resultado productos diversos dependiendo del balance de actividades, preferencias de sustrato y orden de las reacciones. Por ejemplo, genes que codifican cetolasas del tipo CRTW pueden sintetizar cantaxantina desde  $\beta$ -caroteno a través de equinona, y pueden producir astaxantina a partir de zeaxantina a través de adonixantina. Por el contrario, cetolasas tipo CRTO generalmente no pueden sintetizar astaxantina desde zeaxantina, mostrando que son incapaces de aceptar el anillo 3-hidroxi- $\beta$ -ionona como sustrato. Sin embargo, *Chlorella zofingiensis* posee una enzima CRTO que funciona como una  $\beta$ -caroteno oxigenasa que puede convertir zeaxantina en astaxantina a través de adonixantina así como  $\beta$ -caroteno en cantaxantina via equinona (Huang *et al.*, 2006).

Muchos de los genes carotenogénicos de plantas también han sido identificados y clonados. Aunque carecen de la multifuncionalidad y diversidad de los equivalentes microbianos, son más adecuados para usarlos en plantas transgénicas, ya que tienen los codones optimizados, se adaptan a ambientes intracelulares *in planta* y contienen señales de localización adecuadas para permitir la correcta compartimentación subcelular (Gallagher, *et al.*, 2004). Los genes de plantas también permiten estudiar aspectos del metabolismo específico de compartimentos y tejidos que es irrelevante en bacterias, y encontrar diferencias funcionales que se derivan de sus orígenes únicos. Por ejemplo, Okada *et al.* (2000) identificaron cinco genes GGPPs en *Arabidopsis*, expresándose cada uno de ellos con un perfil espacio-temporal diferente. Esta considerable diversidad de secuencias sugiere una evolución convergente más que una divergencia de ancestros duplicados e indica que las enzimas deben tener diferencias funcionales y estructurales (Zhu *et al.*, 1997).

Un ejemplo interesante y relevante de la diversidad espacio-temporal y funcional es la enzima PSY de maíz, que aparece como tres isozimas codificadas por los genes *psy1*, *psy2* y *psy3*. La función específica de cada gen no está totalmente elucidada, pero el gen *psy1* fue inicialmente identificado a través del análisis del mutante *yellow1* (*y1*), que confiere un fenotipo de mazorca amarillo suave causado por la carencia de carotenoides (Randolph y Hand, 1940) y el contenido de carotenoides en el endospermo se correlaciona con los niveles de expresión de ARN mensajero de *psy1* pero no de los otros parálogos, sugiriendo que tiene un papel específico en la carotenogénesis del endospermo (Li *et al.*, 2008). PSY1 también se necesita para la carotenogénesis en la oscuridad o bajo estrés en el tejido fotosintético, mientras que PSY2 es necesario para la carotenogénesis de la hoja y PSY3 para la

de las raíces y la síntesis del ácido abscísico dependiente de estrés (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008).

## Germoplasma (diversidad natural y mutantes específicos)

Muchas plantas muestran una variación natural importante en el nivel de carotenoides, reflejando en algunos casos el efecto aditivo de alelos múltiples *Quantitative Trait Loci* (QTL) cada uno de ellos con un menor efecto individual, en otros casos revelan la presencia de un gen principal de la ruta de biosíntesis de los carotenoides que tiene un fuerte impacto en sí mismo, resultando en un fenotipo sorprendente que se transmite como un carácter mendeliano. La mejora genética convencional para seleccionar progresivamente QTL con una influencia deseable en el nivel de carotenoides es lenta y laboriosa. Además está restringida a la biodisponibilidad de genes (y consecuentemente a carotenoides que ya se producen en las plantas diana). Sin embargo, mutantes y variantes con propiedades carotenogénicas interesantes siguen siendo herramientas útiles en la investigación de carotenoides, ya sea como base para estudios de complementación o como punto de partida para la mejora basada en la biotecnología.

## Cereales

En el caso de los cereales, el maíz es un valioso modelo en la investigación de carotenoides por la diversidad de su mezcla genética, la facilidad para realizar análisis genéticos y la tendencia de variantes carotenogénicas a mostrar claros fenotipos. Las mazorcas de maíz acumulan de forma natural luteína y zeaxantina, mostrando gran variabilidad en la concentración acumulada, lo que indica que la mejora genética convencional puede usarse para mejorar el potencial nutritivo

de esta especie (Kurilich y Juvik, 1999). Se han identificado una serie de mutantes con deficiencias específicas en el metabolismo de los carotenoides. Un ejemplo es el mutante *yellow 1 (y1)*, descrito antes, que se relaciona con el gen *PSY1*. Los otros (*vp2*, *vp5*, *vp7*, *vp9*, *w3* y *y9*) combinan dos fenotipos mutantes comunes, albinismo y viviparidad (desarrollo prematuro debido a la ausencia de ácido abscísico) (Wurtzel, Luo y Yatou, 2001), que han sido mapeados con genes que codifican para enzimas carotenogénicas. Singh *et al.* (2003) identificaron un mutante con una inserción *Ac* llamado *pink scutellum 1 (ps1)* que se mapea con el mismo locus que *vp7* y representa una disrupción insercional del gen *LYCB*. Los análisis detallados de QTL para mejora asistida por marcadores en maíz son más sencillos gracias a la identificación de marcadores moleculares asociados a los mutantes anteriormente descritos. Por ejemplo, el marcador de una única repetición de secuencia (SSR, por su nombre en inglés, *single sequence repeat*) asociado con *y1* se relacionó con un mayor QTL que permite explicar 6.6-27.2% de la variación fenotípica de los niveles de carotenoides, y eventualmente ha sido relacionado con el gen *PSY1* (Wong *et al.*, 2004). Un QTL relacionado con *y9* puede ser útil para piramidar alelos favorables que controlan niveles de carotenoides en germoplasmas diversos (Chander *et al.*, 2008).

Harjes *et al.* (2008) describieron cuatro polimorfismos en el locus *lyce* (que codifica para licopeno  $\epsilon$ -ciclase [LYCE]) en maíz, una enzima que compite con LYCB por el licopeno y ayuda a determinar el nivel relativo de niveles de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. La aplicación de mejora genética para seleccionar niveles bajos de actividad en LYCE, incrementó los niveles de  $\beta$ -caroteno en las semillas hasta 13.6 $\mu$ g/g en peso seco (mejora de 30-40%). Vallabhaneni *et al.* (2009) caracterizaron seis genes caroteno hidroxilasa en colecciones de germoplasma

de maíz con diversidad genética, aunque parece que sólo uno afecta los niveles de carotenoides en semillas (Vallabhaneni *et al.*, 2009). Tres alelos de este gen *HYD3* son responsables de 78% de la variación en la proporción  $\beta$ -caroteno/ $\beta$ -criptoxantina (once veces de diferencia entre variedades) y 36% de la variación de niveles absolutos de  $\beta$ -caroteno (cuatro veces de diferencia entre variedades). Estos autores han utilizado una combinación de bioinformática y clonaje para identificar y mapear familias de genes que codifican para enzimas carotenogénicas del maíz y otras gramíneas, y han identificado los que tienen niveles de ARNm que correlacionan de forma positiva o negativa con los niveles de carotenoides en el endospermo (Vallabhaneni y Wurtzel, 2009).

Estudios parecidos se han llevado a cabo en otros cereales, por ejemplo, un subgrupo de mutantes de arroz con germinación antes de la cosecha (*pre-harvest sprouting*, PHS, análogos a los mutantes vivíparos del maíz) también muestran un fenotipo albino, y éstos han llevado a la identificación de genes carotenogénicos que codifican para PDS (*PHS1*), ZDS (*PHS2-1*, *PHS2-2*), CRTISO (*PHS3-1*), ninguno de ellos puede acumular carotenoides, y LYCB (*PHS4-1*, *PHS4-2*) que acumula licopeno (Fang *et al.*, 2008). En trigo, *Triticordeum hexaploides*, producen más carotenoides que los respectivos parentales o híbridos derivados de cruzamientos entre cebada silvestre diploide y trigo duro (Álvarez, Martín y Martín, 1999). Un QTL (*carot1*), que parece ser el responsable de 14.8% de la variación fenotípica en la acumulación de carotenoides, quizá sea utilizado en programas de mejora asistida por marcadores (Atienza *et al.*, 2004). Una población de dobles haploides de trigo, que fue caracterizada previamente por el color del endospermo (Clarke *et al.*, 2006), se usó para mapear los genes *PSY1* y *PSY2* sobre cuatro QTL que influyen en el color del endospermo, con uno de ellos mostrando una

fuerte correlación (Pozniak *et al.*, 2007). En sorgo, Kean *et al.*, (2007) determinaron el perfil de carotenoides de ocho cultivares de endospermo amarillo, en los cuales zeaxantina era el carotenoide más abundante. Salas Fernández *et al.* (2008) detectaron varios QTL responsables de la variación de los niveles de carotenoides en una población de líneas puras recombinantes, un cruzamiento entre la variedad de endospermo amarillo KS115 y la de endospermo blanco Macia. De entre los cuatro QTL que codifican para endospermo con color y los cinco para el contenido de  $\beta$ -caroteno, uno fue mapeado al gen *PSY3*.

### Raíces y tubérculos (patata y zanahoria)

En raíces y tubérculos también encontramos recursos naturales que se podrán usar posteriormente en programas de ingeniería genética enfocados en la mejora de los carotenoides. Las patatas muestran una gran diversidad en el contenido de carotenoides. Los programas de mejora que utilizan cultivares con tubérculos de color rojo/púrpura (Morris *et al.*, 2004) y amarillo oscuro (Brown *et al.*, 2005) han logrado incrementar los niveles de carotenoides hasta 8  $\mu\text{g/g}$  en peso fresco. El locus *Y* (*yellow*) en patata controla el color de la pulpa del tubérculo ya que influye en la acumulación de carotenoides; existe una serie de alelos de dominancia creciente, empezando por el alelo completo recesivo y (pulpa blanca sin carotenoides), seguido por el alelo *Y* (pulpa amarilla) y el alelo *Or* completamente dominante (pulpa naranja, que refleja la acumulación de zeaxantina). El locus *Y* ha sido mapeado en una región del cromosoma 3 con dos genes candidatos que codifican para *PSY* y *BCH*, y posiblemente para elementos reguladores adicionales (Bonierbale, Plaisted y Tanksley, 1988). Obsérvese que el alelo *Or* del locus endógeno *Y* no es el mismo que el gen *Or* de coliflor (véase arriba), que codifica para un homólogo *DnaJ* y ha sido introducido como un carácter

heterólogo en patata para forzar la acumulación de  $\beta$ -caroteno en plastos (Lu *et al.*, 2006). Los estudios de QTL en zanahoria se han llevado a cabo utilizando inter cruzamientos de zanahorias naranjas cultivadas y líneas silvestres, y entre líneas especiales con poco color naranja (Brasilia) con líneas naranja oscuro (HCM) (Fernandes Santos y Simon, 2002). Los QTL más representativos justificaron 4.7-8% de la variación fenotípica total en niveles de  $\zeta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno; la correlación positiva entre el color de la raíz y un mayor contenido de carotenoides fue lo que facilitó el proceso de selección. Un estudio posterior utilizando zanahorias blancas permitió identificar PSY como el mayor paso limitante en la síntesis de carotenoides (Fernandes Santos, Senalik y Simon, 2005). Un estudio más reciente consistió en cruzamientos entre zanahorias naranjas cultivadas y blancas silvestres, que permitieron identificar QTL en dos grupos relacionados, uno asociado con el nivel total de carotenoides (locus Y) y otro con la acumulación de xantofilas a expensas de otros carotenoides (locus Y2) (Just *et al.*, 2009).

### Tomate y otros frutos

Los perfiles de carotenoides en tomate también tienen una variabilidad significativa; se han identificado varias mutaciones que afectan el contenido total y la diversidad de carotenoides. Entre ellas se encuentra *r* (*yellow-flesh*, pulpa amarilla), caracterizada por tener frutos amarillos como consecuencia de una mutación que comporta la pérdida de función de PSY1 (Fray y Grierson, 1993), y *delta*, que acumula  $\delta$ -caroteno en vez de licopeno, reflejando un incremento en la expresión del gen que codifica para  $\epsilon$ -ciclase (Ronen *et al.*, 1999). La mutación *tangerine*, llamada así por el color de la fruta, refleja la pérdida de actividad de CRTISO. Se han identificado dos mutaciones que afectan la actividad de LYCB llamadas  $\beta$  (caracterizada por un incremento de 45% del contenido de

$\beta$ -caroteno en frutas comparado con el silvestre que resulta en un color de fruta naranja característico) y *old-gold* (*og*) que carece de  $\beta$ -caroteno pero tiene niveles de licopeno más altos de lo normal (Ronen *et al.*, 2000). Investigaciones sobre QTL que afectan el contenido de licopeno en tomate, basadas en el cruzamiento entre un cultivar especial rico en licopeno y una variedad estándar reveló ocho QTL, uno responsable de 12% de la variación en el contenido de licopeno, y una búsqueda más reciente de QTL que afectan el color de la fruta en líneas de introgresión, identificó 16 loci, cinco de los cuales cosegregaron con genes candidatos involucrados en la biosíntesis de carotenoides (Liu *et al.*, 2003).

El color rojo oscuro de la pulpa de la sandía refleja el contenido en carotenoides. Un estudio comparativo sobre 50 variedades comerciales mostró que los niveles de carotenoides totales en variedades de pulpa rojiza varía de 37-122 mg/kg en peso fresco, con 84-97% del contenido representado por licopeno, y los que contenían los niveles más altos de licopeno también contenían los niveles más elevados de  $\beta$ -caroteno (Perkins-Veazie *et al.*, 2006). Los melones (*Cucumis melo*) tienen pulpa de color variable desde el verde al naranja, mostrando un perfil de carotenoides muy diverso. Líneas puras recombinantes, California y Wisconsin, se usaron para identificar QTL que afectarían a los niveles de  $\beta$ -caroteno. Se encontraron ocho loci que justificaban 8-31% de la variación fenotípica, uno de ellos mapeado con el gen que codifica para BCH (Cuevas *et al.*, 2008). La diversidad de carotenoides en kiwi también ha sido investigada, ya que producen mayoritariamente  $\beta$ -caroteno y luteína que pueden ser modulados por variación genética a nivel del locus *lycb* (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2009). También se ha encontrado una variabilidad significativa en la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) con la identificación del mutante "Hong Anliu", que es de color rojo intenso y contiene

mil veces más licopeno que la variedad silvestre (Liu *et al.*, 2007).

Los cultivares rojos de *Capsicum* merecen una mención especial porque son de los pocos ejemplos conocidos de plantas que producen cetocarotenoides (Deli *et al.*, 2001). Un mapa genético fue desarrollado a partir de un cruce interespecífico entre *Capsicum annuum* (TF68, rojo) y *Capsicum chinense* (Habanero, naranja). Varios genes carotenogénicos fueron mapeados y sirvieron como genes candidatos para el control del contenido de carotenoides y del color de los frutos, incluyendo PSY que justifica 53.4% de la variación (Huh *et al.*, 2001). Las líneas homocigóticas y heterocigóticas que contenían alelos PSY del parental TF68 tenían seis veces más la cantidad de carotenoides que las frutas homocigóticas para el alelo Habanero. Un estudio más reciente que utilizaba 12 variedades de pimiento permitió identificar una correlación entre los niveles de actividad de PSY, PDS y CCS y el contenido de carotenoides (Ha *et al.*, 2007).

### Cepas bacterianas para estudios de complementariedad

La mayoría de los genes carotenogénicos descritos anteriormente se han caracterizado funcionalmente por la combinación de los análisis de secuencia y de complementación en *E. coli*, una bacteria no carotenogénica. *E. coli* es ideal para realizar este tipo de estudios, ya que al carecer de síntesis de carotenoides se pueden crear cepas recombinantes que restablezcan parcialmente la ruta, que bloqueen la ruta en puntos específicos y, consecuentemente, que acumulen diferentes intermediarios para evaluar sistemáticamente la función de nuevos genes. Los productos sintetizados en *E. coli* pueden identificarse por cromatografía,

aunque los colores de las colonias pueden proporcionar un método de identificación más rápido (Goodwin y Britton, 1988). Sin embargo, la cantidad de GGPP en *E. coli* es insuficiente para producir carotenoides, así que antes de que este sistema pueda ser utilizado para estudios de complementación, la cantidad de GGPP tiene ser aumentar por la expresión de geranylgeranyl difosfato sintasa (codificado por *CRTE*).

La adición de genes carotenogénicos genera la producción de intermediarios específicos. Por ejemplo, la introducción de *CRTE*, *CRTB*, *CRTI* y *CRTY* facilita la síntesis *de novo* de licopeno,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina (Misawa *et al.*, 1990) y la posterior adición de *CRTZ* y *CRTW* facilita la síntesis de astaxantina (50% de los carotenoides totales) y varios intermediarios (Misawa *et al.*, 1995). Si también se añade *CRTX* se facilita la síntesis de dos glucósidos de carotenoides, astaxantina- $\beta$ -D-diglucósido y adonixantina-3'- $\beta$ -D-glucósido (Yokoyama, Shizuri y Misawa, 1998).

En algunas ocasiones se utilizan otras bacterias para análisis funcionales, como *Zymomonas mobilis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhodobacter capsulatus* (Misawa, Yamano y Ikenaga, 1991) y el hongo *Mucorcircinelloides* (Álvarez *et al.*, 2006).

### PLANTAS TRANSGÉNICAS CON PERFILES DE CAROTENOIDES ALTERADOS

La introducción de genes carotenogénicos directamente a las plantas simplifica los laboriosos programas de mejora que se requieren para explotar la diversidad natural, y también permite introducir genes más allá de la reserva natural de cada planta.

Este segundo punto es importante, ya que prevalece como la única estrategia que puede ser utilizada para la introducción de carotenogénesis *de novo* o para extender la vía de biosíntesis de carotenoides más allá de su punto final natural, por ejemplo para producir cetocarotenoides en los principales cultivos.

Ha habido un significativo progreso en el desarrollo de cultivos transgénicos productores de carotenoides con niveles aumentados, y más recientemente ha habido varios logros clave en las áreas de la modulación puntual de las ramificaciones (desplazando el flujo hacia moléculas concretas y desviándolo de otras), la carotenogénesis *de novo* (introduciendo la vía carotenogénica completa en tejidos de plantas que carecen de carotenoides) y la extensión de las

vías metabólicas (tabla 1). Una serie de estudios de casos relevantes se describen a continuación.

## Plantas modelo: Arabidopsis y tabaco

A pesar de no tener importancia agronómica, las especies modelo de laboratorio, como *Arabidopsis*, se pueden someter a análisis genéticos y a menudo proporcionan avances que pueden usarse para facilitar el inicio de un estudio en cultivos. Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan una gama de genes carotenogénicos han sido generadas y analizadas en su capacidad de acumulación de carotenoides, incluyendo la expresión de genes heterólogos de plantas, genes bacterianos y productos recombinantes, tales como las poliproteínas

**TABLA 1.** Carotenoides predominantes en vegetales

Especies	Genes (origen)	Promotores	Órganos y tejidos de expresión	Carotenoides predominantes	Niveles de carotenoides en plantas transgénicas	Referencia
Arabidopsis ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<i>psy</i> (Arabidopsis)	NapA	Semilla	360 µg/g peso seco luteína (PS) (4 veces) 241.8 µg/g PS β-caroteno (43 veces) (asumiendo contenido de agua del 7%)	900 µg/g PS carotenoides totales (6 veces) en semilla	Lindgren <i>et al.</i> , 2003
	<i>bkt1</i> ( <i>Haematococcus pluvialis</i> )	NapA	Semilla	0.88 µg/g PS β-caroteno en semilla 13 veces increase 4 ceto-luteína, cantaxantina y adonirubina	4.6 veces carotenoides totales en semilla	Stalberg <i>et al.</i> , 2003
	<i>Chyb</i> (Arabidopsis)	CaMV35S	Hoja	11.4 µg/g PS astaxantina 111.24 µg/g PS β-caroteno (0.4 veces)	1299 µg/g PS carotenoides totales (0.5 veces)	Cho <i>et al.</i> , 2008
	<i>psy</i> (Arabidopsis)	CaMV35S	Raíz	241.63 µg/g PS β-caroteno (191-veces)	514.1 µg/g PS carotenoides totales (93.5 veces)	Maass <i>et al.</i> , 2009

Arabidopsis ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<i>Bkt (C. reinhardtii)</i>	CaMV35S	Hoja	220 µg/g PS β-caroteno (0.66 veces) en hojas	3690 µg/g PS carotenoides totales (1.75 veces) en hojas	Zhong <i>et al.</i> , 2011
				1370 µg/g PS astaxantina en hojas	2760 µg/g PS cetocarotenoides totales en hojas	
			Semilla	4.49 µg/g PS β-caroteno (3 veces) en semilla	113.97 µg/g PS carotenoides totales (1.75 veces) en semilla	
				32.12 µg/g PS astaxantina en semilla	59 µg/g PS cetocarotenoides totales en semilla	
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	<i>psyl</i> y <i>lycb</i> ( <i>N. pseudonarcissus</i> ) <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Rice Gt1 y CaMV35S	Endospermo	—	1.6 µg/g PS carotenoides totales	Ye <i>et al.</i> , 2000
	<i>psyl</i> ( <i>Z. mays</i> ) <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Rice Gt1	Endospermo	31 µg/g PS β-caroteno	37 µg/g PS carotenoides totales	Paine <i>et al.</i> , 2005
	<i>crtB</i> ( <i>P. ananatis</i> )	NapA	Semilla	949 µg/g PF β-caroteno (316 veces)	1617 µg/g peso fresco (PF) carotenoides totales (50-veces)	Shewmaker <i>et al.</i> , 1999
	<i>crtB</i> y <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	NapA	Semilla	857 µg/g PF β-caroteno	1412 µg/g PF carotenoides totales (50 veces)	Ravanello <i>et al.</i> , 2003
	lycopene β-cyclase ( <i>B. napus</i> ) RNAi to 5' end	CaMV35S	Semilla	90.76 µg/g PF β-caroteno (185.2 veces) 76.22 µg/g PF luteína (23 veces)	227.78 µg/g PF carotenoides totales (42.6 veces)	Yu <i>et al.</i> , 2008
Colza ( <i>Brassica napus</i> )	<i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtY</i> ( <i>P. ananatis</i> ) <i>crtZ</i> y <i>crtW</i> ( <i>Brevundimonas spp.</i> )	CaMV35S (crtE, crtI y crtY, napA (idi y crtZ) y Arabidopsis FAE1 (crtW y crtB))	Semilla	214 µg/g PF β-caroteno (1070 veces)	657 µg/g PF carotenoides totales (30 veces)	Fujisawa <i>et al.</i> , 2009
	<i>DET1</i> RNAi (Arabidopsis)	CaMV35S	Semilla	6.5 µg/g PF β-caroteno (6.5 veces) 13 µg/g PF luteína (2.3 veces)	21 µg/g PF carotenoides totales (3.5 veces)	Wei <i>et al.</i> , 2009
	microRNA miR156b (Arabidopsis)	CaMV35S	Semilla	0.38 µg/g PF β-caroteno (4.5 veces) 6.21 µg/g PF luteína (2 veces) (asumiendo contenido de agua del 10%)	7.1 µg/g PF carotenoides totales (2 veces) (asumiendo contenido de agua de 10%)	Wei <i>et al.</i> , 2010

Lotus japonicus	<i>crtW</i> ( <i>Agrobacterium aurantiacum</i> )	CaMV35S	Pétalo	79.3 µg/g PF β-caroteno (2.2 veces)	387 µg/g PF carotenoides totales (1.5 veces) 89.9 µg/g PF cetocarotenoides totales	Suzuki <i>et al.</i> , 2007
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	<i>psy1</i> ( <i>Z. mays</i> ) <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> ) <i>lycb</i> ( <i>G. lutea</i> ) <i>bch</i> ( <i>G. lutea</i> )	Wheat LMW lutelin, barley D-hordein, rice glutelin, rice prolamin	Endospermo	34.81 µg/g PS β-caroteno 22.36 µg/g PS adonixantina	146.75 µg/g PS carotenoides totales (133.4 veces) 35.6 µg/g PF cetocarotenoides totales	Zhu <i>et al.</i> , 2008
	<i>crtB</i> y <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	super γ-zein	Semilla	9.8 µg/g PS PS β-caroteno (3.8 veces)	33.6 µg/g PS carotenoides totales (34 veces)	Aluru <i>et al.</i> , 2008
	<i>psy1</i> ( <i>Z. mays</i> ) <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Wheat LMW lutelen y barley D-hordein	Endospermo	59.32 µg/g PS β-caroteno (112 veces)	163.29 µg/g PS carotenoides totales (34 veces)	Naqvi <i>et al.</i> , 2009
Mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> )	<i>crtB</i> ( <i>P. ananatis</i> )	CP1	Raíz	6.67 µg/g PS β-caroteno (16 veces)	21.84 µg/g PS carotenoides totales (33.6 veces)	Welsch <i>et al.</i> , 2010
Naranja ( <i>Citrus × sinensis</i> )	β-CHX RNAi ( <i>C. sinensis</i> )	CaMV35S	Pulpa	0.036 µg/g PF β-caroteno (11.7 veces)	4.187 µg/g PS carotenoides totales (0.34 veces)	Pons <i>et al.</i> , 2014
Naranja china ( <i>Fortunella hindsii</i> )	<i>Psy</i> ( <i>C. sinensis</i> )	CaMV35S	Fruta	1.72 µg/g PF β-caroteno (2.5 veces)	131.9 µg/g PF carotenoides totales (1.6 veces)	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Patata ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>ZEP</i> ( <i>Arabidopsis</i> )	GBSS	Tubérculo	2.4 µg/g PS β-caroteno (3.4 veces) 40.1 µg/g PS zeaxantina (133 veces)	60.8 µg/g PS carotenoides totales (5.7 veces)	Römer <i>et al.</i> , 2002
	<i>crtB</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Patatin	Tubérculo	10.3 µg/g PS β-caroteno (10 veces)	35 µg/g PS carotenoides totales (6.3 veces)	Ducreux <i>et al.</i> , 2005
	<i>lyce</i> (potato, antisentido)	Patatin	Tubérculo	0.043 µg/g PS β-caroteno (14 veces)	9.9 µg/g PS carotenoides totales (2.5 veces)	Diretto <i>et al.</i> , 2006
	<i>crtO</i> ( <i>Synechocystis</i> sp.)	CaMV35S	Tubérculo	0.7 µg/g PS astaxantina 24.6 µg/g PS zeaxantina	39.2 µg/g PS carotenoides totales (2.1 veces)	Gerjets and Sandmann 2006
	<i>dxs</i> ( <i>E. coli</i> )	Patatin	Tubérculo	1.2 µg/g PS luteína (12 veces)	7 µg/g PS carotenoides totales (2 veces)	Morris <i>et al.</i> , 2006a

Patata ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>bkt1</i> ( <i>H. pluvialis</i> )	Patatin	Tubérculo	13.9 µg/g PS astaxantina	30.4 µg/g PS carotenoides totales (4 veces) 19.8 µg/g PS cetocarotenoides totales	Morris <i>et al.</i> , 2006b
	<i>or</i> (coliflor; <i>Brassica oleracea var botrytis</i> )	GBSS	Tubérculo	Violaxantina, luteína y β-caroteno	24 µg/g PS carotenoides totales (6 veces)	Lu <i>et al.</i> , 2006
	<i>bch</i> (patata, antisentido)	Patatin	Tubérculo	0.085 µg/g PS β-caroteno (38 veces)	14.3 µg/g PS carotenoides totales (3 veces)	Diretto <i>et al.</i> , 2007b
	<i>crtB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtY</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Patatin	Tubérculo	47 µg/g PS β-caroteno (3643 veces)	114 µg/g PS carotenoides totales (20 veces)	Diretto <i>et al.</i> , 2007a
	<i>bch</i> (potato, antisentido)	Patatin	Tubérculo	2.64 µg/g PS β-caroteno (331 veces) (asumiendo contenido de agua de 80%)	4.7 µg/g PS carotenoides totales (1.04 veces) (asumiendo contenido de agua de 80%)	Van Eck <i>et al.</i> , 2007
	<i>or</i> (cauliflower)	GBSS	Tubérculo	5.01 µg/g PS β-caroteno (331 veces)	28.22 µg/g PS carotenoides totales (5.2 veces)	López <i>et al.</i> , 2008
Soja ( <i>Glycine max</i> )	recombinant PAC	β-conglycinin	Semilla	112 µg/g PS β-caroteno	146 µg/g PS total carotenoid (62 veces)	Kim <i>et al.</i> , 2012
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>crtW</i> y <i>crtZ</i> ( <i>Paracoccus</i> sp)	CaMV35S	Tejido nectario	438 µg/g PS β-caroteno (7.8 veces)	1275 µg/g PS total carotenoid (6.8 veces) 64 µg/g PS total cetocarotenoid	Ralley <i>et al.</i> , 2004
	<i>crtO</i> ( <i>Synechocystis</i> sp.) <i>crtZ</i> ( <i>P. ananatis</i> )	CaMV35S	Tejido nectario	198 µg/g PS β-caroteno (0.85 veces)	596.5 µg/g PS total carotenoid (1.8 veces) 259.7 µg/g PS total cetocarotenoid	Gerjets <i>et al.</i> , 2007
	<i>crtO</i> ( <i>Synechocystis</i> sp.)	CaMV35S	Hoja	66.92 µg/g PS β-caroteno (0.65 veces)	429 µg/g PS total carotenoid (1.6 veces) 158.6 µg/g PS total cetocarotenoid	Zhu <i>et al.</i> , 2007a
	<i>crtW</i> y <i>crtZ</i> ( <i>Brevundimonas</i> sp)	rrn	Hoja	30 µg/g PS β-caroteno (0.02 veces) 5130 µg/g PS astaxantina	7380 µg/g PS total carotenoid (2.1 veces) 7290 µg/g PS total cetocarotenoid	Hasunuma <i>et al.</i> , 2008
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	<i>psyl</i> ( <i>L. esculentum</i> )	CaMV35S	Fruta	1175 µg/g PS β-caroteno (1 vez)	3615 µg/g PS carotenoides totales (1.14 veces)	Fray <i>et al.</i> , 1995
	<i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	CaMV35S	Fruta	520 µg/g PS β-caroteno (1.9 veces)	1372 µg/g PF carotenoides totales (0.48 veces)	Römer <i>et al.</i> , 2000

Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	<i>Lycb</i> ( <i>Arabidopsis</i> )	Pds	Fruta	570 µg/g PS β-caroteno (7.1 veces)  (asumiendo contenido de agua de 90%)	1090 µg/g PS carotenoides totales (1.7 veces)  (asumiendo contenido de agua de 90%)	Rosati <i>et al.</i> , 2000
	<i>Lycb</i> ( <i>Arabidopsis</i> ) <i>b-chy</i> ( <i>C. annuum</i> )	Pds	Fruta	630 µg/g PS β-caroteno (12 veces) (asumiendo contenido de agua de 90%)	1009 µg/g PS carotenoides totales (1.5 veces) (asumiendo contenido de agua de 90%)	Dharmapuri <i>et al.</i> , 2002
	<i>crtB</i> ( <i>P. ananatis</i> )	Polygalacturonase	Fruta	825 µg/g PS β-caroteno (2.5 veces)	5918 µg/g PS carotenoides totales (2 veces)	Fraser <i>et al.</i> , 2002
	<i>Lycb</i> ( <i>L. esculentum</i> )	CaMV35S	Fruta	2050 µg/g PS β-caroteno (46.6 veces) (asumiendo contenido de agua del 90%)	2152 µg/g PS carotenoides totales (2.3 veces) (asumiendo contenido de agua de 90%)	D'Ambrosio <i>et al.</i> , 2004
	<i>Dxs</i> ( <i>E. coli</i> )	Fibrillin	Fruta	700 µg/g PS β-caroteno (1.4 veces)	7200 µg/g PS carotenoides totales (1.5 veces)	Enfissi <i>et al.</i> , 2005
	<i>Det-2</i> ( <i>L. esculentum</i> , antisentido)	P119, 2A11 y TFM7 (fruit specific)	Fruta	130 µg/g PS β-caroteno (8 veces) (asumiendo contenido de agua de 90%)	838 µg/g PS carotenoides totales (2.3 veces) (asumiendo contenido de agua de 90%)	Davuluri <i>et al.</i> , 2005
	<i>CRY2</i> ( <i>L. esculentum</i> )	CaMV35S	Fruta	101 µg/g PS β-caroteno (1.3 veces)	1490 µg/g PS carotenoides totales (1.7 veces)	Giliberto <i>et al.</i> 2005
	<i>psy1</i> ( <i>L. esculentum</i> )	CaMV35S	Fruta	819 µg/g PS β-caroteno (1.4 veces)	2276 µg/g PS carotenoides totales (1.25 veces)	Fraser <i>et al.</i> , 2007
	<i>Fibrillen</i> ( <i>Capsicum</i> )	Fibrillin	Fruta	1500 µg/g PS β-caroteno (1.6 veces)	6500 µg/g PS carotenoides totales (2 veces)	Simkin <i>et al.</i> , 2007
	<i>crtY</i> ( <i>P. ananatis</i> )	aptI	Fruta	286.1 µg/g PS β-caroteno (4 veces)	3237.1 µg/g PS carotenoides totales (0.9 veces)	Wurbs <i>et al.</i> , 2007
	<i>Lycb</i> ( <i>N. pseudonarcissus</i> )	ribosomal RNA operon	Fruta	950 µg/g PS β-caroteno (5 veces)	1150 µg/g PS carotenoides totales (1.5 veces)	Apel y Bock, 2009
Trigo ( <i>Triticum</i> spp.)	<i>psy1</i> ( <i>Z. mays</i> ) <i>crtI</i> ( <i>P. ananatis</i> )	CaMV35S y 1Dx5	Semilla	—	4.96 µg/g PS carotenoides totales (5.25 veces)	Cong <i>et al.</i> , 2009
Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	<i>bkt1</i> ( <i>H. pluvialis</i> )	CaMV35S	Raíz	51.8 µg/g PF β-caroteno (0.3 veces) 91.6 µg/g PF astaxantina	345 µg/g PF carotenoides totales (0.87 veces) 236 µg/g PF cetocarotenoides totales	Jayaraj <i>et al.</i> , 2008

Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	<i>bkt1</i> ( <i>H. pluvialis</i> )	CaMV35S	Hoja	51.8 µg/g PF β-caroteno (1.3 veces) 34.7 µg/g PF astaxantina	216.7 µg/g PF carotenoides totales (1.15 veces) 52.6 µg/g PF cetocarotenoides totales	Jayaraj <i>et al.</i> , 2008
	<i>crtB</i> ( <i>P. ananatis</i> )	CaMV35S	Raíz	7.8 µg/g PF β-caroteno (asumiendo contenido de agua de 87%)	22.53 µg/g PF carotenoides totales en raíces (35 veces) (asumiendo contenido de agua de 87%)	Maass <i>et al.</i> , 2009
	<i>bkt1</i> ( <i>H. pluvialis</i> )	ibAGP1	Raíz	69 µg/g PF β-caroteno (2.5 veces) 1.14 µg/g PF astaxantina (asumiendo contenido de agua de 87%)	103.3 µg/g PF carotenoides totales (2.2 veces) (asumiendo contenido de agua de 87%)	Ahn <i>et al.</i> , 2012
	<i>Lcyb1</i> ( <i>Daucus carota</i> )	CaMV35S	Raíz	117 µg/g PF β-caroteno (2 veces) (asumiendo contenido de agua de 87%)	169 µg/g PF carotenoides totales (1.7 veces) (asumiendo contenido de agua de 87%)	Moreno <i>et al.</i> , 2013

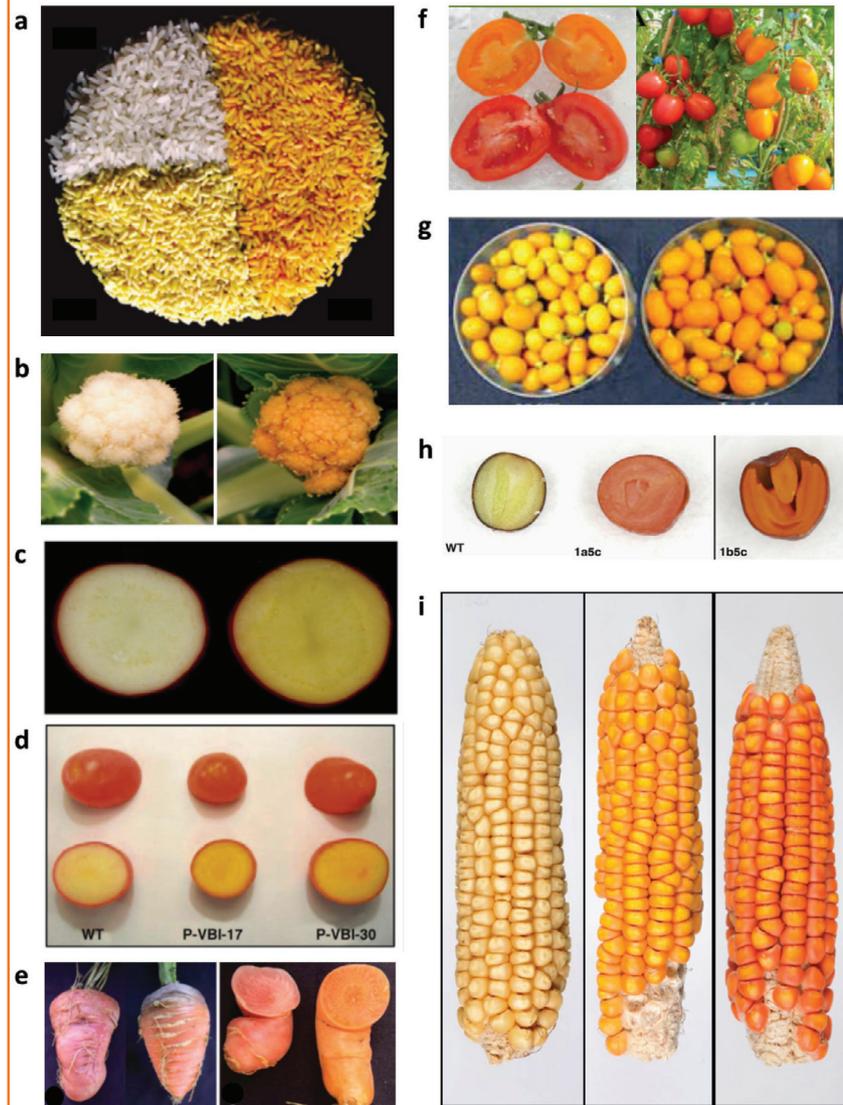
CRTZ-CRTW (Hasunuma *et al.*, 2008). Ralley *et al.* (2004) consiguieron la producción de cetocarotenoides en tabaco, que se acumularon en las hojas y en el tejido nectario de las flores, con niveles diez veces más elevados que el control, incluyendo astaxantina, cantaxantina y 4-cetozeaxantina, predominantemente en forma de ésteres (Ralley *et al.*, 2004). En otro estudio, Zhong *et al.* (2011) expresaron el gen *BKT* de *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrBKT*) en *Arabidopsis* resultando en una pigmentación anaranjada en las hojas debido a la acumulación de cantidades sustanciales de astaxantina (hasta 2mg/g en peso seco) con un incremento de 1.8 veces en el total de carotenoides. La eficiencia de *CrBKT* para la acumulación de astaxantina quedó demostrada y es mucho más alta que otros genes de *BKT*, incluyendo el proveniente de *Chlorella zofingiensis* (*CzBKT*) y de *Haematococcus pluvialis* (*HpBKT3*) (Zhong *et al.*, 2011). Maass *et al.* (2009) realizaron un estudio

donde sobreexpresaron un gen *PSY* de *Arabidopsis* en la misma planta y en zanahoria y observaron una diferencia de acumulación de carotenoides entre tejido fotosintético y no fotosintético. Las plántulas no fueron afectadas por el incremento de actividad *PSY* pero los callos no fotosintéticos y los tejidos de las raíces acumularon hasta cien veces la cantidad de carotenoides hallados en los tejidos de la variedad silvestre (hasta 1.8 mg/g de peso seco, predominantemente β-caroteno).

## El arroz dorado “Golden rice”

El proyecto de “*Golden Rice*”, o arroz dorado, fue la primera aplicación significativa de la ingeniería de carotenoides y fue concebido como una misión humanitaria para aliviar el déficit en vitamina A. Esta deficiencia, que sería evitable, provoca millones de casos de ceguera cada año en países

subdesarrollados (UNICEF, 2007). Un gran número de personas subsisten con monótonas dietas de arroz molido que contiene poca pro-vitamina A, este proyecto de investigación fue concebido para introducir una vía parcial de la ruta de biosíntesis de los carotenoides en el endospermo del arroz, para permitir así que los granos acumularan  $\beta$ -caroteno. La primera línea de *Golden Rice* contenía tres transgenes: *PSY1* y *LYCB* de narciso junto con *CRT1* bacteriano. Los granos acumularon hasta  $1.6\mu\text{g/g}$  en peso seco de  $\beta$ -caroteno (Ye *et al.*, 2000). Esto no era suficiente para proporcionar la ingestión diaria recomendada de provitamina A en una comida normal de arroz, por lo que se sustituyó *psy1* de narciso por su



**FIGURA 1.** Plantas modificadas para incrementar los niveles de carotenoides específicos: *a)* comparación de granos de arroz silvestre (blanco, arriba izquierda) con los del *Golden Rice 1* (abajo izquierda) y *Golden Rice 2* (derecha); *b)* cabezas de coliflor silvestres (izquierda) comparadas con una variedad mutante con el alelo dominante Or; *c)* tubérculos de patata silvestre (izquierda) comparados con la variedad transgénica expresando el transgen Or de coliflor; *d)* tubérculo de patata silvestre comparado con dos líneas transgénicas [los niveles más altos ( $>110\mu\text{g/g}$  en peso seco)], expresando los genes bacterianos *crtB*, *crtI* y *crtY*; *e)* zanahorias silvestres comparadas con la variedad transgénica roja con alto contenido en cetocarotenoides. El panel izquierdo muestra zanahorias sin cortar, el panel derecho muestra las mismas zanahorias cortadas transversalmente para mostrar la pulpa. En cada panel, la variedad silvestre está a la derecha y la variedad transgénica a la izquierda; *f)* el panel muestra el tomate silvestre Red Setter (abajo) comparado con una variedad transgénica naranja que acumula altos niveles de  $\beta$ -caroteno (arriba). El panel derecho muestra las mismas frutas creciendo en la vid; *g)* Kumquato de Hong Kong silvestre (izquierda) comparado con el fruto transgénico (derecha) expresando el gen *psy* de la naranja navelina Cara Cara, con niveles más altos de  $\beta$ -caroteno; *h)* semillas de colza silvestres (izquierda) comparadas con dos variedades transgénicas expresando siete transgenes carotenogénicos y acumulando niveles más altos de carotenoides; *i)* endospermo blanco de maíz M37W (izquierda) comparado con la línea transgénica (en el medio) acumulando altos niveles de  $\beta$ -caroteno ( $57\mu\text{g/g}$  en peso seco) y una línea transgénica (derecha) expresando cinco genes carotenogénicos (*psy1* de maíz, *crtW* y *crtI* de *Paracoccus*, y *lycb* y *bch* de *Gentiana lutea*) y acumulando cantidades significativas de cetocarotenoides ( $35\mu\text{g/g}$  en peso seco) y  $\beta$ -caroteno ( $34.81\mu\text{g/g}$  en peso seco).

ortólogo más activo de maíz para crear el “*Golden Rice 2*”, en el cual el contenido total de carotenoides en el endospermo se incrementó hasta 37 µg/g del peso seco (Paine *et al.*, 2005) (figura 1a). El siguiente paso científico para el uso de *Golden Rice* es la introgresión de los mismos caracteres en variedades locales adaptadas.

## Las patatas ámbar y las zanahorias naranja

Como se indicó antes, Lu *et al.* (2006) aislaron un clon correspondiente al alelo *Or* de un mutante de una variedad de coliflor naranja, que producía cabezas de coliflor ricas en carotenoides (figura 1b). El mismo fenotipo fue observado en patatas transgénicas expresando *Or* (López *et al.*, 2008) (figura 1c). Dos estrategias biotecnológicas adicionales se han combinado para mejorar los niveles de carotenoides en tubérculo de patata, una basada en la introducción y expresión de genes carotenogénicos y la otra basada en la supresión de enzimas endógenas que compiten por los precursores (figura 1d). Diretto *et al.*, (2007, 2007a) introdujeron los genes bacterianos *CRTB*, *CRTI* y *CRTY* bajo el control de promotores específicos de tubérculo y constitutivo, incrementando el nivel total de carotenoides hasta 114 µg/g en peso seco y de β-caroteno hasta 47 µg/g en peso seco. Estos autores también silenciaron los genes endógenos *LYCE* y *BCH*, mediante la eliminación de competición en el punto de la ramificación entre las vías de α- y β-caroteno y evitando el avance de la metabolización del β-caroteno (Diretto *et al.*, 2006, 2007a). En un estudio diferente, silenciando sólo el gen *BCH* elevó los niveles de β-caroteno a 3,31 µg/g en peso seco (Van Eck *et al.*, 2007). El silenciamiento del gen endógeno *zep* también incrementó los niveles totales de carotenoides, en especial zeaxantina, mientras que los niveles de violaxantina fueron reducidos (Romer *et al.*, 2002).

Aunque las raíces de las variedades de zanahoria naranja cultivada son fuentes ricas en α-, β-caroteno y luteína, no pueden producir cetocarotenoides. Sin embargo, recientemente la síntesis de cetocarotenoides ha sido obtenida en las raíces de zanahoria mediante la transformación con un gen β-caroteno cetolasa de alga fusionado a una secuencia guía para plástido, por lo que la proteína fue correctamente expresada en cloroplastos y cromoplastos (Jayaraj, Devlin y Punja, 2008). Esto resultó en la conversión de hasta 70% del contenido total de carotenoides en cetocarotenoides, los cuales se acumularon hasta 2.4 mg/g en peso seco en raíz, y en un cambio significativo de color hacia rojo (figura 1e). El experimento llevado a cabo por Maass *et al.* (2009) en *Arabidopsis* y zanahoria (véase más arriba) incrementó los niveles de carotenoides en las raíces de zanahoria hasta 858 µg/g en peso seco (Maass *et al.*, 2009).

## El tomate y otros frutos

Los tomates, durante su proceso de maduración, acumulan grandes cantidades de licopeno, pero poco β-caroteno. Varios investigadores han intentado sobreexpresar tanto el gen endógeno *LYCB* (D'Ambrosio *et al.*, 2004) como los genes heterólogos equivalentes (Rosati *et al.*, 2000; Dharmapuri *et al.*, 2002; Wurbs, Ruf y Bock, 2007; Apel y Bock, 2009) con la intención de aumentar β-caroteno y los productos inmediatos de *LYCB* en pasos posteriores, por ejemplo un incremento de 32 veces en el caso de D'Ambrosio *et al.* (2004) resultando en frutos de tomate de color anaranjado (figura 1f). Otra estrategia satisfactoria fue la supresión del gen endógeno *DET1*, que regula la fotomorfogénesis. La expresión de una construcción ARNi de *det1* en el cromoplasto de tomate incrementó los niveles de β-caroteno ocho veces, resultando en 130 µg/g en peso seco (Davuluri *et al.*, 2005). En un estudio reciente,

la expresión de un casete de dos genes unidos (*CrBKT* y *HpBCH*) en tomate resultó en la regulación *feedback* de la mayoría de los genes intrínsecos produciéndose una masiva acumulación de astaxantina libre en hojas (3.12 mg/g en peso seco) y astaxantina esterificada en el fruto (16.1 mg/g en peso seco). Un incremento total de 16 veces fue registrado en estas plantas, sin observarse ningún efecto perjudicial en su crecimiento y desarrollo (Huang *et al.*, 2013).

Algunos trabajos se han llevado a cabo también en cítricos. El gen *psy* de naranjas navelinas Cara Cara (*Citrus sinensis* Osbeck) ha sido sobreexpresado en quinoto de Hong Kong (*Fortunella hindsii* Swingle) (Zhang *et al.*, 2009), generando frutas con niveles 2.5 veces mayores de fitoeno (~71 µg/g en peso fresco) y también mayores niveles de licopeno, β-caroteno y β-criptoxantina, lo que produjo un cambio significativo en el color de los frutos, de amarillo a naranja (figura 1g). Los niveles de luteína y violaxantina en las frutas se mantuvieron prácticamente sin cambios.

## Colza y sojas enriquecidas con carotenoides

Los carotenoides son liposolubles, por lo que su consumo como un ingrediente minoritario mezclado con aceite vegetal incrementa su biodisponibilidad. La colza (*Brassica napus*) es un cultivo oleaginoso que produce grandes cantidades de carotenoides (18-26 µg/g en peso seco) y es considerada como una valiosa fuente nutritiva y un buen objetivo para la ingeniería genética. Shewmaker *et al.* (1999) incrementaron el contenido de carotenoides de la colza hasta 1180 µg/g en peso seco mediante la expresión de *CRTB*, un logro que fue mejorado por Ravello *et al.* (2003) utilizando el mismo gen (1341 µg/g en peso seco). La expresión combinada de *CRTB* y *CRTI* aumentó los niveles hasta 1412 µg/g en peso

seco, pero la posterior adición de *CRTY* redujo los niveles totales a 1229 µg/g en peso seco aunque aumento la cantidad relativa de β-caroteno (Ravello *et al.*, 2003) (figura 1h). Se han utilizado técnicas de ARNi para reducir la expresión de *lyce* en colza, incrementando los niveles de β-caroteno, zeaxantina y violaxantina tal como se esperaba, pero también los niveles de luteína, sugiriendo que el gen endógeno *lyce* puede que represente un paso limitante de la ruta metabólica (Yu *et al.*, 2008). Como se ha presentado antes, Fujisawa *et al.* (2009) introdujeron siete genes carotenogénicos en la colza incluyendo *CRTZ* y *CRTW*, los cuales están involucrados en la biosíntesis de cetocarotenoides. La suma total de carotenoides en las semillas fue de 412-657 µg/g en peso seco, un incremento de 30 veces sobre la variedad silvestre, incluyendo 60-190 µg/g de cetocarotenoides (Fujisawa *et al.*, 2009).

## El maíz multivitamínico

Varios grupos han utilizado técnicas biotecnológicas para el incremento de los niveles de carotenoides en maíz, por ejemplo, Aluru *et al.* (2008) introdujeron los genes bacterianos *CRTB* y *CRTI* bajo el control del promotor "super *γ-zein*" para asegurar una fuerte expresión específica de endospermo, incrementando el contenido total de carotenoides hasta 33.6 µg/g en peso seco. Un avance significativo fue alcanzado por Zhu *et al.* (2008) con el desarrollo de un sistema de transformación nuclear combinatorio diseñado para diseccionar y modificar la ruta biosintética de los carotenoides en maíz, utilizando la variedad M37W de endospermo blanco. El método consiste en transformar plantas con múltiples genes que codifican para diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y, por lo tanto, crean una serie de plantas transformadas aleatoriamente con perfiles metabólicos apropiados. El estudio piloto para esta técnica incluye la

introducción de cinco genes (el gen de maíz *PSY1*, los genes *LYCB* y *BCH* de *Gentiana lutea* y dos genes bacterianos *CRTI* y *CRTW*) bajo el control de promotores específicos de endospermo. Se utilizó la línea M37W como fondo genético que proporciona un fondo blanco, ya que el endospermo en esta variedad carece de todos los carotenoides. La regeneración de plantas portadoras de combinaciones aleatorias de genes resultó en un conjunto de gran diversidad metabólica compuesto por plantas con un amplio rango de perfiles de carotenoides, diferenciándose mediante colores fácilmente identificables fenotípicamente, desde el amarillo hasta el escarlata (figura 1i). Las plantas contenían elevados niveles de  $\beta$ -caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína y cetocarotenoides adicionales y comercialmente relevantes, como astaxantina y adonixantina (Zhu *et al.*, 2008).

Otro progreso en este área fue el desarrollo de plantas transgénicas de maíz transformadas con múltiples genes para permitir la modulación simultánea de tres rutas metabólicas, incrementando los niveles de tres vitaminas clave (vitamina A en forma de  $\beta$ -caroteno, ascorbato y folato) en el endospermo (Naqvi *et al.*, 2009). Esto se obtuvo mediante la transferencia de cuatro genes en la variedad de maíz M37W descrita anteriormente, resultando en un incremento de 169 veces en los niveles de  $\beta$ -caroteno (57 $\mu$ g/g en peso seco), un incremento de 6.1 veces en ascorbato (106.94  $\mu$ g/g en peso seco) y un incremento de dos veces en folato (200 $\mu$ g/g en peso seco).

## PERSPECTIVA

Aunque la búsqueda de nuevos genes carotenogénicos continúa, el estado actual de la investigación en carotenoides está restringido, de alguna manera, por su dependencia del

estudio de genes individuales. En otras rutas metabólicas, el objetivo se ha alejado de genes individuales o colecciones de genes hacia mecanismos regulatorios generales que pueden permitir controlar múltiples genes en la ruta simultáneamente. Pocos estudios se han realizado utilizando esta última estrategia en el campo de los carotenoides, aunque existen reguladores transcripcionales candidatos como CRY2, DDB1, HY5, DET1 y COP1 (Davuluri *et al.*, 2005; Giliberto *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Un método prometedor que ha sido utilizado en la ruta metabólica de los alcaloides y resultó en la identificación del factor de transcripción ORCA3, es el uso de activadores marcadores (activación *tagging*) y mutagénesis por T-DNA para identificar reguladores globales de genes carotenogénicos. En esta estrategia, líneas con inserciones aleatorias que contienen secuencias de T-DNA mutagénico, o secuencias de T-DNA que contienen fuertes promotores para activar genes adyacentes al lugar de inserción, podrían utilizarse para identificar inserciones que causan una amplia inducción o represión de la carotenogénesis.

Otra estrategia para la actual investigación en el metabolismo de los carotenoides es la identificación de residuos clave en enzimas sintetizadoras de cetocarotenoides que controlen la especificidad de sustrato. Estas enzimas son candidatas principales para la ingeniería de proteínas, ya que su afinidad precisa por diferentes sustratos y sus propiedades cinéticas juegan un papel importante en la producción de la amplia gama de compuestos que producen. Como ejemplo, una cetolasa de  $\beta$ -caroteno tipo CRTW aislada de *Sphingomonas* sp. DC18 que fue sometida a mutagénesis aleatoria localizada para incrementar su actividad en carotenoides hidroxilados. Como en otras áreas de la investigación en carotenoides, la habilidad para cribar con base en el color proporciona un método robusto para asegurar si alguna de las mutaciones

facilitó la producción de astaxantina. Seis mutaciones mostraron mejora en la producción de astaxantina sin afectar reacciones competitivas, pero cuando dos de éstas fueron combinadas en la misma enzima tuvieron un efecto aditivo que también redujo la producción de cantaxantina desde  $\beta$ -caroteno (Tao *et al.*, 2006).

Recientemente ha aparecido el concepto biología sintética, que describe el ensamblaje *de novo* de sistemas utilizando componentes previamente validados (Haseloff y Ajioka, 2009). En el contexto de ingeniería genética de plantas, la biología sintética utilizaría promotores, genes y otros elementos regulatorios específicos para crear circuitos genéticos ideales que faciliten la acumulación de metabolitos particulares. El concepto de biología sintética utiliza modelos matemáticos para predecir y comprobar el comportamiento del sistema resultante y puede considerarse como el siguiente paso para la ingeniería metabólica, porque elimina cualquier dependencia sobre secuencias endógenas y permite el diseño de circuitos genéticos funcionales. Hasta el momento, la

mayor parte del trabajo en biología sintética está relacionado con microorganismos aunque existen algunos ejemplos en plantas, principalmente relacionados con rutas de señalización y desarrollo, cultivos biofortificados (Naqvi *et al.*, 2009) y desarrollo de fitodetectores (Zurbriggen, Moor y Weber, 2012). Si bien existen algunos factores limitantes, como la capacidad de los métodos actuales para ensamblar complejas moléculas de ADN que codifiquen para múltiples componentes genéticos en sistemas preestablecidos (Weber *et al.*, 2011), el uso de la biología sintética en desarrollo y metabolismo es importante, no sólo porque controla la capacidad metabólica de una célula, sino porque los siguientes pasos a un nivel superior en términos de organización y uso de promotores particulares y genes que controlen procesos de desarrollo para generar nuevos tejidos, en los cuales las células tienen funciones biosintéticas o almacenadoras especializadas para acumular productos de interés en órganos particulares. Este enfoque permitirá lograr objetivos impensables por ingeniería genética convencional (Zorrilla-López *et al.*, 2013).

## AGRADECIMIENTOS

La investigación del grupo en la Universitat de Lleida está financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto núm. BIO2011-23324, BIO2011-22525, BIO2012-35359, PIM2010PKB-0074), European Research Council IDEAS Advanced Grant Program (BIOFORCE) (a PC); ERC-2013-PoC 619161 (a PC); European Cooperation in Science and Technology (COST Action FA0804), y RecerCaixa. G. Farré tiene beca MC (328529).

## REFERENCIAS

- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K. Rodermel, S. 2008. *Journal of Experimental Botany* 59: 3551-3562.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M., Martín, A. 1999. *Plant Breeding* 117: 187-189.
- Álvarez, V., Rodríguez-Saiz, M., De la Fuente, J.L., Gudina, E.J., Godio, R.P., Martín, J.F. Barredo, J.L. 2006. *Fungal Genetics and Biology* 43: 261-272.
- Ampomah-Dwamena, C., McGhie, T., Wibisono, R., Montefiori, M., Hellens, R.P. Allan, A.C. 2009. *Journal of Experimental Botany* 60: 3765-3779.
- Apel, W. y Bock, R. 2009. *Plant Physiology* 151: 59-66.
- Atienza, S.G., Ramírez, C.M., Hernández, P. Martín, A. 2004. *Plant Breeding* 123: 303-304.
- Bai, C., Twyman, R., Farré, G., Sanahuja, G., Christou, P., Capell, T. Zhu, C. 2011. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47: 205-221.
- Bartley, G.E. Scolnik, P.A. 1995. *The Plant Cell* 7: 1027-1038.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., Tanksley, S.D. 1988. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Bramley, P.M. 2002. *Journal of Experimental Botany* 53: 2107-2113.
- Brown, C.R., Culley, D., Yang, C., Durst, R., Wrolstad, R. 2005. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 130: 174-180.
- Burkhardt, P.K., Beyer, P., Wunn, J., Kloti, A., Armstrong, G.A., Schledz, M., Von Lintig, J., Potrykus, I. 1997. *The Plant Journal* 11: 1071-1078.
- Chander, S., Guo, Y.Q., Yang, X.H., Zhang, J., Lu, X.Q., Yan, J.B., Song, T.M., Rocheford, T.R., Li, J.S. 2008. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 223-233.
- Clarke, F.R., Clarke, J.M., McCaig, T.N., Knox, R.E., DePauw, R.M. 2006. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 133-141.
- Cuevas, H.E., Staub, J.E., Simon, P.W., Zalapa, J.E., McCreight, J.D. 2008. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1345-1359.
- Cunningham, F.X.Jr. y Gantt, E. 2007. *Photosynthesis Research* 245-259.
- D'Ambrosio, C., Giorio, G., Marino, I., Merendino, A., Petrozza, A., Salfi, L., Stigliani, A.L., Cellini, F. 2004. *Plant Science* 166: 207-214.
- Davuluri, G.R., Van Tuinen, A., Fraser, P.D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P.M., Pennings, H.M., Bowler, C. 2005. *Nature Biotechnology* 23: 890-895.
- Deli, J., Molnar, P., Matus, Z., Toth, G. 2001. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 1517-1523.

## REFERENCIAS

- Demmig-Adams, B. y Adams, W.W. 1996. *Trends in Plant Science* 1: 21-26.
- Dharmapuri, S., Rosati, C., Pallara, P., Aquilani, R., Bouvier, F., Camara, B., Giuliano, G. 2002. *FEBS Letters* 519: 30-34.
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., Giuliano, G. 2006. *BMC Plant Biology* 6: 13-24.
- Diretto, G., Al-Babili, S., Tavazza, R., Papacchioli, V., Beyer, P., Giuliano, G. 2007. *PLoS One* 2: e350.
- Diretto, G., Welsch, R., Tavazza, R., Mourgues, F., Pizzichini, D., Beyer, P., Giuliano, G. 2007a. *BMC Plant Biology* 7: 11-19.
- Enfissi, E.M., Fraser, P.D., Ois, L.M., Boronat, A., Schuch, W., Bramley, P.M. 2005. *Plant Biotechnology Journal* 3: 17-27.
- Estevez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., León, P. 2001. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 22901-22909.
- Fang, J., Chai, C., Qian, Q., Li, C., Tang, J., Sun, L., Huang, Z., Guo, X., Sun, C., Liu, M., Zhang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Lu, C., Han, B., Chen, F., Cheng, Z., Chu, C. 2008. *Plant Journal* 54: 177-189.
- FAO. 2003. The State of World Food Insecurity. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/j0083e/j0083e00.HTM>
- Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., Christou, P. 2010. *Plant Science* 179: 28-48.
- Farré, G., Bai, C., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., Zhu, C. 2011. *Trends in Plant Science* 16: 532-540.
- Farré, G., Rivera, S.M., Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Canela, R., Naqvi, S., Sandmann, G. Capell, T., Zhu, C., Christou, P. 2013. *The Plant Journal* 75: 441-455.
- Farré, G., Blancquaert, D., Capell, T., Van Der Straeten, D., Christou, P., Zhu, C. 2014. *Annual Review in Plant Biology* 65: 87-223.
- Fernandes Santos, C.A. y Simon, P.W. 2002. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 122-129.
- Fernandes Santos, C.A., Senalik, D., Simon, P.W. 2005. *Genetics and Molecular Biology* 28: 287-293.
- Franco, A.C., Matsubara, S., Orthen, B. 2007. *Tree Physiology* 27: 717-725.
- Fraser, P.D., Romer, S., Shipton, C.A., Mills, P.B., Kiano, J.K, Misawa, N., Drake, R.G., Schuch, W., Bramley, P.M. 2002. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 1092-1097.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2004. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.

## REFERENCIAS

- Fraser, P.D., Enfissi, M.A., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C., Bramley, P.M. 2007. *The Plant Cell* 19: 3194-3211.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M.A., Bramley, P.M. 2009. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 196-204.
- Fray, R.G. and Grierson, D. 1993. *Plant Molecular Biology* 22: 589-602.
- Fujisawa, M., Takita, E., Harada, H., Sakurai, N., Suzuki, H., Ohyama, K., Shibata, D., Misawa, N. 2009. *Journal on Experimental Botany* 60: 1319-1332.
- Gallagher, C.E., Matthews, P.D., Li, F., Wurtzel, E.T. 2004. *Plant Physiology* 135: 1776-1783.
- Gerjets, T., Sandmann, M., Zhu, C., Sandmann, G. 2007. *Biotechnology Journal* 2: 1263-1269.
- Gilliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J.L., Fraser, P.D., Bramley, P.M., Fiore, A., Tavazza, M., Giuliano, G. 2005. *Plant Physiology* 137: 199-208.
- Gómez-Roldán, V., Férmas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C., Rochange, S.F. 2008. *Nature* 455: 189-194.
- Goodwin, T.W. y Britton, G. 1988. "Distribution and analysis of carotenoids", en: T.W Goodwin (ed.), *Plant Pigments*, Londres, Academic Press, pp. 61-132.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olalola, M. 2003. *Trends in Biotechnology* 21: 210-216.
- Ha, S.H., Kim, J.B., Park, J.S., Lee, S.W., Cho, K.J. 2007. *Journal of Experimental Botany* 58: 3135-3144.
- Harjes, C.E., Rocheford, T.R., Bai, L., Brutnell, T.P., Kandianis, C.B., Sowinski, S.G., Stapleton, A.E., Vallabhaneni, R., Williams, M., Wurtzel, E.T., Yan, J., Buckler, E.S. 2008. *Science* 319: 330-333.
- Harrison, E.H. 2005. *A. Annual Review of Nutrition* 25: 7-103.
- Haseloff, J. y Ajioka, J. 2009. *J R Soc interface* 6: S389-S391
- Hasunuma, T., Miyazawa, S., Yoshimura, S., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., Shindo, K., Choi, S.K., Misawa, N., Miyake, C. 2008. *Plant Journal* 55: 857-868.
- Huang, J.C., Wang, Y., Sandmann, G., Chen, F. 2006. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 473-479.
- Huang, J., Zhong, Y., Sandmann, G., Liu, J., Chen, F. 2012. *Planta* 236: 691-99.
- Huang, J., Zhong, Y., Liu, J., Sandmann, G., Chen, F. 2013. *Metabolic Engineering* 17: 59-67.
- Huh, J.H. , Kang, B.C., Nahm, S.H., Kim, S., Ha, K.S., Lee, M.H., Kim, B.D. 2001. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 524-530.

## REFERENCIAS

- Jayaraj, J., Devlin, R., Punja, Z. 2008. *Transgenic Reseserch* 17: 489-501.
- Just, B.J., Santos, C.A., Yandell, B.S., Simon, P.W. 2009. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1155-1169.
- Kean, E.G., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2007. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 2619-2626.
- Kim, M.J., Kim, J.W., Kim, H.J., Pak, J.H., Lee, J.H., Kim, D.H., Choi, H.K., Jung, H.W., Lee, J.D., Chung, Y.S., Ha, S.H. 2012. *PLoS ONE* 7: e48287.
- Krinsky, N., Landrum, J., Bone, A. 2003. *Annual Review of Nutrition* 23: 171-201.
- Kurilich, A.C. y Juvik, J.A. 1999. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 1948-1955.
- Landrum, J., Bone, R. 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 28-40.
- Lee, J.H., Kim, Y.T. 2006. *Biotechnology Letters* 28: 1167-1173.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., Wurtzel E.T. 2008. *Plant Physiology* 146: 1334-1346.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Wurtzel E.T. 2008. *Plant Physiology* 147: 1333-1345.
- Li, L., Paolillo, D.J., Parthasarathy, M.V., Dimuzio, E.M., Garvin, D.F. 2001. *The Plant Journal* 26: 59-67.
- Lindgren, L.O., Stalberg, K.G., Hoglund, A.S. 2003. *Plant Physiology* 132: 778-785.
- Liu, Q., Xu, J., Liu, Y., Zhao, X., Deng, X., Guo, L., Gu, J. 2007. *Journal of Experimental Botany* 58: 4161-4171.
- Liu, Y.S., Gur, A., Ronen, G., Causse, M., Damidaux, R., Buret, M., Hirschberg, J., Zamir, D. 2003. *Plant Biotechnology Journal* 1: 195-207.
- Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C. and Giovannoni, J. 2004. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 9897-9902.
- López, A.B., Van Eck, J., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., O'Neill, J., Li, L. 2008. *Journal of Experimental Botany* 59: 213-223.
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., López, A.B., O'Halloran, D.M., Cosman, K.M., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Vrebalov, J., Kochian, L.V., Kupper, H., Earle, E.D., Cao, J., Li, L. 2006. *Plant Cell* 18: 3594-3605.
- Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P., Welsch, R. 2009. *PLoS One* 4: e6373.
- Marano, M.R., Serra, E.C., Orellano, E.G., Carrillo, N. 1993. *Plant Science* 94: 1-17.

## REFERENCIAS

- McNulty, H.P., Byun, J., Lockwood, S.F., Jacob, R.F., Mason, R.P. 2007. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 167-174.
- Misawa, M., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K. 1990. *Journal of Bacteriology* 172: 6704-6712.
- Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H. 1991. *Applied Environmental Microbiology* 57: 1847-1849.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W. 1995. *Journal of Bacteriology* 177: 6575-6584.
- Misawa, N., Shimada, H. 1998. *Journal of Biotechnology* 59: 169-181.
- Moreno, J.C., Pizarro, L., Fuentes, P., Handford, M., Cifuentes, V., Stange, C. 2013. *PLoS ONE* 8: e58144.
- Morris, W.L., Ducreux, L., Griffiths, D.W., Stewart, D., Davies, H.V., Taylor, M.A. 2004. *Journal of Experimental Botany* 55: 975-982.
- Morris, W.L., Ducreux, L.J., Fraser, P.D., Millam, S., Taylor, M.A. 2006. *Metabolic Engineering* 8: 253-263.
- Naqvi, S., Zhu, C., Farré, G., Ramessar, K., Bassie, L., Breitenbach, J., Perez Conesa, D., Ros, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. 2009. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 106: 7762-7767.
- Naqvi, S., Zhu, C., Farré, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. 2011. *Plant Biotechnology Journal* 9: 384-93.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Kamiya, Y. 2000. *Plant Physiology* 122: 1045-1056.
- Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggar, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A.L., Drake, R. 2005. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D., Pogson, B.J. 2002. *The Plant Cell* 14: 321-332.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J.K., Davis, A.R., Roberts, W. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2593-2597.
- Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Bjorkman, O., DellaPenna, D. 1998. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 13324-13329.
- Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R., Clarke, J.M. 2007. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 525-537.
- Ralley, L., Enfissi, E.M., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M., Fraser, P.D. 2004. *Plant Journal* 39: 477-486.
- Randolph, L.F., Hand, D.B. 1940. *Journal of Agricultural Research* 60: 51-64.
- Rao A. y Rao, L. 2007. *Pharmacological Research* 55: 207-216.

## REFERENCIAS

- Ravanello, M.P., Ke, D., Álvarez, J., Huang, B., Shewmaker, C.K. 2003. *Metabolic Engineering* 5: 255-263.
- Romer, S., Fraser, P.D., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M. 2000. *Nature Biotechnology* 18: 666-669.
- Romer, S., Lubeck, J., Kauder, F., Steiger, S., Adomat, C., Sandmann, G. 2002. *Metabolic Engineering* 4: 263-272.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. *The Plant Journal* 17: 341-351.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. 2000. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 97: 11102-11107.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., F. Bouvier, B. Camara., G. Giuliano. 2000. *Plant Journal* 24: 413-419.
- Salas Fernandez, M.G., Hamblin, M.T., Li, L., Rooney, W.L., Tuinstra, M.R., Kresovich, S. 2008. *Crop Science* 48: 1732-1743.
- Sandmann, G., Römer, S., Fraser, P.D. 2006. *Metabolic Engineering* 8: 291-302.
- Schaub, P., Al-Babili, S., Drake, R., Beyer, P. 2005. *Plant Physiology* 138: 441-450.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D., McCarty, D.R. 1997. *Science* 20: 1872-1874.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. 1999. *Plant Journal* 20: 401-412.
- Simkin, A.J., Gaffe, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Kuntz, M. 2007. *Phytochemistry* 68: 1545-1556.
- Singh, M., Lewis, P.E., Hardeman, K., Bai, L., Rose, J.K., Mazourek, M., Chomet, P., Brutnell, T.P. 2003. *Plant Cell* 15: 874-884.
- Stalberg, K., Lindgren, O., Ek, B., Hoglund, A.S. 2003. *The Plant Journal* 36: 771-779.
- Suzuki, S., Nishihara, M., Nakatsuka, T., Misawa, N., Ogiwara, I., Yamamura, S. 2007. *Plant Cell Reports* 26: 951-959.
- Tao, L., Wilczek, J., Odom, J.M., Cheng, Q. 2006. *Metabolic Engineering* 2006: 523-531.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J., Yamaguchi, S. 2008. *Nature* 455: 195-200.
- UNICEF, Promotion and Protection of the Rights of Children. 2007. Disponible en: [http://www.unicef.org/worldfitforchildren/files/SGs\\_report\\_WFFC\\_2007.pdf](http://www.unicef.org/worldfitforchildren/files/SGs_report_WFFC_2007.pdf)

## REFERENCIAS

- Vallabhaneni, R., Gallagher, C.E., Licciardello, N., Cuttriss, A.J., Quinlan, R.F., Wurtzel, E.T. 2009. *Plant Physiology* 150: 1635-1645.
- Vallabhaneni, R., Wurtzel, E.T. 2009. *Plant Physiology* 150: 562-572.
- Van Eck, J., Conlin, B., Garvin, D.F., Mason, H., Navarre, D.A., Brown, C.R. 2007. *American Journal of Potato Reserch* 84: 331-342.
- Verdoes, J.C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M., van Ooyen, A.J. 2003. *Applied Environmental Microbiology* 69: 3728-3738.
- Visser, H., Van Ooyen, A.J., Verdoes, J.C. 2003. *FEMS Yeast Research* 4: 221-231.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., Marillonnet, S. 2011. *PLoS One* 6: e16765.
- Wei, S., Li, X., Gruber, M.Y., Li, R., Zhou, R., Zebarjadi, A., Hannoufa, A. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5326-5333.
- Wei, S., Yu, B., Gruber, M.Y., Khachatourians, G.G., Hehedus, D.D., Hannoufa, A., 2010. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 9572-9578.
- Welsch, R., Arango, J., Bar, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltran, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Thorne, J., Beyer, P. 2010. *The Plant Cell* 22: 3348-3356.
- Wong, J.C., Lambert, R.J., Wurtzel, E.T., Rocheford, T.R. 2004. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 349-359.
- Wurbs, D., Ruf, S., Bock, R. 2007. *Plant Journal* 49: 276-288.
- Wurtzel, E.T., Luo, R.B., Yatou O.2001 *Journal of Experimental Botany* 52: 161-166.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klott, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. 2000. *Science* 287: 303-305.
- Yokoyama, A., Shizuri, Y., Misawa, N. 1998. *Tetrahedron Letters* 39: 3709-3712.
- Yu, B., Lydiate, D.J., Young, L.W., Schafer, U.A., Hannoufa, A. 2008. *Transgenic Reserch* 17: 573-585.
- Zhang, J., Tao, N., Xu, Q., Zhou, W., Cao, H., Xu, J., X. Deng. 2009. *Plant Cell Reports* 11: 1737-1746.
- Zhong, Y.J., Huang, J.C., Liu, J., Li, Y., Jiang, Y., Xu, Z.F., Sandmann, G., Chen, F. 2011. *Journal on Experimental Botany* 62: 3659-3669.
- Zhu, C., Naqvi, S., Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Capell, T., Christou, P. 2007. *Trends in Plant Science* 12: 548-555.
- Zhu, C., Gerjets, T., Sandmann, G. 2007a. *Transgenic Research* 16: 813-821.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., Capell, T. 2008. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 105: 18232-18237.

## REFERENCIAS

- Zhu, C., Naqvi, S., Capell, T., aChristou, P. 2009. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 182-190.
- Zhu, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Arjo, G., Berman, J., Zorrilla-López, U., Banakar, R., Bai, C., Pérez-Massot, E., Bassie, L., Capell, T., P. Christou. 2013. *Plant Biotechnology Journal* 11: 129-41.
- Zhu, X.F., Suzuki, K., Okada, K., Tanaka, K., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Matsuda, K. 1997. *Plant Cell Physiology* 38: 357-361.
- Zorrilla-López, U., Masip, G., Arjó, G., Bai, C., Banakar, R., Bassie, L., Berman, J., Farré, G., Miralpeix, B., Pérez-Massot, E., Sabalza, M., Sanahuja, G., Vamvaka, E., Twyman, R.M., Christou, P., Zhu, C., Capell. T. 2013. *Int J Dev Biol* 57: 565-576.
- Zurbriggen, M.D., Moor, A., Weber, E. 2012 *Journal of Biotechnology* 160: 80-90.

## CAPÍTULO 17

# INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES, AGRONÓMICOS, GENÉTICOS Y FISIOLÓGICOS EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN FRUTAS Y HORTALIZAS

Gloria F. Saavedra y Eliana M. Maldonado



## INTRODUCCIÓN

La percepción de calidad en la industria de frutas y hortalizas comprende tanto atributos perceptibles por los sentidos, como color, apariencia, sabor, textura, y como otros que no lo son (Bruhn, 2007).

La determinación de la calidad en frutas y hortalizas ha ido evolucionando según las exigencias del mercado, por lo que en muchas ocasiones se prefieren las mediciones instrumentales sobre las evaluaciones sensoriales utilizadas antes, ya que las primeras reducen la variabilidad entre los individuos y son más precisas. No obstante, como queda claro en el capítulo 7, los análisis sensoriales son insustituibles para algunos fines. En la etapa de pre cosecha se inicia la preservación de la calidad de frutas y hortalizas, desde la selección de semillas, pasando por las prácticas de cultivo y de riego, para finalmente llegar con éxito a la etapa de cosecha. Sin embargo, las

investigaciones que se han realizado sobre la influencia de los factores precosecha en la calidad postcosecha de las distintas frutas y hortalizas son muy escasas (Crisosto y Mitchell, 2007).

En general, la composición y el contenido de carotenoides en plantas es un tema muy complejo. En un mismo fruto u hortaliza los niveles de carotenoides dependen de diversos factores externos interrelacionados entre sí. Entre ellos se encuentran los ambientales, como la temperatura, la luz, las precipitaciones, el viento, la naturaleza del suelo (acidez, salinidad, etc.) y contenido de dióxido de carbono en el ambiente, entre otros; factores de cultivo, donde intervienen principalmente la fertilización, el riego, la poda y el tratamiento fitosanitario; factores genéticos que dependen sobre todo de la especie y variedad y, finalmente, factores fisiológicos, como el grado de madurez en la etapa de la recolección y el almacenamiento postcosecha (Romojaro, Martínez-Madrid y Pretel, 2006).

## FACTORES AMBIENTALES

Suelen tener un gran efecto en la calidad y el valor nutricional de la mayoría de los productos agrarios, sin embargo son los más difíciles de controlar. Especialmente la temperatura y la intensidad de luz tienen una fuerte influencia sobre la calidad nutricional de las frutas y hortalizas (Kader, 2007).

### Clima

Es uno de los factores medioambientales que juega un papel muy importante en la agricultura. Por ejemplo, el clima tiene que ver con las precipitaciones, que al caer sobre el suelo permiten la absorción de los nutrientes disueltos en el agua

por parte de las plantas. Las precipitaciones están a su vez influidas por el viento o corrientes de aire, que llevan las nubes cargadas de agua de un lugar a otro.

La temperatura es otro factor climático de gran importancia que interviene directamente en procesos físicos, fisiológicos y bioquímicos. Si son elevadas y están asociadas a una radiación solar intensa, pueden causar muchas variaciones, sobre todo en la calidad del fruto, más aún si esto sucede en la etapa de precosecha. En este sentido pueden causar alteraciones de color y dañar en muchos casos las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos, pudiendo producir además la inhibición de la síntesis de pigmentos o degradación de los ya existentes cuando el tiempo de exposición es largo. Por otro lado, la exposición a bajas temperaturas puede causar daño en el aparato fotosintético, inhibir la síntesis o degradación de proteínas, dañar la membrana tilacoide y reducir la capacidad de transferencia de electrones de la planta (Cseke *et al.*, 2006; Lefsrud *et al.*, 2005).

La maduración también se ve afectada por la temperatura, que puede inhibirla o acelerarla, así como incrementar la desecación por pérdida acelerada de agua, originando alteraciones tanto en el exterior como en el interior del fruto (Romojaro, Martínez-Madrid y Pretel, 2006; Sams, 1999).

Como ya se ha comentado en el capítulo 12, el proceso de degradación de clorofilas y la acumulación de carotenoides en cítricos está relacionado con los cambios de temperatura. Así, por ejemplo, el color de la piel de los cítricos cultivados en regiones tropicales o subtropicales es más verde o pobremente coloreado en comparación con regiones donde ocurren cambios bruscos de temperatura entre el día y la noche (Dhuique-Mayer *et al.*, 2009).

Por otra parte, parece ser que el color del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) se desarrolla mejor entre 12 y 21°C, ya que temperaturas menores de 10°C o mayores de 30°C pueden inhibir el proceso de maduración y por consiguiente el desarrollo de licopeno. Las variaciones bruscas de temperatura entre el día y la noche disminuyen el contenido de licopeno pero no de  $\beta$ -caroteno (Krumbein, Schwarz y Klaring, 2006).

En las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y col rizada (*Brassica oleracea* L.) se ha observado que la concentración de luteína y  $\beta$ -caroteno aumenta con el incremento de la temperatura de 15 a 30 °C (Lefsrud *et al.*, 2005).

La luz puede ser un factor de gran estrés en plantas, y puede causar fotoinhibición y fotooxidación en los tejidos fotosintéticos. Asimismo es también uno de los principales factores en la regulación de la biosíntesis de carotenoides. Es bien conocido que existe una correlación clara entre la disipación del exceso de energía de excitación y la formación de zeaxantina a partir de violaxantina en los complejos recolectores de luz de plantas, mediante el proceso conocido como ciclo de las xantofilas. En condiciones de luz débil, violaxantina es un pigmento accesorio eficiente; mientras que bajo condiciones de luz fuerte, zeaxantina es un eficiente fotoprotector (Othman, Zaifuddin y Hassan, 2014).

Estudios del efecto de la luz solar en el contenido de carotenoides en uvas (*Vitis vinífera*) demostraron que los niveles de este pigmento fueron mayores en las protegidas de la exposición a la luz solar directa en comparación con aquellas expuestas directamente a la radiación solar; sin embargo, esta diferencia fue menos evidente durante la última etapa de maduración. Mientras que en cultivos de manzanas

(*Malus domestica* B.) se observó el efecto contrario, ya que la exposición de los frutos a la radiación solar favorece la síntesis de carotenoides (Oliveira *et al.*, 2004; Merzlyak y Chivkunova, 2000).

## Suelo

Como principal medio de producción del sector agropecuario, el suelo presenta una serie de particularidades. Al ser la capa cultivable que constituye el soporte natural donde las plantas desarrollan sus raíces, almacenan los nutrientes y el agua que necesitan para su crecimiento, está sujeto a una serie de procesos de degradación y amenazas: entre ellas se encuentran la erosión, pérdida de materia orgánica, contaminación local y difusa, sellado, compactación, reducción de la diversidad biológica, salinización, inundaciones y deslizamientos de tierras.

Otras de sus características son la diferencia en calidad, rendimiento y ubicación geográfica, las cuales ejercen una gran influencia sobre los resultados de producción. La fertilidad del suelo depende de la cantidad de elementos nutrientes que posee, de la humedad, de su estructura, la topografía y la edad. Aunque no existen muchos datos sobre la influencia directa de tipos de suelos en el contenido de carotenoides en frutas y hortalizas, estudios realizados en el aceite de oliva indican diferencias evidentes en la composición de los pigmentos del aceite en función de la zona de origen. En los aceites griegos la relación luteína/ $\beta$ -caroteno y pigmentos clorofílicos/pigmentos carotenoides es inferior a la unidad mientras que la relación luteína/ $\beta$ -caroteno oscila entre 2 y 11 (Psomiadou y Tsimidou, 2001). En los aceites españoles el rango varía entre 1.3 y 5.1 para la relación luteína/ $\beta$ -caroteno y se mantiene próxima a la unidad en la relación pigmentos

clorofilicos/pigmentos carotenoides (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996).

En relación con estos estudios es importante tener en cuenta que el contenido de carotenoides depende de muchos otros factores, como se explica en este capítulo y que, en el caso del aceite de oliva, depende en gran medida de las técnicas empleadas para su producción.

## Dióxido de carbono en el ambiente

El continuo crecimiento de la población mundial ha llevado a un incremento en la emisión de gases invernadero, especialmente CO<sub>2</sub>, procedentes de la combustión de los combustibles fósiles, de los procesos industriales y la deforestación (Balouchi *et al.*, 2009). Los niveles de CO<sub>2</sub> varían en función del entorno y por lo tanto esta variación produce cambios en los procesos biosintéticos.

En vegetales cultivados en invernadero el suministro de CO<sub>2</sub> tiene un efecto positivo en la fotosíntesis y el rendimiento del cultivo. También puede influir directamente en la calidad de la fruta. En cultivos de tomate el incremento en la concentración de CO<sub>2</sub> puede mitigar el efecto negativo causado por salinidad elevada sobre el rendimiento y mejorar levemente la calidad en términos de sólidos solubles, glucosa y acidez. En cuanto al efecto sobre el contenido de carotenoides, investigaciones realizadas en dos variedades de tomate, cultivados en invernadero a dos niveles de CO<sub>2</sub> y conductividad eléctrica, reportaron que tanto el incremento en el suministro de CO<sub>2</sub> como la salinidad no afectaron el contenido de carotenoides (Krumbein, Schwars y Klaring, 2006).

## FACTORES AGRONÓMICOS

Para el desarrollo de la planta se requiere un aporte de nutrientes adecuado y equilibrado, lo cual incidirá sobre la calidad del fruto por su característica de órgano sumidero. El contenido de un nutriente, así como el equilibrio entre dos o más puede afectar el crecimiento y el estado fisiológico del fruto, y puede originar alteraciones tanto por deficiencia como por exceso.

### Riego

La aplicación del agua de riego es otro factor que condiciona la calidad de las frutas y hortalizas tanto en el momento de la recolección como durante la conservación postcosecha. La importancia de la disponibilidad de agua y de la humedad relativa ambiental está condicionada por los gradientes de potencial hídrico entre el tejido vegetal y el aire, ya que si la planta pierde agua se produce un flujo de la misma hacia las hojas, disminuyendo el aporte hídrico y de nutrientes al fruto.

En plantas terrestres, el estrés causado por inundación del sistema radicular en periodos variables reduce la disponibilidad de oxígeno en las raíces, lo que provoca atrofia de los brotes durante el crecimiento, disminución en la síntesis de clorofilas en las hojas e incremento en la producción de etileno (Cseke *et al.*, 2006).

La sequía, condiciones de hipersalinidad, bajas temperaturas y pérdida transitoria de la turgencia a medio día son los factores abióticos asociados a la insuficiencia de agua. Bajo condiciones de deficiencia hídrica, las raíces producen ácido abscísico (ABA), mediador esencial en los procesos de respuesta frente a los estímulos ambientales adversos y

relacionado con el metabolismo de carotenoides (Othman, Zaifuddin y Hassan, 2014).

El estudio del efecto de la aplicación de dos estrategias de riego sobre la planta de olivo (*Olea europaea* L.), riego deficitario controlado y riego lineal, mostraron que la aplicación de dosis crecientes de agua de riego, aunque no afecta los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva, tiene un claro efecto sobre su contenido de pigmentos fotosintéticos y polifenoles. Los aceites pertenecientes a los tratamientos con mayor tasa de riego mostraron un contenido de pigmentos carotenoides marcadamente inferior que los de tratamientos con mayor déficit hídrico. Las modificaciones del color de los aceites al aplicar dosis de agua crecientes al olivo mostraron una tendencia semejante a la observada en el contenido de pigmentos carotenoides y clorofílicos (Tovar de Dios, 2001).

En diferentes variedades de tomate se observó que la escasez de agua podría producir un aumento en el contenido de carotenoides (Pernice *et al.*, 2010; Dumas *et al.*, 2003). Asimismo, al ser sometidas a tratamientos con aguas salinizadas, mostraron un incremento gradual en las concentraciones de carotenoides totales y licopeno desde los niveles más bajos de conductividad eléctrica 0.5 dS/m hasta 4.4 dS/m; mientras que por encima de este valor su concentración disminuye (Goykovic Cortés y Saavedra del Real, 2007).

En la lechuga romana (*Lactuca sativa* L.), el riego prolongado con aguas salinizadas de baja concentración da como resultado un incremento en el contenido de carotenoides sin afectar el balance entre rendimiento y calidad visual (Kim *et al.*, 2008).

## Fertilización

La influencia de los factores nutricionales de un cultivo no siempre se da de la misma forma. Eso se debe a que el comportamiento de las concentraciones de nutrientes en la planta no es lineal, ni responde a un solo factor, sino que varía en función de los distintos nutrientes, así como de variables de manejo del cultivo y ambientales. Al aportar un nutriente que se encuentra en un rango deficiente en la planta, se obtendrá una respuesta distinta de la que se obtiene si ese mismo elemento se encuentra por encima del rango adecuado. Sin embargo, concentraciones muy altas pueden ser perjudiciales y causar una disminución en la producción. Por lo tanto, es importante mantener un equilibrio entre los distintos nutrientes de la planta. De lo contrario, se pueden manifestar antagonismos que consisten en que el aumento de uno de ellos sobre cierto nivel de concentración reduce la absorción de otro. En consecuencia, para disminuir posibles efectos negativos en la fertilización se deben considerar los nutrientes en su conjunto, para así evitar desequilibrios fisiológicos nutricionales (Bonomelli y Sallato, 2014; Goykovic Cortés y Saavedra del Real, 2007).

Aunque se ha estudiado la incidencia de numerosos macro y micro elementos sobre la calidad, los principales y los que han despertado mayor interés han sido nitrógeno, calcio y fósforo, al participar de forma activa en numerosos procesos metabólicos. El contenido de nitrógeno está directamente relacionado con la síntesis de proteínas y carotenoides, y puede afectar a la coloración del fruto, tanto a nivel de la piel como de la pulpa. Un exceso del mismo provoca una disminución de la coloración de la pulpa en melocotón y nectarinas (*Prunus pérsica*), mientras que una deficiencia induce en la pera (*Pyrus communis*) la aparición de manchas (Romojaro, Martínez-Madrid y Pretel, 2006).

El equilibrio entre uno o más nutrientes afecta al crecimiento y estado fisiológico del fruto y llega a originar desordenes fisiológicos, tanto por deficiencia como por una dosis excesiva (Soares-Gomes *et al.*, 2005). En general, se considera que un contenido excesivo de nitrógeno se traduce en una mayor producción foliar a costa de una menor calidad del fruto; asimismo, su deficiencia es también adversa, ya que provoca frutas con menor tamaño, sabor pobre, árboles con bajo rendimiento y, en postcosecha, la pérdida de agua durante el almacenamiento. En las hortalizas, los niveles excesivos de nitrógeno inducen retraso en la madurez e incrementan la incidencia de varias fisiopatías que disminuyen su calidad postcosecha; así, la pared grisácea o el oscurecimiento interno en el tomate, el tallo hueco del brócoli (*Brassica oleraceae*), la baja concentración de sólidos solubles en la papa o patata (*Solanum tuberosum*), los lunares en los pimientos (*Capsicum annuum*) o la pudrición suave en tomates se ha asociado con altos niveles de nitrógeno (Crisosto y Mitchell, 2007). Concentraciones altas de fertilizantes nitrogenados parecen afectar negativamente la concentración de vitamina C en frutas y verduras, entre ellos los tomates y cítricos (Lee y Kader, 2000).

Investigaciones en cuanto al efecto de la fertilización con nitrógeno en cultivos de zanahoria (*Daucus carota* L.) mostraron que la concentración de  $\beta$ -caroteno se elevaba directamente con el incremento de nitrógeno (Hochmuth, Brecht y Brassett, 1999). Resultados similares se observaron para el perejil (*Petroselinum crispum* N.) de la variedad “verde oscuro italiano”, en el que el aumento de nitrógeno en la solución fertilizante incrementó la biomasa, la concentración de fósforo, potasio, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno y clorofila (Chenard, Kopsell y Kopsell, 2005).

La presencia de potasio y fósforo parece estar relacionada con el aumento del contenido de licopeno en el tomate, mientras que el nitrógeno, por el contrario, parece influir de manera negativa en la concentración del mismo. Este hecho se relaciona con un mayor desarrollo foliar debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno, que permite una menor incidencia de la luz sobre el fruto (Dorais, Ehret y Papadopoulos, 2008).

Vallejo-Pérez *et al.* (2009) evaluaron la influencia de la fertilización con mezclas de nitrógeno-fósforo-potasio en cultivos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). Los resultados de este estudio mostraron un aumento en la concentración de carotenoides en frutos, mejorando su calidad y, además, la pérdida de peso por transpiración fue menor respecto a los frutos de árboles no fertilizados.

El calcio es el segundo nutriente en importancia, al estar involucrado en numerosos procesos bioquímicos y morfológicos de las plantas. Está relacionado con muchas fisiopatías de considerable importancia económica para la producción y calidad postcosecha de frutas y hortalizas. Está relacionado en especial con la textura, debido a que participa en numerosos procesos de desarrollo y mantenimiento de la estructura de la pared celular, por su capacidad para establecer enlaces iónicos con los grupos carboxilatos de las pectinas (Poovaiah, Glenn y Reddy, 1988). El desequilibrio de calcio es responsable de un elevado número de alteraciones fisiológicas o fisiopatías que se pueden manifestar durante el crecimiento del fruto en la planta o posteriormente después de la recolección. La deficiencia del mismo produce fisiopatías como el picado amargo en las manzanas, los lunares corchosos en las peras, el corazón negro en el apio (*Apium graveolens*), la pudrición en la punta estilar del tomate, el manchado de la cavidad y el agrietado en la zanahoria, así

como la punta quemada de la lechuga, la vitescencia en el melón (*Cucumis melo*) y el *blossom end rot* en tomate (Madrid *et al.*, 2004).

Estas fisiopatías pueden acentuarse si los niveles de potasio o nitrógeno son altos o cuando los niveles de fósforo son bajos (Crisosto y Mitchell, 2007; Beverly, Latimer y Smittile, 1993). Ciertas fisiopatías por deficiencia de calcio, como el picado amargo de las manzanas y la pudrición de la punta estilar en tomates, pueden reducirse mediante una apropiada irrigación y manejo adecuado de fertilización.

Además, existe evidencia acumulada de que el equilibrio catiónico del suelo afecta directamente la calidad postcosecha de varias hortalizas (Crisosto y Mitchell, 2007). Hartz *et al.* (1998) demostraron que los defectos del corazón blanco y la incidencia del ojo amarillo, dos defectos de color en tomate, se correlacionan con el equilibrio catiónico del suelo; el aumento en los niveles de potasio en el suelo disminuye estas fisiopatías relacionadas con el color, mientras que los niveles altos de magnesio en el suelo los acentúan.

## Poda

Es uno de los tratamientos técnicos más importantes aplicado a los árboles frutales. A lo largo de la vida de éstos, la poda asegura que las ramas principales sean lo suficientemente fuertes como para soportar la fruta y que las ramas laterales tengan el ángulo correcto para permitir el paso de la luz solar necesaria para el desarrollo de las flores y la maduración de los frutos. La poda no sólo mejora considerablemente el proceso de regeneración de ramas dañadas y reduce el tamaño de las copas de los árboles, sino que también reduce su altura excesiva además de mejorar la circulación de aire a través del

árbol, lo que ayuda a prevenir enfermedades. La poda también influye en las propiedades internas y externas de la calidad de las frutas, como el desarrollo de color, sustancias antioxidantes, balance de acidez total y niveles de sólidos solubles (Demirtas *et al.*, 2010). Según Tahir, Johansson y Olsson (2007), si la poda en manzanas se realiza entre 5-6 semanas antes de la cosecha puede mejorar el proceso de fotosíntesis y la síntesis de antocianinas, resultando frutas con mejor color y potencial almacenamiento.

Desde este punto de vista, el sistema de poda aplicado es un factor fundamental a tener en cuenta, por ejemplo en la producción de uvas de calidad. Investigaciones realizadas en cultivos de vid (*Vitis vinifera* L.) de la variedad *Sauvignon Blanc*, donde se utilizaron dos sistemas de poda, larga y mixta, permitió observar que el tipo de poda generó diferencias significativas en los contenidos de compuestos bioactivos. En este sentido se encontró mayor concentración de carotenoides como resultado de la poda mixta (Walteros, Molano y Almanza-Merchán, 2013).

## Protección fitosanitaria

Los pesticidas, plaguicidas o fitosanitarios son compuestos químicos que se añaden a los cultivos para protegerlos frente a las plagas y enfermedades que los dañan durante o después de la cosecha. La utilización de productos fitosanitarios tiene un efecto positivo en el rendimiento del cultivo al evitar pérdidas potenciales debido al efecto nocivo de las plagas. Sin embargo, los pesticidas pueden tener efectos no deseables y es imprescindible un control adecuado de las cantidades aplicadas, de tal forma que no representen un peligro para la salud humana o para el medio ambiente.

Algunos herbicidas poseen un modo de acción básico similar, inhibiendo una determinada enzima de las hojas de las plantas. El bloqueo impide la formación de carotenoides, destruyéndose así la protección de las hojas frente a la fotooxidación. Para evitar esto se usan los antidotos, que son sustancias que poseen la capacidad de inmunizar a las plantas de cultivo frente al herbicida. Así, se incorporan al herbicida, facilitando a las plantas de cultivo descomponer el principio activo y mantener indemne su escudo protector de carotenoides (Bayer, 2009).

Aunque el zinc y el manganeso son nutrientes minerales esenciales a bajas concentraciones, son muy tóxicos en cantidades altas en el suelo. Algunos fungicidas pueden incrementar su contenido en plantas cultivadas y en el suelo, si se utilizan en programas de protección vegetal. En este sentido, la respuesta de plantas de fresa (*Fragaria sp.*) a niveles elevados de estos nutrientes en el suelo ha sido objeto de estudio. Las plantas se cosecharon 16 semanas después de iniciados los tratamientos, tras lo cual se determinaron el área foliar total, la producción de materia seca, los contenidos de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides en hojas, el contenido de sólidos solubles totales y el diámetro longitudinal de los frutos. Los resultados indicaron que altas concentraciones de zinc y manganeso reducen el área foliar y la producción de materia seca. La calidad de la fruta se afectó por los niveles de estos metales en el suelo. Así, en plantas tratadas con altas concentraciones, los sólidos solubles totales de los frutos fueron menores que en los testigos. Además, se observó una reducción del diámetro y una disminución del contenido de clorofila y carotenoides en las hojas. Por otra parte, se evidenció una mayor toxicidad del zinc para las plantas que la del manganeso (Casierra-Posada y Poveda, 2005).

Sin embargo, en cultivos de lechuga, se evaluó el efecto del tratamiento con herbicidas (propizamida, clorprofam y la mezcla de ambos) y fungicidas (benomilo, iprodiona y vinclozolina) sobre el contenido de carotenoides, reportándose que la concentración total de estos compuestos fue mayor en aquellas parcelas de lechuga tratadas con herbicidas y el fungicida iprodiona. Además, se observó que el contenido de  $\beta$ -criptoxantina, luteína, violaxantina y neoxantina se incrementó en las plantas de dichas parcelas (Rouchaud, Moons y Meyer, 1984). En un estudio se puso de manifiesto que el contenido total de carotenoides en zanahorias cultivadas en suelos tratados antes de la siembra con cada uno de tres insecticidas (Nexion, Birlane o Dyfonate) y cosechadas a diferentes etapas de madurez alcanzó valores superiores (aproximadamente en 21%) que en zanahorias cultivadas en la parcela control. No obstante, en suelos tratados con el herbicida Dosanex, la concentración total de carotenoides en zanahorias cultivadas disminuyó en torno a 19% en relación con el control (Rouchaud, Moons y Meyer, 1984).

## FACTORES GENÉTICOS

En las frutas y hortalizas, el contenido de compuestos bioactivos depende fundamente de la especie y variedad. El responsable del funcionamiento de la planta en relación con las condiciones medioambientales es el genoma y la calidad del fruto dependerá definitivamente del comportamiento de una variedad en un medio externo determinado. Por consiguiente, el genoma va a determinar cuantitativa y cualitativamente los parámetros responsables de la calidad organoléptica y nutricional, como también su capacidad de conservación una vez recolectado (Romojaro, Martínez-Madrid y Pretel, 2006). En una misma especie, la variabilidad genética de un cultivar

es relativamente amplia, por lo que la selección varietal es de vital importancia para la calidad del producto final. Al ser los factores genéticos tan influyentes en la calidad sensorial, rendimiento, composición nutricional y vida postcosecha de las frutas y hortalizas, existen muchos programas de mejora genética en el mundo. Destacan los orientados a reducir la incidencia y severidad del deterioro causado por plagas y condiciones ambientales adversas (Crisosto y Mitchell, 2007). También los hay dedicados a obtener variedades enriquecidas en algunos constituyentes bioactivos de interés para la protección de la salud. Ejemplos de estos avances se discuten en el capítulo 16. En este sentido es importante tener en cuenta que un problema de los cultivos modificados mediante ingeniería genética es su aceptación por los consumidores (Bruhn, 2007).

En el estudio de la influencia del genotipo en 25 variedades de melocotón, nectarina y ciruela (*Prunus salicina*) se observó que la ciruela fue el fruto de hueso con mayor contenido de los compuestos bioactivos estudiados y que sus variedades presentaron importantes diferencias en el contenido de antioxidantes. Por ejemplo, la variedad Black Beaut presentó más del doble del contenido en compuestos polifenólicos y un importante contenido en carotenoides, aunque niveles reducidos de vitamina C, comparada con otras variedades como Red Beaut. Asimismo, se observó una gran variación en el contenido en compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides entre las variedades de pulpa blanca y amarilla de melocotones y nectarinas, así como entre las distintas partes del fruto. En este sentido se observó un contenido en constituyentes bioactivos 2-5 veces superior en la piel que en la pulpa (Gil *et al.*, 2002). De forma similar, al realizar la determinación del contenido en compuestos bioactivos (polifenoles y carotenoides totales e individuales) de 37 nuevas

variedades de albaricoques (*Prunus armeniaca* L.) y nuevas selecciones obtenidas de cruces entre variedades y cultivares tradicionales, se observaron importantes diferencias debidas a factores genéticos (Ruiz *et al.*, 2005, 2005a).

## FACTORES FISIOLÓGICOS

El estado de madurez en el momento de la recolección está muy relacionado con la composición química y la calidad postcosecha de frutas y hortalizas. Durante la maduración se producen cambios bioquímicos y estructurales que originan modificaciones en los constituyentes, alcanzando finalmente el fruto las características sensoriales óptimas para el consumo. Sin embargo, estos productos se cosechan con mucha frecuencia en su madurez fisiológica y no en su madurez de consumo. Una vez que se ha alcanzado este momento, se inicia por lo general la senescencia y la degradación de los tejidos, lo que se acompaña de cambios en la calidad sensorial y nutricional (Kader, 2007).

En frutas y hortalizas la maduración se acompaña generalmente de una mayor carotenogénesis. Las clorofilas se descomponen y los cloroplastos se transforman en cromoplastos, con una gran capacidad biosintética y de almacenamiento, con lo que el patrón de carotenoides típico de los tejidos fotosintéticos puede dar lugar a otros diferentes (Rodríguez-Amaya, 2001).

El comportamiento de las frutas climatéricas y no climatéricas dificulta la posibilidad de optimizar el momento de la recolección con la calidad y la capacidad de conservación en postcosecha. En las especies climatéricas el aumento de la síntesis de etileno es responsable del inicio de la maduración,

y dota al fruto de un mayor potencial para su regulación y de la posibilidad de continuar el proceso en la postcosecha. En los frutos no climatéricos la posibilidad de actuación es muy limitada, ya que carecen de esta capacidad y deben recolectarse cuando han alcanzado su calidad de consumo (Romojaro, Martínez-Madrid y Pretel, 2006).

La maduración de frutos de tomate implica importantes cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, que incluyen la síntesis y el almacenamiento de carotenoides, particularmente licopeno (Brandt *et al.*, 2006). La síntesis y acumulación masiva de carotenoides continúa incluso después de la cosecha, mientras el fruto permanezca intacto. Así pues, existe una importante diferencia en el contenido de licopeno según el estado de madurez del fruto (García-Valverde *et al.*, 2011).

En estudios realizados en cuatro estadios distintos de madurez (verde inmaduro, verde, pintón y rojo) en pimiento dulce, se determinó que el contenido en compuestos polifenólicos, vitamina C y carotenoides (incluyendo los provitamínicos A) está influido notablemente por el estado fisiológico del fruto. Los pimientos recolectados en el estado más inmaduro mostraban un mayor contenido de compuestos polifenólicos, mientras que en el estado más maduro contenían el nivel más alto de vitamina C y carotenoides (Marín *et al.*, 2004).

Además, estudios realizados en calabazas (*Cucurbita máxima*) de los mismos cultivares mostraron diferencias sustanciales, atribuidas a las amplias diferencias en etapas de madurez. Este hecho es particularmente interesante porque estos vegetales de fruto pueden ser cosechados durante un largo periodo y tienen una larga vida útil durante la cual la biosíntesis de carotenoides puede continuar (Rodríguez-Amaya, 2001).

El aumento de la carotenogénesis con la maduración también se ha documentado en otros muchos productos, entre ellos el melón (*Momordica charantia*) (Rodríguez-Amaya, 1976), pimiento rojo y mango badamil (*Mangifera indica*) (Rahman y Buckle, 1980).

En otros estudios sobre el contenido en compuestos antioxidantes de 16 variedades de espinaca (*Spinacia oleracea*) (ocho tradicionales y ocho seleccionadas) en tres estados de madurez se puso de manifiesto que las espinacas deben recolectarse en un estadio intermedio de desarrollo. En este sentido, los autores concluyeron que dicho estado correspondía con el mayor contenido en compuestos bioactivos en comparación con los estados inmaduro o maduro (Pandjaitan *et al.*, 2005).

## REFERENCIAS

- Balouchi, H.R., Sanavy, S.A.M.M., Emam, Y., Dolatabadian, A. 2009. *Plant Soil Environ* 55: 443-453.
- Bayer. 2009. Correo, CropScience para la Agricultura Moderna 1-09. Disponible en: [www.bayercropscience.com.mx/.../id/Kurier\\_LAA\\_1\\_2009\\_Heft.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/.../id/Kurier_LAA_1_2009_Heft.pdf)
- Beverly, R.B., Latimer, J.G., y Smittile, D.A. 1993. *Postharvest Handling: A System Approach*. Nueva York: Academic Press. pp: 73-98.
- Bonomelli, C. y Sallato, B. 2014. *Impacto en la calidad de la fruta de factores nutricionales en huertos de naranjos Navel*. Disponible en: [www.redagricola.com/reportajes](http://www.redagricola.com/reportajes)
- Brandt, S., Pék, Z., Barna, E., Lugasi, A., Helyes, L. 2006. *J. Sci. Food Agric*. 86: 568-572.
- Bruhn, C.M. 2007. En Kader, A. (ed.). *Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas*. Oakland: University of California. pp. 37-44.
- Casierra-Posada, F. y Poveda, J. 2005. *Agronomía Colombiana* 23: 283-289.
- Chenard, C.H., Kopsell, D.A. y Kopsell, D.E. 2005. *Journal of Plant Nutrition* 28: 285-297.
- Crisosto, C.H. y Mitchell, F.G. 2007. "Factores precosecha que afectan la calidad de frutas y hortalizas". En K. Thompson. *Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas*. CD.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Brielmann, H.L. 2006. *Natural products from plants*. Milton Park: Taylor and Francis Group.
- Demirtas, M.N., Bolat, I., Ercisli, S., Ikinci, A., Olmez, H.A., Sahin, M., Altindag, M., Celik B. 2010. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 9: 183-192.
- Dorais, M., Ehret, D. y Papadopoulos, A. 2008. *Phytochemistry Reviews* 7: 231-250.
- Dhuique-Mayer, C., Fanciullino, A.L., Dubois, C., Ollitrault, P. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9160-9168.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. 2003. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 369-382.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez Mosquera, M.I. 1996. *J. Sci Food Agric* 72: 31-39.
- García-Valverde, V., Navarro-González, I., García-Alonso, J., Periago M.J. 2011. *Food Bioprocess Tech* 6 (2), 391-402.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. 2002. *J Agric Food Chem* 50: 4976-4982.
- Goykovic Cortés, V. y Saavedra Del Real, G. 2007. *Idesia* 25: 47-58.
- Hartz, T.K., Giannini, C., Miyao, G., Valencia, J., Cahn, M., Mullen, T., Brittam, K. 1998. *Hort Science* 33: 445-446.

## REFERENCIAS

- Hochmuth, G.J., Brecht, J.K. y Bassett, M.J. 1999. *Hort Science* 34: 641-645.
- Kader, A.A. 2007. En Kader, A. (ed.). *Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas*. Oakland: University of California, pp. 43-54.
- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Choi, J.H., Kubota, C., Kwon, D.Y. 2008. *J Agric Food Chem* 56: 3772-3776.
- Krumbein, A., Schwarz, D. y Klaring, H.P. 2006. *J Appl. Bot Food Qual.* 80:160-164.
- Lee, S.K. y Kader, A.A. 2000. *Postharvest Biology and Technology* 20: 207-220.
- Lefsrud, M.G., Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., Curran-Celentano, J. 2005. *Hort Science* 40: 2026-2030.
- Madrid, R., Valverde, M., Alcolea, V., Romojaro, F. 2004. *Sci Hortic* 101, 69-79.
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. 2004. *J Agric Food Chem* 52: 3861-3869.
- Merzlyak, M.N. y Chivkunova O.B. 2000. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 55: 155-163.
- Oliveira, C., Ferreira, A.C., Costa, P., Guerra, J., Guedes de Pinho, P. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4178-4184.
- Othman, R., Zaifuddin F.A.M. y Hassan N.M. 2014. *J Oleo Sci* 63: 753-760.
- Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T., Gil, M.I. 2005. *J Agric Food Chem* 53: 8618-8623.
- Pernice, R., Parisi, M., Giordano, I., Pentangelo, A., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V., Ritieni, A. 2010. *Scientia Horticulturae* 126: 156-163.
- Poovaiah, B.W., Glenn, G.M. y Reddy, A.S.N. 1988. *Hort Rev* 10: 107-143.
- Psomiadou, E. y Tsimidou, M. 2001. *J Sci Food Agric* 81: 640-647.
- Rahman, F.M.M. y Buckle, K. A. 1980. *J Food Technol* 15: 241-249.
- Rodríguez-Amaya, D.B., Raymundo, L.C., Lee, T.C., Simpson, K.L., Chichester, C.O. 1976. *Ann Bot* 40: 615-624.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A guide to carotenoids analysis in foods*. Washington, D.C.: International Life Sciences Institute.
- Romojaro, F., Martínez-Madrid, M.C. y Pretel, M.T. 2006. *Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación en postcosecha de productos agrarios*. V Simposio Ibérico VIII Nacional de Maduración y Post-Recolección, Orihuela, Alicante. pp. 63-72.
- Rouchaud, J., Moons, C. y Meyer, J.A. 1983. *Scientia Horticulturae* 19: 33-37.

## REFERENCIAS

- Rouchaud, J., Moons, C. y Meyer, J.A. 1984. *J Agric Food Chem* 32: 1241-1245.
- Ruiz, D., Egea, J., Gil, M.I., y Tomás-Barberán, F.A. 2005. *J Agric Food Chem* 53: 9544-9552.
- Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F.A, Gil, M.I. 2005a. *J Agric Food Chem* 53: 6368-6374.
- Sams, C.E. 1999. *Postharv. Biol Technol* 15: 249-254.
- Soares-Gomes, A., Trugo, L.C., Botrel, N., Da Silva-Souza, L.F. 2005. *Postharv Biol Technol* 35: 201-207.
- Tahir, I., Johansson, E., y Olsson, M.E. 2007. *Sci Hortic* 112: 164-171.
- Tovar de Dios, M. Jesús. 2001. "Estudio del efecto de la aplicación de diferentes estrategias de riego al olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad arbequina sobre la composición del aceite". Tesis doctoral, Universidad de Lleida.
- Vallejo-Pérez, M.R., Nieto, D., Martínez, M.T., Mora, J.A., Téliz, D., Nava, C. 2009. *Revista Chapingo*, Serie Horticultura 15(1).
- Walteros, I.Y., Molano, D.C. y Almanza-Merchán, P.J. 2013. *Orinoquia* 17: 167-176.

# TABLA DE CONTENIDO EN CAROTENOIDES DE ALIMENTOS IBEROAMERICANOS

M. Graça Dias, Begoña Olmedilla-Alonso, Dámaso Hornero-Méndez,  
Adriana Z Mercadante, Coralía Osorio, Liliana Vargas-Murga  
y Antonio J. Meléndez-Martínez



## INTRODUCCIÓN

Se considera que los alimentos que se consumen comúnmente en la dieta proporcionan más de 40 carotenoides diferentes (Khachik, 2006). No obstante, el contenido en carotenoides de los mismos varía considerablemente tanto en términos cualitativos como cuantitativos como consecuencia de factores de distinta naturaleza, como el genotipo, las condiciones climáticas de la zona de producción y factores agronómicos entre otros (Maiani *et al.*, 2009). En este trabajo se han compilado y organizado datos obtenidos mediante HPLC sobre el contenido de carotenoides en frutas y verduras producidas en Iberoamérica en relación con la importancia de estos compuestos en la alimentación y la salud, la agricultura y la biodiversidad. Además de productos comunes en la dieta de los países de la región se incluyen otros silvestres o poco utilizados, con lo que se pretende contribuir a promocionar y valorizar especies y variedades locales.

## CAROTENOIDES EN ALIMENTOS

Las fuentes más importantes de carotenoides en la dieta humana son las frutas y hortalizas, siendo la contribución de los productos alimenticios de origen animal (como productos lácteos, huevos y algunos pescados y mariscos) menos importante. Otras fuentes son los colorantes, ya sean carotenoides individuales (sintéticos o naturales) o extractos ricos en carotenoides, ampliamente utilizados por la industria alimenticia. Según Britton y Khachik (2009), las fuentes dietarias pueden clasificarse en función de su contenido de carotenoides, teniendo fuentes con un contenido bajo (0-0.1 mg/100 g producto fresco), moderado (0.1-0.5 mg/100 g producto fresco), alto (0.5- 2 mg/100 g producto fresco) y muy alto (> 2 mg/100 g producto fresco) de estos compuestos.

El contenido de carotenoides en los alimentos de origen vegetal es muy variable, y depende de factores como el genotipo, el estado de maduración, el suelo y las condiciones climáticas, el manejo pre y poscosecha, el tipo de procesamiento y condiciones de almacenamiento (Mercadante, 2008; Yahia y Ornelas-Paz, 2010).

Los carotenoides que han atraído hasta la fecha más atención desde el punto de vista de la alimentación y la salud son los carotenoides con actividad de provitamina A ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina), el licopeno, la luteína y la zeaxantina, que suelen ser los mayoritarios en plasma y tejidos humanos. No obstante existen otros, como los incoloros fitoeno y fitoflueno, que también son biodisponibles y que están suscitando atención en la actualidad (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014).

Como puede deducirse de las tablas y referencias bibliográficas de este capítulo, el  $\beta$ -caroteno es probablemente el carotenoide más ampliamente distribuido en la naturaleza. Las zanahorias y las hortalizas verdes, como la espinaca, rúcula y berza son fuentes importantes de este caroteno en la dieta, ya que estos alimentos están disponibles casi todo el año. Algunas frutas originarias de la parte norte de Sudamérica, América Central y el sur de Norteamérica, como el buriti (*Mauritia vinifera*) y el pejibaye (*Bactris gasipaes*, Kunth), tienen concentraciones muy altas de  $\beta$ -caroteno. Entre las principales fuentes dietarias de  $\beta$ -criptoxantina se encuentran frutas como la papaya (*Carica papaya*), mandarinas (*Citrus x tangerina*) y naranjas (*Citrus sinensis*). Dependiendo de la variedad, los nísperos (*Eriobotrya japonica*) y los melocotones (*Prunus persica*) son también fuentes importantes de esta xantofila. Además, algunos frutos de regiones específicas, como la uvaia (*Eugenia pyriformis*, Cambess) de la Mata Atlántica (Brasil) y cajá (*Spondias lutea*) del noreste de Brasil y América Central, contienen  $\beta$ -criptoxantina como el principal carotenoide. El licopeno es el carotenoide principal de los tomates (*Lycopersicon esculentum*, Mill) y sus productos procesados. La sandía (*Citrullus vulgaris*) y la papaya también son excelentes fuentes de este caroteno. Entre las hortalizas y frutas comunes, las hortalizas de hoja verde son fuentes importantes de luteína, cuyo nivel es mucho más alto en las hojas de color verde oscuro que claro. En todas las hortalizas de hoja los niveles de  $\beta$ -caroteno, aun siendo altos, son menores que los de la luteína. Por otro lado, las frutas y hortalizas más comunes contienen bajos niveles de zeaxantina. En un reciente estudio se ha puesto de manifiesto que de entre 74 frutas y hortalizas estudiadas en Panamá, sólo cuatro destacan por sus altos niveles de esta xantofila (Britton y Khachik, 2009; Murillo *et al.*, 2010; Rodríguez-Amaya, *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014 y otras referencias en este capítulo).

Algunos carotenoides se encuentran en sólo unos pocos géneros de plantas. Por ejemplo, los carotenoides con el grupo k terminal, como la capsantina y capsorubina, se encuentran sobre todo en las variedades rojas del género *Capsicum*, como pimientos y chiles (Cervantes-Paz *et al.*, 2012). La principal fuente conocida de bixina son las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.), cuyo árbol es nativo del norte de Sudamérica (De Rosso y Mercadante, 2009).

Hasta la fecha, no se ha establecido una recomendación cuantitativa sobre el consumo de carotenoides. Sin embargo, es posible establecer valores habituales de ingesta, que podrían asociarse con un menor riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas, utilizando datos de los estudios epidemiológicos realizados sobre el consumo de frutas y hortalizas y su efecto en la salud. Los estudios de Lachance (1997) o el publicado en la guía Health Canada (1997) sugieren un consumo promedio de 6 mg/día. El estudio publicado de la WCRF/AICR (1997) eleva el valor de ingesta media a 9-18 mg/día. Los estudios de intervención realizados con dietas con un contenido controlado de carotenoides sugieren una ingesta de 3 a 6 mg/día de carotenoides (Micozzi *et al.*, 1992; Yong *et al.*, 1994; Zino *et al.*, 1997).

## TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Las tablas o bases de datos de composición de alimentos (TCA) son recursos que proporcionan información cuantitativa detallada sobre ciertos componentes de los alimentos. Además de para diseñar dietas, son de gran utilidad para ayudar a la promoción de la salud, la implementación de estrategias

nutricionales, el monitoreo de la autenticidad de los alimentos, la mejora de la provisión de alimentos y la promoción de la biodiversidad, entre otras cosas.

El gran interés en el estudio de las relaciones entre la dieta y la salud ha llevado a que exista un creciente interés por incorporar información acerca del contenido de otros compuestos no recogidos en las TCA clásicas, como por ejemplo compuestos bioactivos como los carotenoides. En este sentido, hay algunos ejemplos de bases de datos de contenido de carotenoides en alimentos en países como España, Brasil, Estados Unidos, Austria, Suiza e incluso a nivel europeo (Beltrán *et al.*, 2012; Holden *et al.*, 1999; Murkovic *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*, 2001; Rodríguez-Amaya *et al.*, 2008; Reif *et al.*, 2013). De forma similar, hay estudios dedicados a compilar datos cuantitativos sobre carotenoides en alimentos en otros países como Portugal, Luxemburgo y Costa Rica (Biehler *et al.*, 2012; Dias, Camões y Oliveira, 2009; Monge-Rojas y Campos, 2011).

Los datos presentes en las tablas de este capítulo fueron compilados más de 80 artículos científicos publicados desde 1977. Además de los seis carotenoides tradicionalmente incluidos en estas bases de datos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina), se incluyen datos de otros carotenoides como fitoeno, fitoflueno, violaxantina y neoxantina, entre otros, con una distribución mucho menor. Sólo se consideraron datos obtenidos mediante HPLC o UPLC. Por otra parte, dado que la saponificación del extracto de carotenoides puede producir importantes pérdidas de algunos de ellos (capítulo 2), el uso o no de esta reacción se indica en las tablas.

## CALIDAD DE LOS DATOS

En consonancia con esfuerzos internacionales relacionados con la promoción de la biodiversidad, la descripción de los ítems incluye el nombre científico, la variedad (siempre que fue posible) y el país de producción. Asimismo, se evaluó la calidad de los datos, considerándose para ello siempre que fue posible la descripción del alimento, la identificación de los componentes, el plan de muestreo (número de muestras) y

otros datos, como número de replicados y desviación estándar. Esta evaluación de la calidad de los datos es importante y debe ser fomentada para llevar a cabo una mejor comparación entre datos de distintas fuentes. En este sentido, es también importante impulsar la evaluación de la precisión y exactitud de los métodos analíticos, así como la producción y uso de materiales certificados para la realización de ensayos interlaboratorio.

**TABLA 1.** Carotenoides en hierbas aromáticas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	éster crocetina *	Ref
Apio	Celery	CRI	<i>Apium graveolens</i> <i>L. var. dulce</i>	Sí	VM, nl = 5, nw = 2	168	16200	226		26400 <sup>^</sup>					1
Apio, blanco	Celery, white	ESP	<i>Apium graveolens</i> <i>var. dulce</i>	No	nw = 4	ND	65 ± 2	ND	ND	163 ± 10	<LD				2
Apio, verde	Celery, green	ESP	<i>Apium graveolens</i> <i>var. dulce</i>	No	nw = 4		570 ± 14			860 ± 17					2
Apio, verde, cocido	Celery, green, cooked	ESP	<i>Apium graveolens</i> <i>var. dulce</i>	No	nw = 4	ND	1109 ± 77	ND	ND	1335 ± 91	<LD				2
Azáfiran	Saffron	ESP	<i>Crocus sativus</i> L.	No	nw = 50								135 ± 28,8 trans 4-GG 71,8 ± 6,6 trans-3-Gg 7,2 ± 3,2 cis-4-GG 4,5 ± 2,5 cis-3-Gg	3	
Cilantro	Coriander	CRI	<i>Coriandrum sativum</i> cv. <i>mogiano</i>	Sí	VM, nl = 5, nw = 2		2100	1630		3780 <sup>^</sup>					1

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	éster crocetina *	Ref
Cilantro	Coriander	BRA	<i>Coriandrum sativum</i>	No		7100 ± 4200	6600 ± 1800			10400 ± 4400		2800 ± 1700	3800 ± 1700		4
Perejil	Parsley	BRA	<i>Petroselinum hortense</i>	No			7200 ± 900			8700 ± 700		2500 ± 300	5300 ± 600		4

^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección \* g/kg gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 2. Carotenoides en hortalizas del género brassica ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	Ref
Berza tronchuda	Cabbage, Tronchuda	PRT	<i>Brassica oleracea L. var. acephala DC</i>	Crudo	No	VM, nl = 3, nw = 2	<LD	2800 (460 - 3600)	3300 (520 - 4700)	<LD			5
Brócoli	Broccoli	BRA	<i>Brassica oleracea</i>	Cocido	No	nl = 15		1890 (1570 - 2220)	3460 (3110 - 3960)		740 (670 - 830)	600 (310 - 680)	6
Brócoli	Broccoli	BRA	<i>Brassica oleracea</i>	Salteado	Sí	nl = 10		1575 (1140 - 2010)	3275 (2760 - 3790)		695 (650 - 740)	455 (410 - 500)	6
Brócoli	Broccoli	CRI	<i>Brassica oleracea var. Italica cv. Marathon</i>	Cocido	Sí	VM	24	3300	9000^				1
Brócoli	Broccoli	ESP	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	Cocido		nl = 3, nw = 7		1025 (790 - 1240)	1610 (1310 - 1930)				7
Brócoli	Broccoli	PAN	<i>Brassica oleracea (italica)</i>	Crudo	Sí	nw = 4			140 ± 20	<LD			8
Brócoli	Broccoli	ESP	<i>Brassica oleracea</i>	Crudo	No	nw = 4	ND	414 ± 20	1108 ± 50	<LD			2
Brócoli	Broccoli	ESP	<i>Brassica oleracea</i>	Cocido	No	nw = 4	ND	450 ± 40	1043	<LD			2
Col	Kale	BRA		Salteado	Sí	nl = 15, nw = 2	<LD	2240 (240 - 2280)	2860 (310 - 3500)		630 (490 - 790)	530 (280 - 880)	6
Col	Kale	BRA	<i>Brassica oleracea cv. Manteiga</i>	Crudo	No	nl = 36		3070 (2280 - 4240)	4440 (3290 - 5740)		1200 (880 - 2590)	2050 (1610 - 4220)	9

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	Ref
Col	Kale	BRA	<i>Brassica oleracea</i> cv.Manteiga	Salteado	Sí	nl = 15		2240 - 2400	2860 - 3500		490 - 790	880 - 1280	6
Col	Kale	BRA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i> (Manteiga)	Crudo	No	nl = 10		5400 $\pm$ 50	11100 $\pm$ 1600	300 $\pm$ 200	1800 $\pm$ 700		10
Col	Kale	BRA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i> (Tronchuda)	Crudo	No	nl = 10		6000 $\pm$ 14	11400 $\pm$ 1000	200 $\pm$ 100	1900 $\pm$ 400		10
Col	Kale	BRA	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>		No	nl = 10, nw = 10		3800 (3400 - 4200)	5450 (5200 - 5700)		2300 (2000 - 2600)	3450 (2700 - 4200)	4
Col, Gallega	Kale, Galega	PRT	<i>Brassica oleracea</i> L., var. <i>acephala</i> D.C.	Crudo	No	VM, nl = 3, nw = 2	<LD	4200* (2600 - 6400)*	5900 (3700 - 7200)	<LD			5
Coles de Bruselas	Brussel sprouts	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Crudo		nl = 4		77 $\pm$ 10*	185 $\pm$ 19				11
Coles de Bruselas	Brussel sprouts	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Cocido		nl = 4		162 $\pm$ 18*	468 $\pm$ 36				11
Coliflor	Cauliflower	CRI	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>Snawball</i>	Cocido	Sí	VM		7,95 6,47*	19,1^				1
Coliflor	Cauliflower	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Crudo		nw = 4		2 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 0,4				11
Coliflor	Cauliflower	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Cocido		nw = 4		28 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	<LD			11
Mostaza de hoja	Mustard greens	PAN	<i>Brassica juncea</i>	Crudo	Sí	nw = 4			5380 $\pm$ 420	80 $\pm$ 10			8
Repollo	Cabbage	PAN	<i>Brassica oleracea</i> ( <i>viridis</i> )	Crudo	Sí	nw = 4			250 $\pm$ 10	10 $\pm$ 10			8
Repollo	Cabbage	CRI	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> cv. <i>Bronco</i>	Crudo	Sí	VM		19,3 12,3*	49,6^				1
Repollo	Cabbage	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Crudo		nl = 4		22 $\pm$ 2*	59 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2			11
Repollo	Cabbage	ESP	<i>Brassica oleracea</i> L.	Cocido		nl = 4		33 $\pm$ 3*	93 $\pm$ 20	6 $\pm$ 3			11

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	Ref
Repollo/lombarda, rojo	Cabbage, red	ESP	<i>Brassica oleracea L.</i>	Crudo		nl = 4		3 ± 0,2*	8 ± 2	<LD			11
Repollo/lombarda, rojo	Cabbage, red	ESP	<i>Brassica oleracea L.</i>	Cocido		nl = 4		7 ± 1*	23 ± 1	4 ± 1			11

\* isómeros-E ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 3. Carotenoides en hortaliza fruta ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Calabacín, amarillo	Squash, yellow	ESP	<i>Cucurbita pepo L. var. Medellusa, Alef</i>	Crudo	Sin		nl = 8		22 (21 - 23)	3 (<LD - 6)		104 (100 - 108)		11
Calabacín, amarillo	Squash, yellow	ESP	<i>Cucurbita pepo L. var. Medellusa, Alef</i>	Cocido	Sin	Sí	nl = 8		27 (26 - 28)	6 (<LD - 11)		144 (118 - 169)		11
Calabacín, verde	Zucchini squash, green	CRI	<i>Cucurbita pepo L. cv. Caserta</i>	Cocido		Sí	VM					39,9^		1
Calabaza	Pumpkin	PRT	<i>Cucurbita pepo L. var. styriaca Greb.</i>	Crudo	Con	No	nl = 3, nw = 3	56,4* (44 - 65,17)*	232,47* (186 - 275)*			49 (<LD - 76)		12
Calabaza	Squash	PAN	<i>Cucurbita maxima</i>	Crudo		Sí	nw = 4					8170 ± 1510	190 ± 30	8
Calabaza, naranja	Pumpkin, orange	CRI	<i>Cucurbita moschata var. Native</i>	Cocido		Sí	VM	96.7	246 225*		32,3**	902		1
Calabaza, naranja	Squash, orange	ARG	<i>Cucurbita moschata</i>		Sin	Sí		2300 ± 400	600 ± 100			300 ± 100		13
Calabaza, naranja-amarillo	Pumpkins, orange-yellow	BRA	<i>Cucurbita moschata Duch</i>	Crudo	Con	No	nl = 10, nw = 3	7003 (6706 - 7299)						14
Calabaza, redondo	Pumpkin (round)	ESP	<i>Cucurbita maxima</i>	Crudo	Sin	No	nw = 3	31	188	<LD	<LD	623	<LD	15

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Calabaza, tamaño curcubita	Pumpkin (size squash)	ESP	<i>Cucurbita maxima</i>	Crudo	Sin	No	nw = 3	53	692	<LD	<LD	728	<LD	15
Curuguá, amarillo	Cassabanana, yellow	PAN	<i>Sicana odorifera</i>			Sí						10 ± 10	40 ± 10	8
Melon	Melon	PAN	<i>Cucumis melo</i>			Sí	nw = 4					30 ± 10	10 ± 10	8
Melón	Muskmelon	PAN	<i>Cucumis melo</i>			Sí						30 ± 10	10 ± 10	8
Melón	Muskmelon	CRI	<i>Cucumis melo L. var. cantalupensis cv. Hy-mark</i>	Crudo	Sin	Sí	VM	44	3600	8	61.9	53^		1
Melón, blanco	Melon, white	ESP		Crudo	Sin	Sí	nw = 4	<LD	21 ± 5	<LD	<LD	2 ± 0,5	<LD	2
Nabo del diablo/ nueza, verde	White bryony, green	ESP	<i>Bryonia dioica</i>	Brotes jóvenes					6690 (1490 - 19530)			19130 (6830 - 36980)		16
Ocra	Okra	PAN	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Crudo		Sí	nw = 4					520 ± 30	10 ± 10	8
Pepino	Cucumber	ESP	<i>Cucumis sativa L.</i>	Crudo	Sin		nw = 4		11 ± 1			16 ± 1		11
Pepino, verdoso	Cucumber, greenish	CRI	<i>Cucumis sativus cv. Roxinante</i>	Crudo	Sin	Sí	VM		12,5 11,1*			51,1^		1
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Ancho</i>	Seco		Sí	nl = 2	598 (157 - 1038)	1527 (1481 - 1572)	729			454 (258 - 649 ) 631,68**	17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Guajillo</i>	Seco		Sí	nl = 2	302 (86 - 517)	1153 (1095 - 1210) 290**	472 (299 - 644)			213 (127 - 298) 358**	17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Mulato</i>	Seco		Sí	nl = 2	416 (216 - 615)	938 (796 - 1079) 637,12**	233 (23,9 - 442)		32,6 (1,45 - 63,7)	130 (2,17 - 258) 129,6**	17
Pimiento, amarillo	Pepper, yellow	BRA	<i>Capsicum annuum L. (F1 Magali hybrid)</i>	Crudo	Sin	No	nl = 5; nw = 2		230 ± 80*			780 ± 120*		18
Pimiento, amarillo	Pepper, yellow	PAN	<i>Capsicum annuum</i>	Crudo		Sí	nw = 4					220 ± 20	440 ± 60	8
Pimiento, Jalapeño, verde	Pepper, Jalapeño, green	MEX	<i>Capsicum annuum L.</i>		Sin		nl = 3	146 (9 - 179)	6374 (381 - 8576)			836		18
Pimiento, naranja	Pepper, orange	PAN	<i>Capsicum annuum</i>	Crudo		Sí	nw = 4					790 ± 60	6200 ± 880	8

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Pimiento, pimentón, rojo	Pepper, Paprika, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. Bola type</i>	Seco	Sin	Sí	nl = 5; nw = 4		14500 (12200 - 20900)	11900 (8400 - 17700)			31000 (24800 - 39900)	20
Pimiento, rojo	Pepper, red	BRA	<i>Capsicum annuum L. (F1 Amanda hybrid)</i>	Crudo	Sin	Sí	nl = 5; nw = 2		580 ± 60*			750 ± 80*		18
Pimiento, rojo	Pepper, red	CRI	<i>Capsicum annuum cv. Nathalie</i>	Crudo		Sí	VM	116	192					1
Pimiento, rojo	Pepper, red	PAN	<i>Capsicum annuum</i>	Crudo		Sí	nw = 4					220 ± 40	440 ± 40	8
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. Bola type</i>	Seco	Sin	No	nl = 5; nw = 4		22300 (19700 - 41800)	20600 (14900 - 33000)			40000 (34200 - 68400)	20
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult Mana</i>	Crudo	Con	Sí							197800	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult MA1</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		45403 (2556 - 71951)	47008 (0 - 60761)		1263 (0 - 9683)	63589 (0 - 95379)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult MA3</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		42308 (3127 - 73669)	47559 (0 - 95977)		110,83 (0 - 3305)	32067 (0 - 66728)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult RN1</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		31750 (2366 - 41972)	31934 (0 - 41752)		3200 (0 - 5875)	56375 (0 - 67827)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult RN2</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		32412 (2150 - 48692)	30816 (0 - 45000)		4906 (0 - 7596)	49269 (0 - 71692)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult LR2</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		11217 (4150 - 109972)	14799 (0 - 39263)		4005 (0 - 14047)	30036 (0 - 63590)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult LR7</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		19289 (1496-32751)	22648 (0-31550)		2129 (0 - 9309)	47661 (0 - 56293)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult DN3</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		34212 (2302 - 65155)	34433 (0 - 41291)		4495 (0 - 7113)	65097 (0 - 135178)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult DN5</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		39987 (4572 - 68301)	50069 (0 - 68173)		0 (0 - 14837)	83500 (0 - 165010)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult RR1</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		15369 (1701 - 30414)	17961 (0 - 23456)		2259 (0 - 7278)	35556 (0 - 40570)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult DR6</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4		43501 (1380 - 62352)	33530 (0 - 63351)		0 (0 - 6116)	74089 (0 - 105990)	21

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Datler</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4					912 (0 - 5940)	80920 (0 - 97448)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Mulato</i>	Liofilizado	Con	Sí	nl = 5; nw = 4					0 (0 - 32020)	46656 (0 - 72950)	21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Agridulce</i>	Crudo	Con	Sí	nl = 2		5375 (798 - 9951)	3836 (0 - 7672)		1409 37**	4998 (0 - 9996) 752**	22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Bola</i>	Crudo	Con	Sí	nl = 2		2876 (623 - 5128)	1780 (0 - 3559)		795 71**	2015 (0 - 4030) 347**	22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L.</i>	Crudo	Sin	Sí	nl = 10		446 (414 - 478)	225 (199 - 251)			219 (148 - 289)	11
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L.</i>	Cocido	Sin	Sí	nl = 12		731 (693 - 768)	307 (243 - 371)			294 (197 - 390)	11
Pimiento, verde	Pepper, green	PAN	<i>Capsium anuumm</i>	Crudo		Sí						390 ± 40	<LD	8
Pimiento, verde	Pepper, green	ESP	<i>Capsicum annuum L.</i>	Crudo	Sin		nl = 8		205 - 270			341 - 770		11
Pimiento, verde	Pepper, green	ESP	<i>Capsicum annuum L.</i>	Cocido	Sin		nl = 4		255 ± 10			377 ± 83		11
Sandía	Watermelon	BRA	<i>Citrullus lamatus cv. Crimson Sweet</i>						260 ± 170		3500 ± 200			23
Sandía, rojo	Watermelon, red	CRI	<i>Citrullus vulgaris cv. Micky-Lee</i>	Crudo	Sin	Sí	VM		21,9 21,8*		1600*			1
Sandía, rojo	Watermelon, red	ESP	<i>Citrullus vulgaris, Schered</i>	Crudo	Sin	No	nw = 3	<LD	62.6	63.2	2489	35.3	<LD	2, 24
Sandía, rojo	Watermelon, red	ESP	<i>Citrullus vulgaris, Schered</i>	Crudo	Sin	Sí	nw = 3	<LD	77,1 ± 29	62,3 ± 20	2454 ± 319	39,8 ± 13	<LD	2, 24
Tomate	Tomato	BRA	<i>Cultivar santa cruz</i>	Crudo			nl = 10		510 ± 1,1		3110 ± 20,2*			25
Tomate	Tomato	BRA		Zumo			nl = 3		200 ± 0,5* 2 ± 0,01**		6160 ± 7,6* 710 ± 5,5**			25
Tomate	Tomato	BRA		Puré			nl = 18		415* (300 - 620)* 170** (100 - 260)**		12330* (7380 - 19370)* 975** (360 - 1800)**			25

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Tomate	Tomato	BRA		Pasta			nl = 12		590* (430 - 870)* 200** (170 - 360)**		16440* (15830 - 18270)* 1500** (830 - 2090)**			25
Tomate	Tomato	PAN	<i>Solanum lycopersicum</i>	Crudo		Sí	nw = 4					340 ± 60	130 ± 20	8
Tomate	Tomato	BRA	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>cv Carmen</i>	Crudo		No					3540 ± 950	100 ± 20		26
Tomate	Tomato	CRI	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>cv. Liro 42</i>	Crudo		Sí	VM		280 261*		1260 ± 1150*	131^		1
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum</i> <i>Mill, common type</i>	Crudo	Sin		nl = 4		494 ± 124		2116 ± 583**	52 ± 12		11
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum</i> <i>Mill, Canary islands type</i>	Crudo	Sin		nl = 4		443 ± 37		1604 ± 283**	44 ± 1		11
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum</i> <i>Mill, pear type</i>	Crudo	Sin		nl = 4		393 ± 39 3501**		62273 ± 7944**	72 ± 7		11
Tomate	Tomato	PRT	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>M. var. Lido</i>	Crudo	Con	No	VM, nl = 12, nw = 2	<8	1000 ± 140*	<6	8000 ± 2000**	100 ± 17	<8	27
Tomate	Tomato	PRT	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>M. var. "for salad"</i>	Crudo	Con	No	VM, nl = 12, nw = 2	<8	390 ± 56*	<6	2300 ± 570**	80 ± 15	<8	27
Tomate	Tomato	PRT	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>M.</i>	Crudo	Con	No	nw = 3		255* (170 - 513)*	<LD	8440 (8340 - 9600) 7875* (6700 - 9050)*	77,1* <LD - 102*		12
Uchuva	Peruvian groundcherry	PAN	<i>Physalis peruviana</i>									250 ± 20	40 ± 10	8
Uchuva	Peruvian groundcherry	CHI/ COL	<i>Physalis peruviana</i>	Pulpa					388,8 - 1460					28
Uva	Grape	ESP	<i>Vitis vinifera</i> <i>L</i>	Crudo	Con	No	nw = 4	<LD	17 ± 2	<LD	<LD	13	<LD	2

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones

LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 3.1. Carotenoides en hortaliza fruta ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	$\alpha$ -criptoxantina	capsantina	capsantina 5,6-epóxido	Ref
Nabo del diablo/ nueza, verde	White bryony, green	ESP	<i>Bryonia dioica</i>	Brotes jóvenes				17370 (1720-38330)	8930 (1010-21520)				16
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Ancho</i>	Seco		Sí	nl=2	212 (18,9 - 406)	545 (<LD - 1090)	199 (0 - 397)	584* 438 - 729* 1046** (760 - 1331)**		17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Guajillo</i>	Seco		Sí	nl=2	294 (159 - 429)	446 (<LD - 892)	441 (151 - 730)	692* (533 - 852)* 605** (533 - 676)**		17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Mulato</i>	Seco		Sí	nl=2	<LD	1197 (804 - 1593)	283 (52,1 - 513)	407* (3,62 - 811)* 364** (8,69 - 719)**		17
Pimiento, amarillo	Pepper, yellow	BRA	<i>Capsicum annuum L. (F1 Magali hybrid)</i>	Crudo	Sin	Sí			3080 $\pm$ 310*				18
Pimiento, Jalapeño, verde	Pepper, Jalapeño, green	MEX	<i>Capsicum annuum L.</i>		Sin		nl=3		13975 (225 - 15888)				19
Pimiento, pimentón, rojo	Pepper, paprika, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. (RR)</i>	Seco	Sin	Sí	nl=5; nw=4				93400 (62200 - 110100)		20
Pimiento, rojo	Pepper, red	BRA	<i>Capsicum annuum L. (F1 Amanda hybrid)</i>	Crudo	Sin	Sí			270 $\pm$ 50*		3260 $\pm$ 270*		18
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. (RR)</i>	Seco	Sin	No	nl=5; nw=4				159600 (128100 - 184200)		20
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L / cultivar Mana</i>	Crudo		Sí					668700		21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L / cultivar Numex</i>	Crudo		Sí					370500		21

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	$\alpha$ -criptoxantina	capsantina	capsantina 5,6-epóxido	Ref
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L / cultivar Negral</i>	Crudo		Sí						61400	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult MA1</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 3138)	9727 (1351-19435)		371136 (0 - 799443)	10918 (0 - 34140)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult MA3</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 4731)	8741 (3707 - 27282)		258702 (0 - 414103)	19128 (0 - 29672)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RN1</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	1356 (0 - 2330)	8321 (2286 - 33239)		274398 (0 - 560570)	14966 (0 - 36605)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RN2</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	1102 (0 - 2445)	8026 (3569 - 29857)		253445 (0 - 636308)	14025 (0 - 33011)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult LR2</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	483 (0 - 4485)	6089 (3954 - 21785)		159486 (0 - 443535)	7451 (0 - 21596)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult LR7</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	791 (0 - 2736)	7115 (2395 - 20901)		245514 (0 - 414219)	10700 (0 - 17883)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DN3</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 2313)	3210 (0 - 21943)		216962 (0 - 571435)	7460 (0 - 15558)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DN5</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 5055)	7742 (6312 - 190305)		245219 (0 - 598510)	6105 (0 - 19776)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RRI</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	735 (0 - 2113)	4276 (2342 - 10954)		146706 (0 - 301257)	5834 (0 - 10278)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DR6</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	2558 (0 - 2977)	22303 (1726 - 23994)		469715 (0 - 605135)	20852 (0 - 23635)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Datler</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 2041)	12221 (1608 - 25511)		444785 (0 - 543216)	15054 (0 - 27000)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Mulato</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	0 (0 - 12005)	9227 (8125 - 23880)		222002 (0 - 501188)	11301 (0 - 17778)	21
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L var Agridulce</i>	Crudo		Sí	nl=4	443 (0 - 885)	4605 (793 - 8417)		32824 (0 - 65647) 3612** (0 - 7224)**	2578 (0 - 5156)	22

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	$\alpha$ -criptoxantina	capsantina	capsantina 5,6-epóxido	Ref
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L. var Bola</i>	Crudo		Sí	nl=4	406 (0 - 812)	3154 (1040 - 5268)		26161 (0 - 52321) 2969** (0 - 5938)**	2016 (0 - 4031)	22
Pimiento, verde	Pepper, green		<i>Capsicum annuum L.</i>	Crudo	Sin		nl=6	310 ± 50	460 ± 140				26

\* isómeros-E de detección \*\* isómeros-Z gama de valores entre paréntesis SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 3.2. Carotenoides en hortaliza fruta ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	capsorubina	anteraxantina	latoxantina	fitoflueno	fitoeno	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	Ref
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Ancho</i>	Seco		No	nl=2	134 (105 - 163)	<LD	235 (53,4 - 417)				614 (438 - 790)	17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Guajillo</i>	Seco		No	nl=2	162 (20,3 - 304)	239 (<LD - 478)	82 (59,5 - 105)					17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Mulato</i>	Seco		No	nl=2	176 (48,5 - 304)	<LD	163 (111 - 214)			100 (0 - 199)	407 (3,62 - 811)	17
Pimiento, Jalapeño, verde	Pepper, Jalapeño, green	MEX	<i>Capsicum annuum L.</i>		Sin		nl=2			4899 (3015 - 3768)					19
Pimiento, pimentón, rojo	Pepper, paprika, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. (RR)</i>	Seco	Sin	Sí	nl=5; nw=4	41600 (19700 - 55400)							20
Pimiento, rojo	Pepper, rojo	ESP	<i>Capsicum annuum L. (RR)</i>	Seco	Sin	No	nl=5; nw=4	83200 (57000 - 106500)							20
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. / cultivar Mana</i>	Crudo		Sí							97200		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. / cultivar Negral</i>	Crudo		Sí		53600							21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L. cult MAI</i>	Liofilizado		Sí	nl=5; nw=4	6666 (0 - 32254)	531 (0 - 86060)				42637 (0 - 91975)		21

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	capsorubina	anteraxantina	latoxantina	fitoflueno	fitoeno	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	Ref
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult MA3</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	19628 (0 - 28877)	26718 (394 - 45996)				34159 (0 - 69350)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RN1</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	15919 (0 - 40887)	29689 (465 - 53563)				41494 (0 - 97564)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RN2</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	13933 (0 - 35442)	26744 (499 - 49406)				37013 (0 - 89920)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult LR2</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	6604 (0 - 23291)	17967 (566 - 47477)				21556 (0 - 60645)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult LR7</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	9022 (0 - 19732)	30213 (379 - 45295)				35273 (0 - 59130)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DN3</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	9008 (0 - 18119)	19367 (491 - 44970)				30434 (0 - 80903)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DN5</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	8488 (0 - 23150)	20257 (657 - 53674)				36953 (0 - 86558)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult RR1</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	6440 (0 - 12576)	15857 (358 - 26275)				20646 (0 - 38955)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult DR6</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	23057 (0 - 29079)	54832 (164 - 61326)				76611 (0 - 79541)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Datler</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	17833 (0 - 28433)	48134 (230 - 63633)				57574 (0 - 82042)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L cult Mulato</i>	Liofilizado		Sí	nl = 5; nw = 4	14501 (0 - 18183)	15975 (533 - 55002)				29276 (0 - 65378)		21
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Agridulce</i>	Crudo		Sí	nl = 2	7898	4408						22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Bola</i>	Crudo		Sí	nl = 2	5344	3318						22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L</i>	Crudo		Sí	nw = 4					721 ± 28			22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L</i>	Cocido		Sí	nw = 4					1034 ± 35			22
Sandía, rojo	Watermelon, red	ESP	<i>Citrullus vulgaris, Schered</i>	Crudo	Sin	No	nw = 3					1150			2, 24

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	capsorubina	anteraxantina	latoxantina	fitoflueno	fitoeno	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	Ref
Sandía, rojo	Watermelon, red	ESP	<i>Citrullus vulgaris, Schered</i>	Crudo	Sin	Sí	nw = 3					1122 ± 812			2, 24
Tomate	Tomato	BRA	<i>Cultivar santa cruz</i>	Crudo			nl = 10				370 ± 4,6**				25
Tomate	Tomato	BRA		zumo			nl = 3				510 ± 1,4				25
Tomate	Tomato	BRA		Puré			nl = 18				1170 (940 - 1420)				25
Tomate	Tomato	BRA		Pasta			nl = 12				920 - 1680				25
Tomate	Tomato	ESP	<i>Lycopersicon esculentum M., common type</i>	Crudo			nw = 4					923 ± 424			2
Tomate	Tomato	ESP	<i>Lycopersicon esculentum M. Canary island type</i>	Crudo			nw = 4					489 ± 68			2
Tomate	Tomato	ESP	<i>Lycopersicon esculentum M. Pear type</i>	Crudo			nw = 4					2795 ± 446			2
Tomate	Tomato	ESP										3480-9130			29
Tomate, rojo	Tomato, red	ESP	<i>Solanum lycopersicum Mill, common type</i>	Crudo	Sin		nl = 4			3015±47					11
Tomate, rojo	Tomato, red	ESP	<i>Solanum lycopersicum Mill, pear type</i>	Crudo	Sin		nl = 4						1373		11

\*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 3.3.** Carotenoides en hortaliza fruta ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	cicloviolaxantina	mutatoxantano	mutatoxantano 2	mutatoxantano 1	criptocapsina	critoflavina	luteoxantina	capsoluteína	Z-caroteno	$\epsilon$ -caroteno	Ref
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Ancho</i>	Seco		No	nl = 2			11,3 (0 - 22,6)	12,4 (0 - 24,8)	9,1 (0 - 18,1)						17
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Guajillo</i>	Seco		No	nl = 2	56,1 (34,5 - 77,7)		10,5 (0 - 21,0)	10,2 (0 - 20,3)	570 (464 - 676)	140 (0 - 279)					17

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	Piel	SAP	QA	cicloviolaxantina	mutatoxantano	mutatoxantano 2	mutatoxantano 1	criptocapsina	critoflavina	luteoxantina	capsoluteína	Z-caroteno	ε-caroteno	Ref
Pimiento	Pepper	CHL/ MEX	<i>Capsicum annuum L., var. Mulato</i>	Seco		No	nl=2	10,5 (0 - 21,0)	265 (0 - 529)	44,6 (0 - 89,1)		227 (45,0 - 408)	127 (0 - 253)	176 (152 - 199)				17
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Agri dulce</i>	Crudo	Con	Sí	nl=2								8877			22
Pimiento, rojo	Pepper, red	ESP	<i>Capsicum annuum L var Bola</i>	Crudo	Con	Sí	nl=2								6896			22
Tomate	Tomato	BRA	<i>Cultivar santa cruz</i>	Crudo			nl=10									40±0,2*		25
Tomate	Tomato	BRA		Zumo			nl=10									130±0,3		25
Tomate	Tomato	BRA		Puré			nl=18									270 (140 - 330)		25
Tomate	Tomato	BRA		Pasta			nl=12									350 (250 - 500)		25
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum Mill, pear type</i>	Crudo	Sin		nl=4										37±4	11
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum Mill, pear type</i>	Crudo	Sin		nl=4										161±22	11
Tomate	Tomato	ESP	<i>Solanum lycopersicum Mill, common type</i>	Crudo	Sin		nl=4										143±35	11

\* isómeros-E SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 4.** Carotenoides en legumbres ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Guisantes partidos	Peas, split	CRI	<i>Pisum sativum var. Native</i>	Cocido	Sí	nl=6, nw=3	79.7	2.99	480 <sup>^</sup>		1
Judías secas/ alubias	Bean, Kidney	PAN	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Crudo	Sí	nw=4			430 $\pm$ 50	10 $\pm$ 10	8

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado  
 nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 5.** Carotenoides en hortalizas de hoja ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Acelga	Leaf beet	PRT	<i>Beta vulgaris L. ssp. vulgaris convar. cicla (L.)</i>	Crudo	No	VM	<LD	2900	<LD	<LD	3600	130	5
Achicoria	Chicory	BRA	<i>Cichorium intybus</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2		3530 $\pm$ 500			5370 $\pm$ 830		26
Achicoria	Chicory	BRA	<i>Cichorium intybus</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10		3600			5700		4
Amaranto verde/ bledo	Green amaranth	BRA	<i>Amaranthus viridis</i>		No	nl=5, nw=10		3200 $\pm$ 1400			3400 $\pm$ 1400		4
Berro	Watercress	BRA	<i>Nasturtium officinale</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2		2720 $\pm$ 450			5610 $\pm$ 730		26
Berro	Watercress	BRA	<i>Nasturtium officinalis</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10		3200 (2700 - 3700)			6550 (5600 - 7500)		4
Berro	Watercress	PAN	<i>Nasturtium officinale</i>	Crudo	Sí	nw=4					4280 $\pm$ 380	40 $\pm$ 10	8
Berro	Watercress	ESP	<i>Valerianella locusta</i>	Crudo	No	nw=3	ND	2655	ND	ND	4357	ND	15
Cerraja	Sow thistle	BRA	<i>Sonchus oleraceus</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10		9700 $\pm$ 4000			11100 $\pm$ 4800		4
Endibia	Endive	PAN	<i>Cichorium endivia</i>	Crudo	Sí	nw=4					3420 $\pm$ 400	50 $\pm$ 10	8

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Crudo		nl = 29, nw = 2		2490 (1340 - 4350)			3710 (2060 - 6150)		30
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Salteado	Sí	nl = 5		1240 ± 370			2340 ± 500		6
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Crudo	No	nl = 10, nw = 10		2490 (3100 - 4400)			3710 (4300 - 6200)		4
Endibia	Endive	BRA		Salteado	Sí	nl = 5		1240 ± 370			2340 ± 500		6
Espinaca	Spinach	PAN	<i>Spinacea juncea</i>	Crudo	Sí	nw = 4					4370 ± 380	70 ± 10	8
Espinaca	Spinach	CRI	<i>Spinacia oleraceae var. Native</i>	Cocido	Sí	nl = 3, nw = 3		807 494*			4100^		1
Espinaca	Spinach	ESP	<i>Spinacia oleraceae L.</i>	Crudo		n = 4		3254 ± 330*			4229 ± 1310	377 ± 103	11
Espinaca	Spinach	ESP	<i>Spinacia oleraceae L.</i>	Cocido				4626 ± 346*			6422 ± 1190	564 ± 75	11
Espinaca de Nueva Zelanda	Spinach, New Zealand	BRA	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	Crudo	No	nl = 22, nw = 2		3825 (2230 - 5490)			4810 (3640 - 7210)		30
Espinaca de Nueva Zelanda	Spinach, New Zealand	BRA	<i>Tetragonia expansa</i>	Crudo	No	nl = 10, nw = 10		5300 (5100 - 5500)			7000 (6800 - 7200)		4
Lechuga	Lettuce	PAN	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	Sí	nw = 4					200 ± 10	10 ± 10	8
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-Carrascoy)</i>	Crudo	No	nw = 4		2640 ± 300			1170 ± 90		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-España)</i>	Crudo	No	nw = 4		2460 ± 500			1000 ± 210		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-Aitana)</i>	Crudo	No	nw = 4		3490 ± 230			1390 ± 120		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-Collado)</i>	Crudo	No	nw = 4		3200 ± 90			1160 ± 20		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-Alhama)</i>	Crudo	No	nw = 4		3390 ± 280			1340 ± 100		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-Isasa)</i>	Crudo	No	nw = 4		2010 ± 130			770 ± 50		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa L. (Romaine-AR-29213)</i>	Crudo	No	nw = 4		3300 ± 220			1410 ± 110		31

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Ricote)</i>	Crudo	No	nw = 4		2050 ± 100			780 ± 30		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Petra)</i>	Crudo	No	nw = 4		1950 ± 100			780 ± 70		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Etna)</i>	Crudo	No	nw = 4		1880 ± 220			840 ± 70		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Urbión)</i>	Crudo	No	nw = 4		2060 ± 50			840 ± 40		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Sandra)</i>	Crudo	No	nw = 4		2070 ± 410			870 ± 130		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Maite)</i>	Crudo	No	nw = 4		2270 ± 290			970 ± 130		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Ferro)</i>	Crudo	No	nw = 4		2030 ± 340			780 ± 110		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Mini Romaine - Maria)</i>	Crudo	No	nw = 4		4180 ± 590			1490 ± 200		31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Mini Romaine - AR-29232)</i>	Crudo	No	nw = 4		3330 ± 140			1270 ± 40		31
Lechuga	Lettuce		<i>Lactuca sativa</i> <i>L.</i>			nl = 4		172 ± 8			340 ± 17		11
Lechuga, Boston	Lettuce, Boston	BRA	<i>Lactuca sativa</i> <i>var. Boston</i>	Crudo	No	nl = 4, nw = 2		1850 (870 - 2960)			2058 (1000 - 3090)		30
Lechuga, Boston	Lettuce, Boston	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl = 6, nw = 2		1490 ± 460			1350 ± 430		26
Lechuga, butterhead	Lettuce, butterhead	CRI	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. var. capitata</i> <i>cv. Karla</i>		Sí	nl = 3, nw = 3		199 160*		25,4**	1180^		1
Lechuga, Francesa	Lettuce, French	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl = 5, nw = 10		2500			2300		4
Lechuga, Freelice	Lettuce, Freelice	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl = 5, nw = 10		990			1000		4

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Lechuga, iceberg	Lettuce, iceberg	ESP	<i>Lactuca sativa L. iceberg</i>			nl=4		48±2			140±3		11
Lechuga, iceberg	Lettuce, iceberg	CRI	<i>Lactuca sativa L. varcapitata cv. Cool Breeze</i>	Crudo	Sí	nl=3, nw=3		192 153*		24,1**	2520^		1
Lechuga, lisa	Lettuce, smooth	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10		1900 (1500 - 2300)			1750 (1400 - 2100)		4
Lechuga, oreja de mulo	Lettuce, Romaine	PAN	<i>Lactuca sativa (longifolia)</i>	Crudo	Sí	nw=4					2110±140	70±10	8
Lechuga, rizada	Lettuce, curly	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2		1550±420			1430±240		26
Lechuga, rizada	Lettuce, curly	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10		1650 (1600 - 1700)			1450 (1400 - 1500)		4
Mastruço, salvaje	Mastruço, wild	BRA	<i>Lepidium pseudodidymum</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	470±180	11400±2200			11900±2100		21
Mostaza, hojas	Mustard Greens	CRI	<i>Brassica juncea var. Native</i>	Cocido	Sí	nl=5, nw=3	4.23	2130 1700*	35	22 20,8**	3330^		1
Nabizas	Turnip greens	PRT	<i>Brassica rapa L. var. rapa</i>	Crudo	No	VM	<LD	4400	<LD	<LD	5600	<LD	5
Remolacha, hojas	Beetroot leaves	PRT	<i>Beta vulgaris L. var. vulgaris</i>	Crudo	No	VM	<LD	2500	<LD	<LD	4400	<LD	5
Rúcula	Rucula	ESP	<i>Eruca sativa</i>	Crudo	No	nw=3	ND	3575	ND	ND	8061	ND	15
Rúcula	Rucula	BRA	<i>Eruca sativa L.</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2		2840±150			5000±440		26
Rúcula	Rucula	BRA	<i>Eruca sativa L.</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10		3050 (2800 - 3300)			5100 (5000 - 5200)		4
Rúcula	Rucula	ESP	<i>Eruca sativa L.</i>					3600			8100		15
Taioba	Taioba	BRA	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10		5500±500			7400±600		4
Verdolaga	Purslane	PRT	<i>Portulaca oleracea L. ssp. sativa (Haw.) Schubl. &amp; Mart.</i>	Crudo	No	VM	9	3500	<LD	<LD	5400	190	5
Verdolaga	Purslane	BRA	<i>Portulaca oleracea</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10		6500±1300			8800±1800		4

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección  
QA - evaluación de la calidad SAP - saponificación gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

Tabla 5.1. Carotenoides en hortalizas de hoja ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	auroxantina	critoflavina	lactucaxantina	Ref
Achicoria	Chicory	BRA	<i>Cichorium intybus</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2	2050±480	3170±810				26
Achicoria	Chicory	BRA	<i>Cichorium intybus</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	1500	2100				4
Berro	Watercress	BRA	<i>Nasturtium officinale</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2	1770±170	2610±630				26
Berro	Watercress	BRA	<i>Nasturtium officinalis</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	1750 1700 - 1800	2600				4
Cerraja	Sow thistle	BRA	<i>Sonchus oleraceus</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	3100±1600	5800±2300				4
Endibia	Endive	PAN	<i>Cichorium endivia</i>	Crudo	Sí	nw=4			371	106		8
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Crudo		nl=29, nw=2	1250 (490 - 2200)	1600 (970 - 2880)				30
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Salteado	Sí	nl=5	700±200	680±150				6
Endibia	Endive	BRA	<i>Chicorium endivia</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	1900 (1600 - 2200)	2600 (2300 - 2900)				4
Endibia	Endive	BRA		Salteado	Sí	nl=5	700±200	680±150				6
Espinaca de Nueva Zelanda	Spinach, New Zealand	BRA	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	Crudo	No	nl=24, nw=2	1480 (1770 - 2220)	2005 (1580-3930)				30
Espinaca de Nueva Zelanda	Spinach, New Zealand	BRA	<i>Tetragonia expansa</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	2200	3500 3100 - 3900				4
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-Carrascoy)</i>	Crudo	No	nw=4	340±30	590±30				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-España)</i>	Crudo	No	nw=4	320±60	550±100				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-Aitana)</i>	Crudo	No	nw=4	460±40	750±50				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-Collado)</i>	Crudo	No	nw=4	350±10	530±30				31

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	auroxantina	critoflavina	lactuaxantina	Ref
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-Alhama)</i>	Crudo	No	nw=4	410±30	620±40				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-Isasa)</i>	Crudo	No	nw=4	230±30	500±120				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Romaine-AR-29213)</i>	Crudo	No	nw=4	450±60	690±70				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Ricote)</i>	Crudo	No	nw=4	260±20	450±30				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Petra)</i>	Crudo	No	nw=4	250±20	460±10				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Etna)</i>	Crudo	No	nw=4	260±20	430±30				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Urbión)</i>	Crudo	No	nw=4	270±10	480±30				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Sandra)</i>	Crudo	No	nw=4	270±40	490±60				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Maite)</i>	Crudo	No	nw=4	310±30	530±70				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Little Gem - Ferro)</i>	Crudo	No	nw=4	250±40	420±50				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Mini Romaine - Marta)</i>	Crudo	No	nw=4	500±70	750±60				31
Lechuga	Lettuce	ESP	<i>Lactuca sativa</i> <i>L. (Mini Romaine - AR-29232)</i>	Crudo	No	nw=4	390±10	620±30				31
Lechuga, Boston	Lettuce, Boston	BRA	<i>Lactuca sativa</i> <i>var. Boston</i>	Crudo	No	nl=4, nw=2	1050 (660 - 1920)	2655 1250 - 3730				30
Lechuga, Boston	Lettuce, Boston	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2	750±200	1800±490			750±340	26

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	auroxantina	critoflavina	lactuaxantina	Ref
Lechuga, Francesa	Lettuce, French	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	1100	2000				4
Lechuga, Freelite	Lettuce, Freelite	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	540	810				4
Lechuga, lisa	Lettuce, Smooth	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	8700 (7500 - 9900)	1850 (1800 - 1900)				4
Lechuga, rizada	Lettuce, curly	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2	760±160	1870±290			670±180	26
Lechuga, rizada	Lettuce, curly	BRA	<i>Lactuca sativa</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	700 (640±760)	1650 (1400 - 1900)				4
Mastruço, salvaje	Mastruço, wild	BRA	<i>Lepidium pseudodidymum</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	2600±600	6200±1000				21
Rúcula	Rucula	BRA	<i>Amaranthus viridis</i>		No	nl=5, nw=10	870±570	2200±1300				4
Rúcula	Rucula	BRA	<i>Eruca sativa L.</i>	Crudo	No	nl=6, nw=2	1810±550	2970±730				26
Rúcula	Rucula	BRA	<i>Eruca sativa L.</i>	Crudo	No	nl=10, nw=10	1500 (1200 - 1800)	3050 (2100 - 4000)				4
Taioba	Taioba	BRA	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	1800±200	3700±500				4
Verdolaga	Purslane	BRA	<i>Portulaca oleracea</i>	Crudo	No	nl=5, nw=10	2200±300	3600±500				4

SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 6.** Carotenoides en hortalizas de bulbo y tallo ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\beta$ -caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	Ref
Alcachofa	Artichoke	ESP	<i>Cynara scolymus L.</i>	Crudo		nl=4	47±5	163±15				11
Alcachofa	Artichoke	ESP	<i>Cynara scolymus L.</i>	Cocido		nl=4	59±1	275±23				11
Alcachofa	Asparagus	ESP	<i>Asparagus officinalis L.</i>	Crudo		nl=4	320±50	609±20				11
Cebolla	Onion	ESP	<i>Allium cepa L.</i>	Crudo		nl=4	1±0,4	2±0,5	<LD			11
Cebolla	Onion	ESP	<i>Allium cepa L.</i>	Cocido		nl=4	3±0,3	5±0,5	<LD			11

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\beta$ -caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	Ref
Espárragos	Asparagus	ESP	<i>Asparragus officinallis L.</i>	Cocido		nl = 4	387 ± 49	738 ± 25				11
Espárragos (brotes silvestres tiernos)	Asparagus (wild young shoots)	ESP	<i>Asparagus acutifolius L.</i>	Crudo		nw = 8	339 (159 - 421)	544 (410 - 850)		517 (360 - 917)	387 (261 - 574)	16
Espárragos (brotes silvestres tiernos)	Asparagus (wild young shoots)	ESP	<i>Tamus communis L.</i>	Crudo		nw = 8	458 (320 - 599)	1054 (704 - 1735)		1055 (766 - 1897)	510 (380 - 1093)	16
Espárragos (brotes silvestres tiernos)	Asparagus (wild young shoots)	ESP	<i>Bryonia dioica Jacq.</i>	Crudo		nw = 8	669 (149 - 1953)	1913 (683 - 3698)		1737 (172 - 3833)	893 (280 - 2152)	16
Espárragos de lúpulos (brotes silvestres tiernos)	Asparagus (wild young shoots)	ESP	<i>Humulus lupulus L.</i>	Crudo		nw = 8	376 (156 - 1263)	549 (188 - 1720)		723 (132 - 1570)	208 (41 - 673)	16
Pejibaye, naranja	Peach palm, orange	PAN	<i>Bactris gasipaes</i>	Crudo	Sí	nw = 4		90 ± 20	<LD	3100 ± 1600	5800 ± 2300	8
Pejibaye, rojo	Peach palm, red	PAN	<i>Bactris gasipaes</i>	Crudo	Sí	nw = 4		120 ± 20	<LD	1800 ± 200	3700 ± 500	8
Puerro	Leek	ESP	<i>Allium tricoccum L.</i>	Crudo	No	nw = 4	75 (51 - 99)	124 (76 - 171)	12 (5 - 19)			2

SAP - saponificación    QA - evaluación de la calidad    VM - método validado    nl - número de lotes    nw - número de repeticiones    LD - límite de detección  
gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 7.** Carotenoides en hortalizas de raíz sin almidón ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	fitoeno	Ref
Acelga	Beet	CRI	<i>Beta vulgaris cv. Boro</i>	Cocido	Sí	nl = 5, nw = 3					8,84 <sup>^</sup>			1
Acelga	Beet	PAN	<i>Beta vulgaris</i>	Crudo	Sí	nw = 4					5310 ± 610	70 ± 10		8
Acelga	Beet	ESP	<i>Beta vulgaris L.</i>	Crudo		nl = 4		1095 ± 61			1503 ± 101			11
Acelga	Beet	ESP	<i>Beta vulgaris L.</i>	Cocido		nl = 4		1360 ± 34			1960 ± 85			11

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	fitoeno	Ref
Zanahoria	Carrot	PAN	<i>Daucus carota</i>	Crudo	Sí	nw = 4					360 ± 50	ND		8
Zanahoria	Carrot	BRA	<i>Daucus carota</i> cv <i>Nantes</i>	Crudo	No	nl = 6, nw = 2	3500 ± 500	6150 ± 900			510 ± 100			26
Zanahoria	Carrot	CRI	<i>Daucus carota</i> cv. <i>Bangor</i>	Cocido	Sí	nl = 6, nw = 3	2390	4500 4313*		86,4 85,4**	2970 <sup>^</sup>			1
Zanahoria	Carrot	CRI	<i>Daucus carota</i> cv. <i>Bangor</i>	Crudo	Sí	nl = 3, nw = 3	3860	7100 6920*		149 146**	157 <sup>^</sup>			1
Zanahoria	Carrot	ESP	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>	Crudo		nl = 4	2895 ± 276	6628 ± 45*			288 ± 33			11
Zanahoria	Carrot	ESP	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>	Cocido		nl = 4	3245 ± 128	8162 ± 364*			273 ± 35			11
Zanahoria	Carrot	ESP	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>	Crudo	No	nw = 4							1769 ± 86	2
Zanahoria	Carrot	ESP	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>	Cocido	No	nw = 4							1197 ± 414	2
Zanahoria	Carrot	ESP	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>										7460-12440	29
Zanahoria	Carrot	MEX	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>	Crudo			830	3078						19
Zanahoria	Carrot	MEX	<i>Daucus carota</i> <i>L.</i>				13060 (6350 - 19769)	52268 (34659 - 69876)						19

\* isómeros-E    \*\* isómeros-Z    ^ incluye zeaxantina    SAP - saponificación    QA - evaluación de la calidad    VM - método validado    nl - número de lotes    nw - número de repeticiones    LD - límite de detección    gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 8.** Carotenoides en hortalizas de vaina ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	neoxantina	violaxantina	Ref
Judía verde	Green bean	BRA		Cocido	Sí	nl = 15		163 (130 - 200)			243 (220 - 290)	<LD	<LD	6
Judía verde	Green bean	BRA		Salteado	Sí	nl = 15, nw = 2	<LD	178 (170 - 180) 2667* (2500 - 2900)*			273 (250 - 290)	<LD	<LD	6
Judía verde	Green bean	ESP	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Savi</i>	Crudo		nw = 4	57 (35 - 79)	202 (166 - 238)			426 (365 - 487)			11

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	neoxantina	violaxantina	Ref
Judía verde francesa	String bean	CRI	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Provider	Cocido	Sí	nl=6, nw=2	80	476 371*	19.4	18,2**	1160 <sup>^</sup>			1

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z <sup>^</sup> incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 9. Carotenoides en frutas de baya ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Fresa	Strawberry	BRA	<i>Fragaria vesca</i> L., var. <i>Oso Grande</i>	Crudo		VM, nl=2; nw=6		53,55 (53,02 - 54,08)		<LD			34
Fresa	Strawberry	ESP	<i>Fragaria elatior</i> , Ehrh.	Crudo	No	nw=3	<LD	5.5	ND	<LD	14.5	0.9	2, 24
Fresa	Strawberry	ESP	<i>Fragaria elatior</i> , Ehrh.	Crudo	Sí	nw=3	<LD	3,7 $\pm$ 1	ND	<LD	13,6 $\pm$ 7	0.6	2, 24
Goji	Goji berries	ESP	<i>Lycium barbarum</i>	Crudo	Sí	n=3	<LD	483	1100	<LD	331	3260	15
Grosella	American gooseberry	BRA	<i>Pereskia aculeata</i> Mill	Crudo	Sí	nw=3	2270 $\pm$ 60	3430 $\pm$ 60* 280 $\pm$ 10**	220 $\pm$ 20		650 $\pm$ 40	270 $\pm$ 20***	32
Rosa silvestre	Wild rose	ESP	<i>Rosa mosqueta</i> ( <i>Rosa rubiginosa</i> , <i>Rosa eglanteria</i> )		Sí	nl=10		49760 $\pm$ 32,1	18350 $\pm$ 12,6	39190 $\pm$ 28,3		26660 $\pm$ 15,3	7
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera</i> L.		Sí	nl=4		6576 $\pm$ 2,57		24244 $\pm$ 31,69*		435 $\pm$ 0,78*	33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera</i> L.			nl=4			742 $\pm$ 0,44*			398 $\pm$ 0,37* (monomiristato)	33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera</i> L.			nl=4			734 $\pm$ 0,67* (caprato)				33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera</i> L.			nl=4			888 $\pm$ 0,74* (laurato)				33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera</i> L.			nl=4			886 $\pm$ 0,83* (miristato)				33

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera L.</i>			nl=4			97±0,02* (oleato)				33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera L.</i>			nl=4			526±0,11* (palmitato)				33
Zarzaparrilla	Sarsaparille	ESP	<i>Smilax aspera L.</i>			nl=4			341±0,32* (estearato)				33

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 9.1.** Carotenoides en frutas de baya ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	neoxantina	violaxantina	neurosporeno	anteraxantina	licofilo	rubixantina	gazanixantina	Ref
Rosa silvestre	Wild rose	ESP	<i>Rosa mosqueta (Rosa rubiginosa, Rosa eglanteria)</i>	Sí	nl=10		70370±40,5	28920±21,1					7
Zarzaparrilla	Sarsaparilla	ESP	<i>Smilax aspera L.</i>	Sí	nl=4	1370±2,11			58±0,21	1370±2,11			33

^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 10.** Carotenoides en cítricos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Limón	Lemon	ESP	<i>Citrus limonis, Osbeck</i>	SÍ	nw=3	<LD	0.4	14,4±2	ND	2,5±0,3	1,2±0,3	2, 24
Limón, dulce	Lemon, sweet	CRI	<i>Citrus limetta var. native</i>	Sí	nl=4, nw=3	28.1	261	428				1
Mandarina	Mandarin	PAN	<i>Citrus reticulata</i>	SÍ	nw=4					200±30	210±20	35
Mandarina	Mandarin	ESP	<i>Citrus reticulata</i>	SÍ	nw=4	<LD	213±102	843±216	<LD	<LD	<LD	2

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Mandarina	Mandarin	PAN	<i>Citrus reticulata</i>	Sí						200 ± 30	210 ± 20	8
Mandarina	Tangerine	CRI	<i>Citrus nobilis var. native</i>	Sí	nl=6, nw=3	28.1	261	428		166 <sup>^</sup>		1
Mandarina, zumo	Mandarin, juice	PAN	<i>Citrus reticulata</i>	Sí	nw=4					160 ± 20	170 ± 30	35
Mandarina, zumo	Tangerine, juice	ESP	<i>Citrus reticulata L.</i>					800				36
Naranja	Orange	PRT	<i>Citrus sinensis L. var. navel lane late</i>	Sí	VM, nl=4; nw=2	13* (11-27)*	31* (17-49)*	180* (110-230)*	ND	37 (34 - 72)	86 (66 - 190)	5
Naranja	Orange	PAN	<i>Citrus sinensis</i>	Sí	nw=4					30 ± 10	30 ± 10	35
Naranja	Orange	ESP	<i>Citrus sinensis L. var Navel late</i>	Sí		5 ± 0,0	9 ± 0,0	85 ± 0,0 1		36 ± 0,00* 14 ± 0,00**	47 ± 0,00*	37
Naranja	Orange	CRI	<i>Citrus sinensis cv. Valencia</i>	Sí	nl=3, nw=3	23.1	41,8 29,2*	47.3		312 <sup>^</sup>		1
Naranja	Orange	ESP	<i>Citrus sinensis L.</i>	No	nw=3		42.5	58.9	ND	11.2	12.4	2, 24
Naranja	Orange	ESP	<i>Citrus sinensis L.</i>	Sí	nw=3	12,8 ± 5	48,4 ± 12	448,3 ± 27	ND	68 ± 20	65,6 ± 19	2, 24
Naranja, injertada	Orange, grafted	PAN	<i>Citrus sinensis</i>	Sí	nw=4					70 ± 20	110 ± 20	8
Naranja, injertada, zumo	Orange, grafted, juice	PAN	<i>Citrus sinensis</i>	Sí	nw=4					50 ± 10	60 ± 10	8
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis L. var Navel late</i>	Sí	nl=2	4,5 (4 - 5)	8,5 (8 - 9)	78 (71 - 85)		33* (30 - 35)* 13** (11 - 14)**	44* (40 - 47)*	37
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis L. var Valencia late</i>	Sí	nl=18	29 (27 - 32)	78 (72 - 88)	168 (166 - 209)	26** (26 - 41)**	126* (117 - 139)*	219* (193 - 252)* 106** (99 - 140)**	38
Naranja, zumo	Orange, juice	PAN	<i>Citrus sinensis</i>	Sí	nw=4					10 ± 10	10 ± 10	8

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP		Sí	nl = 17	11 ± 5	21 ± 7	69 ± 27				39
Naranja, zumo	Orange, juice	CRI	<i>Citrus sinensis</i> cv. Valencia	Sí	nl = 6, nw = 3	3.78	35,4 27,7*	5.87		26,6 <sup>^</sup>		1
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L.		nl = 25			0,041 ± 0,022	0,003 ± 0,004	0,023 ± 0,009	0,035 ± 0,011	40
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L.					0,0-100				36
Naranja, zumo	Orange, juice	BRA	<i>Citrus sinensis</i> L. cv. Valencia					100-800				41
Pomelo, rojo	Grapefruit, red	PAN	<i>Citrus grandis</i>	Sí	nw = 4					20 ± 10	20 ± 10	35

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

TABLA 10.1. Carotenoides en cítricos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	Z-caroteno	auroxantina	luteoxantina	zeinoxantina	anteraxantina	neocromo	violaxantina	mutatoxantina	fitoeno	Ref
Naranja	Orange	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L. var Navel late	Sí		46 ± 0,01	177 ± 0,07				46 ± 0,01 13 ± 0,00**		76 ± 0,01**		37
Naranja	Orange	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L.	No	nw = 4									1065 ± 74	2
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L. var Navel late	Sí	nl = 2	42 (37 - 46)	152 (139 - 164)				41 (37 - 44) 12** (10 - 13)**		67** (61 - 72)**		37
Naranja, zumo	Orange, juice	ESP	<i>Citrus sinensis</i> L. var Valencia late	Sí	nl = 18			58 (52 - 60)	61 (56 - 70)	323 (278 - 373)		336 (283 - 412)	109** (106 - 115)**		38

\*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 11.** Carotenoides en frutas de pepita ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. bravo esmolfe</i>	Sí	VM, nl=2, nw=2	1.3	10.0	0.9	<LD	17.0	1.9	5
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. golden delicious</i>	Sí	VM, nl=7, nw=2	<LD	49 (34 - 63)	<LD	<LD	2,4 (1,6 - 3,2)	1,8 (<LD - 1,8)	5
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. jonagold</i>	Sí	VM, nl=5	<LD	26.0	<LD	<LD	3.5	<LD	5
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. reineta parda</i>	Sí	VM, nl=5	<LD	17.0	4.0	<LD	10.0	2.0	5
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. royal gala</i>	Sí	VM, nl=5, nw=2	<LD	11.0	<LD	<LD	2.2	3.0	5
Manzana	Apple	PRT	<i>Malus domestica</i> <i>Borkh var. starking</i>	Sí	VM, nl=9, nw=2	<LD	36 (13 - 48)	<LD	<LD	10 (9,7 - 16)	1,8 (<LD - 2,2)	5
Manzana	Apple	CRI	<i>Malus domestica cv.</i> <i>Delicious</i>	Sí	VM, nl=5, nw=2		27,6 23,5*	12.1		24,6^		5
Manzana	Apple	ESP	<i>Pyrus malus L.</i>	No	nw=3	<LD	18.7	<LD	<LD	1.5	<LD	2, 24
Manzana	Apple	ESP	<i>Pyrus malus L.</i>	Sí	nw=3	<LD	20,5±4	7,9±4	<LD	6,2±0,6	0.6	2, 24
Membrillo	Quince	PAN	<i>Gustavia superba</i>	Sí	nw=4					670±50	3760±400	8
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Lindl. (Centenária)</i>	Sí	nw=2		858,5* 28,1**	278,4* 5,8**		3,9*		42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Lindl. (Mizauto)</i>	Sí	nw=2		980,9* 64,1**	480,2* 15,1**		12,5*		42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Lindl. (Mizuho)</i>	Sí	nw=2		1090,7* 66,9**	557,6* 20,1**		13,5*		42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Lindl. (Mizumo)</i>	Sí	nw=2		1441,5* 51,9**	715,2* 16,6**		7,9*		42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>Lindl. (Néctar de Cristal)</i>	Sí	nw=2		38,1* 7,3**	54,8* 4**		6,4*		42
Níspero	Loquat	CRI	<i>Eriobotrya japonica</i> <i>var. Native</i>	Sí	nl=3, nw=3		73,3 55,9*	24.3		106^		1

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Níspero japonés	Japanese medlar	ESP		Sí	nw=4	<LD	977±132	663±109	<LD	<LD	<LD	2
Pera	Pear	PRT	<i>Pyrus communis L., var. rocha</i>	Sí	VM, nl=3, nw=2	<LD	<LD	1,8 (0,9-2,5)	<LD	7,5 (4,3-8,8)	<LD	5
Pera	Pear	CRI	<i>Pyrus communis cv. Green Anjou</i>	Sí	VM, nl=3, nw=3		27.6	12.2		24,6^		1
Pera	Pear	ESP	<i>Pyrus communis L.</i>	No	nw=3	<LD	0.7	0.4	<LD	2.4	<LD	2, 24
Pera	Pear	ESP	<i>Pyrus communis L.</i>	Sí	nw=3	<LD	2,5±0,5	2,9±0,3	<LD	11,3±2	<LD	2, 24

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes  
nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 11.1. Carotenoides en frutas de pepita ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	fitoeno	violaxantina	neoxantina	neocromo	Ref
Manzana	Apple	ESP	<i>Pyrus malus L.</i>	No	nw=3	ND				2, 24
Manzana	Apple	ESP	<i>Pyrus malus L.</i>	Sí	nw=3	ND				2, 24
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica Lindl. (Centenária)</i>	Sí	nw=2	25,3 1,7* 12,5**	9,3*, *** 2,4**	<LD	0,3*	42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica Lindl. (Mizauto)</i>	Sí	nw=2	22 1,9* 8,5**	12,9*, **** 5,4**	<LD	1,5*	42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica Lindl. (Mizuho)</i>	Sí	nw=2	22,1 3,3* 10,1**	22,7*, **** 7,1**	<LD	1,9*	42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica Lindl. (Mizumo)</i>	Sí	nw=2	34 3,4* 19,3**	28,2*, **** 12,8**	<LD	6,4*	42
Níspero	Loquat	BRA	<i>Eriobotrya japonica Lindl. (Néctar de Cristal)</i>	Sí	nw=2	<LD	4,4*, **** 2,3**	0,2*	1,2*	42
Pera	Pear	ESP	<i>Pyrus communis L.</i>	No	nw=3	12.1				2, 24
Pera	Pear	ESP	<i>Pyrus communis L.</i>	Sí	nw=3	28,5±8				2, 24

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z \*\*\*incluye  $\alpha$ -criptoxantina \*\*\*\*incluye 9-cis-neoxantina SAP - saponificación QA - Evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - Límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 12.** Carotenoides en frutas de hueso ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	anteraxantina	violaxantina	fitoeno	Ref
Albaricoque	Apricot	PAN	<i>Prunus armeniaca</i>	Sí	nw=4					60 $\pm$ 10	30 $\pm$ 10				8
Albaricoque	Apricot	ESP	<i>Prunus armeniaca L.</i>	No	nw=3	ND	132	11.1	<LD	<LD	<LD			3151 $\pm$ 613	2, 24
Albaricoque	Apricot	ESP	<i>Prunus armeniaca L.</i>	Sí	nw=3	ND	140 $\pm$ 25	27,5 $\pm$ 11	<LD	<LD	<LD				2, 24
Cereza	Cherry	PRT	<i>Prunus avium L., var. de sacco</i>	Sí	VM, nl=3, nw=2	29 $\pm$ 6,96* (23-37)	82 $\pm$ 4,59* (78-87)	21 $\pm$ 2,73* (23)	(18- <LD	130 $\pm$ 2,73 (100-160)	27 $\pm$ 0,43 (16-33)				5
Cereza	Cherry	ESP	<i>Prunus avium L.</i>	No	nw=3	<LD	14.3	2.7	12.8	2.6	<LD				2, 24
Cereza	Cherry	ESP	<i>Prunus avium L.</i>	Sí	nw=3	1,6 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 5	4,8 $\pm$ 1	10,2 $\pm$ 0	44,3 $\pm$ 12	4,1 $\pm$ 0,4				2, 24
Ciruella	Plum	ESP	<i>Prunus domestica</i>	Sí	nw=4	ND	117 $\pm$ 18	ND	Nd	83 $\pm$ 8	ND				2
Ciruella, europea	Plum, european	PAN	<i>Prunus domestica</i>	Sí	nw=4					90 $\pm$ 20	10 $\pm$ 10				8
Melocotón	Peach	PRT	<i>Prunus persica L. var. M Carnival</i>	Sí	VM	8,2*	170*	210*	<LD	75	26				5
Melocotón	Peach	BRA	<i>Prunus persica (Diamante)</i>	Sí	nl=5, nw=2		40 $\pm$ 6*	640 $\pm$ 110 590 $\pm$ 110 *				12			43
Melocotón	Peach	BRA	<i>Prunus persica (Coral)</i>	Sí	nl=5, nw=2		3 $\pm$ 4*	8 $\pm$ 0 8 $\pm$ 0*							43
Melocotón	Peach	BRA	<i>Prunus persica (Xiripá)</i>	Sí	nl=5, nw=2		6 $\pm$ 1*	7 $\pm$ 1 6 $\pm$ 2 *							43
Melocotón	Peach	ESP	<i>Prunus persica Sieb. (hybrid)</i>	No	nw=3	3.2	69.2	15.9	ND	1.5	10.1			524 $\pm$ 125	2, 24
Melocotón	Peach	ESP	<i>Prunus persica Sieb. (hybrid)</i>	Sí	nw=3	3,5 $\pm$ 2	64 $\pm$ 0,2	73,5 $\pm$ 13	ND	15,7 $\pm$ 4	31,5 $\pm$ 9				2, 24
Melocotón, enlatado	Peach, canned	CRI	<i>Prunus persica</i>	Sí	VM, nw=3	8.64	858 646*	614	47,3 13,6*	535^					1
Nectarina	Nectarine	PAN	<i>Prunus persica</i>	Sí	nw=4					30 $\pm$ 10	20 $\pm$ 10				8

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 13.** Carotenoides en frutas tropicales y subtropicales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.	piel roja		nl=24, nw=2	60 (30 - 110)	1220 (540 - 3810)	95 (30 - 120)		115 (70 - 160)		44
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia emarginata</i> DC / <i>Malpighia glabra</i> L.	rojo-naranja	Sí	nw=3		573,17 $\pm$ 33,21 536,55 $\pm$ 27,31*	417,46 $\pm$ 17,11		108,03 $\pm$ 10,32 99,21 $\pm$ 10,21*		45
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia punicifolia</i> L. var. <i>Olivier</i>		Sí	nl=3, nw=2	14,1 $\pm$ 0,8	869,4 $\pm$ 41,5	22,1 $\pm$ 2,4		48,0 $\pm$ 9,5	3,3 $\pm$ 0,6	46
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia punicifolia</i> L. var. <i>Waldy Cati 30</i>		Sí	nl=3, nw=2	7,8 $\pm$ 3,3	265,5 $\pm$ 92,5	16,3 $\pm$ 4,1		70,7 $\pm$ 49,6	0,1 $\pm$ 0,1	46
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia punicifolia</i> L., var. <i>Olivier</i>			Vm, nl=2, nw=6		4308 (2486 - 6130)	<LD				34
Acerola, pulpa	Acerola, pulp	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.			nl=17, nw=2	30 (10 - 50)	1005 (300 - 1650)	65 (20 - 100)		100 (<LD - 120)		44
Acerola, zumo	Acerola, juice	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.			nl=13, nw=2	30 (20 - 70)	800 (270 - 1010)	100 (40 - 100)		50 (20 - 60)		44
Aguacate	Avocado	PAN	<i>Persea americana</i>		Sí	nw=4					320 $\pm$ 40	<LD	35
Aguacate	Avocado	ESP				nw=4	29 $\pm$ 1	81 $\pm$ 7	40 $\pm$ 2	ND	314 $\pm$ 18	ND	2
Aguacate	Avocado	CRI	<i>Persea Americana</i> cv. <i>Hass</i>	verde	Sí	nl=3, nw=3	76	199	121	28,9	619 <sup>^</sup>		1
Ambarella	Tahitian apple	PAN	<i>Spondias dulces</i>		Sí	nw=4					50 $\pm$ 20	10 $\pm$ 10	8
Arazá	Araza	BRA	<i>Eugenia stipitata</i> McVaugh			nl=6	64 (31 - 96)	94 (44 - 143)	95 (47 - 142)		455 (154 - 756)	81 (17 - 114)	47
Banano, maduro	French Plantain, ripe	PAN	<i>Musa paradisiaca</i> (AAB)	Crudo	Sí	nw=4					150 $\pm$ 20	<LD	8
Banano, verde	French Plantain, green	PAN	<i>Musa paradisiaca</i> (AAB)	Crudo	Sí	nw=4					40 $\pm$ 10	<LD	8
Buriti	Buriti	BRA	<i>Mauritia vinifera</i>					37200* 8700**					48
Camu-camu	Camu camu	BRA	<i>Myrciaria dubia</i>		Sí	nl=6		107,6 (72,8 - 142,3)	8,4 (6,9 - 9,9)		381,2* (160,5 - 601,9)*	30,5 (22,9 - 38,0)	35

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Canistel	Canistel	MEX	<i>Pouteria campechiana</i>	naranja-amarillo	No	nw = 2		710 ± 70					7
Canistel	Canistel	PAN	<i>Pouteria campachiana</i>		Sí	nw = 4					<LD	1970 ± 160	8
Caqui	Persimmon	BRA	<i>Diospyros kaki L., var. Rama Forte</i>			Vm, nl_2, nw = 6		674,42 (645,60 - 703,24)		510,57 (453,27 - 567,87)			34
Caqui	Pineapple	PAN	<i>Ananas comosus</i>		Sí	nw = 4					10 ± 10	10 ± 10	8
Cerezas	Cherry	PAN	<i>Bunchosia nitida</i>		Sí						750 ± 60	<LD	8
Cocona	Apple-peach tomato	BRA	<i>Solanum sessiliflorum</i>		Sí	nw = 3	0,45 ± 0,00*	64,35 ± 1,99* 12,87 ± 0,36**	0,72 ± 0,00*				49
Cocona	Cocona	PAN	<i>Solanum sessiliflorum</i>		Sí	nw = 4					40 ± 20	<LD	8
Cocu/chal-chal	Frutita	PAN	<i>Ailophylus psilospermus</i>	rojo									50
Corozo	Corozo	PAN	<i>Aiphanes aculeate</i>	amarillo-rojo	Sí	nw = 4					<LD	7920 ± 1030	50
Curuguá	Cassabanana	PAN	<i>Sicana odorifera</i>		Sí	nw = 4					10 ± 10	40 ± 10	8
Goiaba	Guava	BRA	<i>Psidium guajava L. var. Paluma</i>		No	nl = 4, nw = 5		378,6 (351,3 - 432,4)		6794,1 (6999,3 - 7649,9)			51
Goiaba	Guava	BRA	<i>Psidium guajava L. var. Paluma</i>		No	nw = 5		366,3 ± 64		6999,3 § 2420,5			52
Goiaba	Guava	COL	<i>Psidium guajava L. var. Regional roja</i>	rosa	No	nl = 6		155 ± 38		2316 (1825 - 2807)	7 (3 - 11)		53
Goiaba	Guava	PAN	<i>Psidium guajava</i>	amarillo	Sí	nw = 4					40 ± 10	20 ± 10	8
Guanábana	Red guava	PAN	<i>Psidium guajava</i>		Sí	nw = 4					120 ± 20	<LD	8
Guanabana toreta	Soncoya	PAN	<i>Annona purpurea</i>		Sí	nw = 4					230 ± 20	680 ± 90	8
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nl = 6, nw = 3		9733 (7600 - 11900)			14133 (10200 - 18700)		54
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	crema y amarillo	No	nl = 3, nw = 2	1,26 (<LD - 2,06)	33,32* (8,33 - 45,12)* 3,75** (1,06 - 5,84)**	1,22* (0,67 - 1,76)*		55,61* (10,36 - 55,61)*	<LD* (<LD - 2,23)*	55

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Jobo	Caja	BRA	<i>Spondias lutea</i>	naranja	Sí	nl=17	107 (79 - 148)	186 (137 - 208) 40** (29 - 50)**	633 (554 - 819) 61** (37 - 82)**		523 (352 - 616)		56
Jobo	Mombin	PAN	<i>Spondias mombin</i>		Sí	nw=4					860±70	120±20	8
Jobo	Mombin	COL	<i>Spondias mombin</i>	amarillo	Sí						630±50	80±10	8
Jocote	Hog plum	CRI	<i>Spondia purpurea</i> var. <i>Tronador</i>	rojo	Sí	nl=3, nw=3		73,3 55,9*	24.3		106^		1
Jocote	Purple mombin	PAN	<i>Spondias purpurea</i>		Sí	nw=4					630±50	80±10	8
Kiwi	Kiwi	PAN	<i>Actinidia deliciosa</i>		Sí	nw=4					70±10	<LD	8
Kiwi	Kiwi	ESP	<i>Actinidia chinensis</i>	amarillo	No	nw=3	<LD	32	<LD	<LD	41	<LD	15
Kiwi	Kiwi	ESP	<i>Actinidia chinensis</i>	verde	Sí	nw=4	<LD	16±3	<LD	<LD	96±17	<LD	2
Mamey zapote	Orange mamey	PAN	<i>Pouteria sapota</i>	naranja	Sí	nw=4					<LD	<LD	8
Mamey zapote	Red mamey	PAN	<i>Pouteria sapota</i>	rojo	Sí	nw=4					<LD	<LD	8
Mamón limoncillo	Spanish lime	CRI	<i>Melicocca bijuga</i> var. <i>Native</i>		Sí	nl=3, nw=3		73,3 55,9*	24.3		106^		1
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. var. <i>Tommy Atkins</i>		No	nl=4, nw=5		1652,3 (1409,1 - 1557,1)		75.8 (57,4 - 81,2)			51
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. var. <i>Tommy Atkins</i>		No	nw=5		1557,1±180,2		77,2±58,4			52
Mango	Mango	PAN	<i>Mangifera indica</i>		Sí	nw=4					60±10	50±10	8
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> L. cv <i>Ataulfo</i>	rojo-naranja	No	nw=2		3197*					57
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> L. cv <i>Manila</i>	rojo-naranja	No	nw=2		3558*					57
Mango	Mango	CRI	<i>Mangifera indica</i> cv. <i>Tommy Atkins</i>		Sí	nl=6, nw=3	19.4	838 762*	12.40	27,1 25,8**	40.9		57
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. cv. <i>Tommy Atkins</i>	amarillo	Sí	nl=3		580±250*		30±10* 10±10**	60±10	50±10 40±20*	58

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> <i>L. cv. Keitt</i>	amarillo	Sí	nl=3		670±160*	20±00* 30±20**			80±30*	58
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> <i>L. cv. Keitt</i>	amarillo	Sí	nl=3		1510±150*	30±0*			80±20*	59
Mango	Mango	ESP	<i>Magnifera indica</i> <i>L.</i>	rojo-naranja	Sí	nw=3	ND	152	ND	ND	ND	ND	15
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> <i>cv. Tommy Atkins</i>					1200					60
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> <i>cv. Haden</i>					2800					60
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> <i>cv. Ataulfo</i>					1600					60
Manzana de cajú	Cashew apple	CRI	<i>Anacardium occidentale</i> var. <i>Native</i>	rojo	Sí	nl=3, nw=3	109	935 792*	137		56,0^		1
Manzana de cajú	Cashew apple	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.		Sí	nl=3	8	28	30		93	46	61
Manzana de cajú, concentrado	Cashew apple, concentrated	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl=25	14,99±1,95	14,22±2,15**	6,85±3,56 3,27±0,85**		0,20±0,18		62
Manzana de cajú, listo para beber	Cashew apple, ready to drink	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl=5	1,65±1,64	1,96±1,77**	1,81±0,95 0,56±0,17**		0,56±0,18		62
Manzana de cajú, néctar	Cashew apple, nectar	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl=5	1,08±0,55	0,93±0,29**	1,37±0,57 0,37±0,03**		0,36±0,14		62
Manzana de cajú, pulpa	Cashew apple, pulp	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl=20	31,81±12,82	16,11±5,39**	35,87±10,88 10,48±2,12**		4,20±2,01		62
Manzana de cajú, zumo concentrado, azucarado	Cashew apple, concentrated juice, sweetened	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl=5	5,41±1,15	2,44±0,48**	14,21±4,97 2,72±0,97**		3,54±0,74		62
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>Passiflora cincinnata</i> Mast <i>CPAC MJ-26-01 redondo/ CPAC MJ-26-02 cabaça</i>	crema					(30-60)±10*				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. nitida</i> Kunth <i>CPAC MJ-01-03</i>						5±0*				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. setacea</i> D. C. <i>CPAC MJ-12-01- BRS Pérola do Cerrado</i>	amarillo claro					66±9* 8±0**				63

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims</i> <i>CPAC MJ-36-01</i>	amarillo oscuro				284±0,6* 38±0,8**	24±2				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims</i> <i>CPAC MJ-21-01</i>	amarillo oscuro				260±10*	20 § 3				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims.</i>					570* (360 - 780)* 39** (37 - 40)**	178 (175 - 180)				63
Maracuyá	Passion fruit	PAN	<i>Pasiflora edulis</i>		Sí	nw = 4					10±10	20±10	8
Maracuyá	Passion Fruit	BRA	<i>Passiflora edulis</i> <i>var. Flavicarpa</i>	amarillo- blanco	Sí						10±10	20±10	64
Maracuyá chino	Chinese passion fruit	PAN	<i>Cionosicyos macranthus</i>	rojo							<LD	280±20	50
Nance	Nance	PAN	<i>Birsonimia crassiflora</i>		Sí	nw = 4					70±10	20±10	8
Naranjilla	Naranjilla	PAN	<i>Solanum quitoense</i>	amarillo- verde	Sí	nw = 4					190±30	<LD	8
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>L. var. Formosa (control)</i>		Sí	nw = 5		548,6±175,1	3798,6±278,0	3137,5±596,3			51
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>L. var. Formosa (after preparation)</i>		Sí	nw = 5		468,1±224,3	3477,0±1043,7	3131,4±1485,8			51
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>L. var. Formosa (during distr.)</i>		Sí	nw = 5		598,0±103,4	4097,3±596,9	4281,0±635,6			51
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>L. var. Formosa (final distr.)</i>		Sí	nw = 5		513,9±256,9	3435,0±1723,2	3105,4±1482,7			51
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>(Formosa)</i>	rojo- naranja	Sí	nl=5, nw=2		120±50*	700±170 670±170*	2300±750 1970±630*			43
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>(Sunrise)</i>	rojo- naranja	Sí	nl=5, nw=2		50±160*	820±120 760±120*	2390±920 2070±790*			43
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>(Golden)</i>	naranja	Sí	nl=5, nw=2		120±30*	870±90 810±90*	1850±640 1630±450*			43
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya</i> <i>L. var. Formosa</i>		No	nw = 5		548,6±175,1	3798,6±278	3137,5±596,3			52
Papaya	Papaya	CRI	<i>commercial line</i> <i>Criolla</i>	rojo				200±57	191±75 116±31 C 243±64 L 77 § 21 M	1981±325* 194±41**			65

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Papaya	Papaya	CRI	<i>commercial F1 hybrid Pococí, marketed as "Papaya Perfecta"</i>	rojo				514 ± 114	233 ± 15 329 ± 63 C 899 ± 188 L 218 ± 55 M	3264 ± 362* 436 ± 82**			65
Papaya	Papaya	CRI	<i>F1 hybrid Industrial 10P</i>	rojo				534 ± 138	246 ± 67 269 ± 39 C 870 ± 116 L 178 ± 25 M	3861 ± 691* 412 ± 23**			65
Papaya	Papaya	CRI	<i>F1 hybrid Industrial 10G</i>	rojo				554 ± 114	296 ± 52 272 ± 49 C 839 ± 148 L 197 ± 35 M	3858 ± 614* 448 ± 83**			65
Papaya	Papaya	CRI	<i>wild type line Silvestre</i>	amarillo				270 ± 79	393 ± 31 229 ± 83 C 747 ± 132 L 271 ± 35 M	12 ± 5* <LD**			65
Papaya	Papaya	CRI	<i>line Sunset</i>	rojo				283 ± 77	160 ± 21 364 ± 69 C 1080 ± 184 L 203 ± 27 M	1861 ± 321* 453 ± 97**			65
Papaya	Papaya	CRI	<i>line MHR 21-4-6 (cross-breeding of Silvestrex Sunset x Maradol)</i>	amarillo				508 ± 80	494 ± 51 540 ± 109 C 1216 ± 226 L 242 ± 22 M	9 ± 5* <LD**			65
Papaya	Papaya	MEX	<i>Carica papaya cv. Maradol</i>	rojo-naranja	Sí	nw = 3		(230-310)	(310-800(	(150-1200)			66
Papaya	Papaya	CRI	<i>Carica papaya cv. Pococi hybrid</i>	naranja	Sí	nl=6, nw=3	12.5	358 330*	404	1040*		40,1^	1
Papaya	Papaya	BRA	<i>Carica papaya L. cv. Golden</i>						300*	1300* 100**			67
Papaya	Papaya	PAN	<i>Carica papaya</i>	rojo	Sí	nw = 4					20 ± 10	60 ± 10	8
Papaya	Papaya	PAN	<i>Carica papaya</i>	amarillo	Sí	nw = 4					10 ± 10	<LD	8
Papaya, red	Red papaya	PAN	<i>Carica papaya</i>	naranja	Sí						20 ± 10	60 ± 10	8
Pejibaye de montaña	Black palm	PAN	<i>Astrocaryum standleyaum</i>		Crudo	Sí	nw = 4				440 ± 30	ND	8
Pejibaye/ Chontaduro	Pejibaye	CRI	<i>Bactris gasipaes H.B.K.</i>	rojo-naranja	Sí	nw = 6	1369,6 ± 21,4* equiv $\beta$ Car	4108,8 ± 72,76* equiv $\beta$ -car					68
Pejibaye/ Chontaduro	Pejibaye	BRA	<i>Bactris gasipaes Kunth</i>					5600* 600**					48

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Pejibaye/ Chontaduro	Pejibaye	CRI	<i>Bactris gasipaes Kunth</i>			nl=6		(500-8500)* (100-1300)**					69
Pejibaye/ Chontaduro	Pejibaye	CRI	<i>Bactris gasipaes Kunth</i>	naranja		nl=2		(3000-5200)* (1400-1600)**					70
Pejibaye/ Chontaduro, cocido	Pejibaye, cooked	CRI	<i>Bactris gasipaes cv. Utilis-Tucurrique</i>		Sí	nl=3, nw=3	4.23	93,2 59,1*		84,2 20,5*	1,55^		1
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Bolivia</i>	rojo	Sí	nw=10	700	8540*		390*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Darien</i>	rojo	Sí	nw=10	500	5140*		590*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Brasil</i>	rojo	Sí	nw=10	190	1720*		170*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw=10	290	1930*		140*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw=10	120	1590*					69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Guatuso</i>	amarillo claro	Sí	nw=10	30	510*					69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Bolivia</i>	rojo	Sí	nw=10	680	4960*		3970*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Darien</i>	rojo	Sí	nw=10	740	4170*		5350*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Brasil</i>	rojo	Sí	nw=10	310	1960*		2200*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw=10	340	1510*		1160*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw=10	170	1710*		480*			69
Pejibaye/ Chontaduro, fruto	Pejibaye fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Guatuso</i>	amarillo claro	Sí	nw=10	30	400*		100*			69

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Piña	Pineapple	CRI	<i>Ananas comosus</i> <i>L. cv. MD2</i>		Sí	nl=3, nw=3					0,27^		1
Piña	Pinneapple	PAN	<i>Ananas comosus</i>	amarillo	Sí						10 ± 10	10 ± 10	8
Piña	Pinneapple	ESP	<i>Ananas sativus</i>	amarillo	No	n2=3	ND	57	ND	ND	ND	ND	15
Piquiá, lío­filizado	Caryocar villosum fruits, lyophilized	BRA	<i>Caryocar villosum</i>	amarillo	No	nw=3		70 § 4*			90 ± 20*	290 ± 30*	71
Pitanga	Pitanga	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> <i>L.</i>			nl=20, nw=2		200 (140 - 320)	970 (700 - 1280)	2375* (700 - 7110)* 235** (40 - 500)**	210 120 - 310		72
Pitanga, pulpa	Pitanga, pulp	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> <i>L.</i>			nl=2, nw=2		380 ± 0,2	1150 ± 0	1660 ± 0,3* 110 ± 0,1**	100 ± 0		72
Pitanga, zumo	Pitanga, juice	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> <i>L.</i>			nl=2, nw=2		190 ± 0,2	910 ± 2,1	2300 ± 3,6* 230 ± 0,4**	70 ± 0,5		72
Pitanga, zumo	Pitanga, zumo	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> <i>L.</i>			nl=5, nw=2		150 ± 0,6	710 ± 1,6	2560 ± 7,8* 230 ± 0,9**	40 ± 0,2		72
Plátano	Banana	CRI	<i>MuAAA cv.</i> <i>Grand naine</i>	amarillo	Sí	nl=2, nw=3	56.5	36.9			39,7^		1
Plátano	Banana	ESP	<i>Musa paradisíaca L.</i>		No	nw=3	57.7	69	ND	ND	ND	ND	2, 24
Plátano	Banana	ESP	<i>Musa paradisíaca L.</i>		Sí	nw=3	63,1 ± 24	77,3 ± 28	ND	ND	7,4 § 2	ND	2, 24
Plátano de cocinar	Plantain	PAN	<i>Musa paradisíaca</i>		Sí	nw=4					40 § 20	<LD	8
Plátano de cocinar, cocida	Plantain, Cocido	CRI	<i>Musa SSB cv.</i> <i>False horn</i>	verde	Sí	nl=3, nw=3	116	192 108*			154^		1
Plátano de cocinar, cocida	Plantain, Cocido	CRI	<i>Musa SSB cv.</i> <i>False horn</i>	amarillo	Sí	nl=3, nw=3	343	644 490*			35,1^		1
Rosa china	Chinese rose	PAN	<i>Pereskia bleo</i>		Sí	nw=4					830 ± 100	80 ± 10	8
Rosa de Jamaica	Roselle	PAN	<i>Hibiscus sabdarríffa</i>		Sí	nw=4					<LD	80 ± 30	8
Sapote	Sapote	PAN	<i>(Quararíbea cordata)</i>	amarillo- naranja	Sí	nw=4					220 ± 20	4620 ± 620	8
Sastra	Sastra	PAN	<i>Garcinia intermedia</i>	blanco- amarillo	Sí	nw=4		12700 ± 100*			3680 ± 290	8470 ± 750	50
Tomate de árbol/ tamarillo	Tree tomato	PAN	<i>Cyphomandra betacea</i>		Sí	nw=4					190 ± 10	170 ± 20	8

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	Ref
Tomate de árbol/tamarillo	Tree Tomato	BRA	<i>Cyphomandra betacea</i>	rojo-piel marrón	Sí	nl=3		620 - 1280	680 - 1230		110-170	60-170	73
Tomate de árbol/tamarillo	Tree Tomato	BRA		naranja		nl=3		490 - 1180	980 - 1820		100-250	20-110	73
Tomate de árbol/tamarillo	Tree tomato	COL	<i>Cyphomandra betacea</i> ; <i>Solanum betacea</i>	amarillo	Sí						190±10	170±20	50
Tomate de árbol/tamarillo	Tree tomato	ECU	<i>Solanum bataceum</i>	amarillo	Sí	nw=3			1350±100		98±5	59±2 Equiv Luteina	74
Tomate de árbol/tamarillo	Tree tomato	PAN	<i>Cyphomandra betacea</i>	rojo	Sí	nw=4					170±20	240±20	8
Tomate de árbol/tamarillo	Tree tomato	ECU	<i>Solanum bataceum</i>	rojo	Sí	nw=3			1580±100		125±5	170±6 Equiv Luteina	74
Tomate de árbol/tamarillo	Tree tomato	COL	<i>Cyphomandra betacea</i> ; <i>Solanum betacea</i>	amarillo-rojo	Sí						170±20	240±20	8
Uvaia	Uvaia	BRA	<i>Eugenia pyriformis</i> <i>Cambess</i>						500* 200**				75

C Caprato L Laurato M Miristato \* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado

nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 13.1.** Carotenoides en frutas tropicales y subtropicales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	fitoeno	fitoflueno	neoxantina	violaxantina	rubixantina	$\delta$ -caroteno	Ref
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia glabra L.</i>	naranja-piel roja		nl=24, nw=2			60 (20 - 140)	65 (30 - 310)			44
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia emarginata DC</i> <i>/ Malpighia glabra L.</i>	rojo-naranja	Sí	nw=3			39,73±1,89	395,33±16,73			45
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia puniceifolia L.</i> <i>var. Olivier</i>		Sí	nl=3, nw=2			6,7±2,6				46

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	fitoeno	fitoflueno	neoxantina	violaxantina	rubixantina	δ-caroteno	Ref
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia puniceifolia</i> L. var. <i>Waldy Cati</i> 30		Sí	nl=3, nw=2			1,8 ± 0,8				46
Acerola, pulpa	Acerola, pulp	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.			nl=17, nw=2			<LD (<LD - 50)	1 (<LD - 40)			44
Acerola, zumo	Acerola, juice	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.			nl=5, nw=2				4 ± 0,0			44
Acerola, zumo	Acerola, zumo	BRA	<i>Malpighia glabra</i> L.			nl=5, nw=2				10 ± 0,0			44
Arazá	Araza	BRA	<i>Eugenia stipitata</i> McVaugh			nl=3			16,0 ± 10,2**				47
Camu-camu	Camu Camu	BRA	<i>Myrciaria dubia</i>		Sí	nl=6			12,3 (3,9 - 20,8)	63,8 (12,0 - 115,6)			35
Canistel	Canistel	MEX	<i>Pouteria campechiana</i>	naranja-amarillo	No	nw=2		650 ± 10		19600 ± 500+			7
Caryocar villosum fructos, liofilizado	Caryocar villosum fruits, lyophilized	BRA	<i>Caryocar villosum</i>	amarillo	No	nw=3			230 ± 60* 170 ± 40**	110 ± 20* 40 ± 10**			71
Chontaduro	Peach palm	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> H.B.K.	rojo-naranja	Sí	nw=6						2020,2 ± 17,12 equiv β-car	68
Cocona	Apple-peach tomato	BRA	<i>Solanum sessiliflorum</i>		Sí	nw=3			4,95 ± 0,27**	8,82 ± 0,90* 0,45 ± 0,00**			49
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	crema - amarillo	No	nl=3, nw=2			6,33* (5,01 - 17,13)* 5,28 (3,19 - 12,92)**	4,89** (1,79 - 15,54)**			55
Jobo	Caja	BRA	<i>Spondias lutea</i>	naranja	Sí	nl=17	42 20 - 49						56
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> L. cv <i>Ataulfo</i>	rojo-naranja	No	nw=2			748**	1500*			57
Mango	Mango	MEX	<i>Mangifera indica</i> L. cv <i>Manila</i>	rojo-naranja	No	nw=2			1681**	3197*			57
Mango	Mango	PAN	<i>Mangifera indica</i> L. cv. <i>Tommy Atkins</i>	amarillo	Sí	nl=3			100 ± 100	2240 ± 910			8

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	QA	fitoeno	fitoflueno	neoxantina	violaxantina	rubixantina	δ-caroteno	Ref
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. cv. Keitt	amarillo	Sí	nl=3			30±20	1800±40			58
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. cv. Keitt	amarillo	Sí	nl=3			210±130	2110±290			59
Manzana de cajú	Cashew apple	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.		Sí	nl=3			136	180			61
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis</i> Sims CPAC MJ-36-01	amarillo oscuro						50±5*			63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis</i> Sims. Comercial							55* 50 - 60*			63
Pitanga	Pitanga	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> L.			nl=20, nw=2				265 (210 - 390)	795* (470 - 1150)* 410** (370 - 530)**		72
Pitanga, pulpa	Pitanga, pulp	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> L.			nl=2, nw=2					1130±3,8* 310±0,9**		72
Pitanga, zumo	Pitanga, juice	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> L.			nl=2, nw=2					1010±1,6* 320±1,0**		72
Pitanga, zumo	Pitanga, juice	BRA	<i>Eugenia uniflora</i> L.			nl=5, nw=2					1450±2,2* 380±0,6**		72

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 13.2.** Carotenoides en frutas tropicales y subtropicales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	QA	γ-caroteno	α-criptoxantina	anteraxantina	luteoxantina	auroxantina	zeinoxantina	Ref
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia emarginata</i> DC / <i>Malpighia glabra</i> L.	rojo-naranja	Sí	nw=3			31,81±1,78		536,55±27,31		45
Aguacate	Avocado	CRI	<i>Persea Americana</i> cv. Hass	verde	Sí	nl=3, nw=3					139		1
Camu-camu	Camu camu	BRA	<i>Myrciaria dubia</i>		Sí	nl=6				41 21,5 - 60			35

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\gamma$ -caroteno	$\alpha$ -criptoxantina	anteraxantina	luteoxantina	auroxantina	zeinoxantina	Ref	
Caryocar villosum frutos, liofilizado	Caryocar villosum fruits, lyophilized	BRA	<i>Caryocar villosum</i>	amarillo	No	nw = 3							340 ± 80* 60 ± 20**	71
Chontaduro	Peach palm	CRI	<i>Bactris gasipaes H.B.K.</i>	rojo-naranja	Sí	nw = 6	3248,5 ± 12,84 equiv $\beta$ -car							68
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Bolivia</i>	rojo	Sí	nw = 10				1340				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Darien</i>	rojo	Sí	nw = 10				1630				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Brasil</i>	rojo	Sí	nw = 10				330				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw = 10				450				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw = 10				420				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Guatuso</i>	naranja claro	Sí	nw = 10				110				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Bolivia</i>	rojo	Sí	nw = 10				2270				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Darien</i>	rojo	Sí	nw = 10				2030				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Brasil</i>	rojo	Sí	nw = 10				840				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw = 10				520				69
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes var. Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw = 10				690				69

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	$\gamma$ -caroteno	$\alpha$ -criptoxantina	anteraxantina	luteoxantina	auroxantina	zeinoxantina	Ref
Chontaduro fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Guatuso</i>	amarillo claro	Sí	nw = 10			160				69
Corozo	Corozo	PAN	<i>Aiphanes aculeate</i>	amarillo-rojo		nl = 3						178 ± 6	8
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		4500 ± 60					54
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		4900 ± 31					54
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		4600 ± 34					54
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		5200 ± 42					54
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		6800 ± 76					54
Higos chumbos	Cactus pear	MEX	<i>Opuntia ficus-indica</i>	verde		nw = 3		7100 ± 19					54
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus/ Batch A</i>	crema	No	nw = 2		<LD*	1,64 ± 0,14**	0,77 ± 0,02* <LD**		<LD* <LD**	55
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus/ Batch B</i>	amarillo	No	nw = 2		<LD*	0,87 ± 0,02**	2,71 ± 0,07* 0,78 ± 0,02**		2,20 ± 0,03* 2,10 ± 0,05**	55
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus/ Batch C</i>	amarillo	No	nw = 2		1,24 ± 0,10*	0,98 ± 0,05**	2,38 ± 0,10* <LD**		2,74 ± 0,01* <LD**	55
Mango	Mango	PAN	<i>Mangifera indica</i> L. cv. <i>Tommy Atkins</i>	amarillo	Sí	nl = 3				200 ± 60			8
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. cv. <i>Keitt</i>	amarillo	Sí	nl = 3				270 ± 20			58
Mango	Mango	BRA	<i>Mangifera indica</i> L. cv. <i>Keitt</i>	amarillo	Sí	nl = 3				380 ± 60			59
Manzana de cajú	Cashew apple	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.		Sí	nl = 3			26				61
Manzana de cajú, concentrado	Cashew apple, concentrado	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl = 25					0,23 ± 0,14	3,11 ± 2,23	62

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	QA	$\gamma$ -caroteno	$\alpha$ -criptoxantina	anteraxantina	luteoxantina	auroxantina	zeinoxantina	Ref
Manzana de cajú, listo para beber	Cashew apple, ready to drink	BRA	<i>Anacardium occidentale L.</i>	amarillo	No	VM, nl=5					0,11±0,04	0,37±0,12	62
Manzana de cajú, néctar	Cashew apple, nectar	BRA	<i>Anacardium occidentale L.</i>	amarillo	No	VM, nl=5					0,15±0,04	0,35±0,05	62
Manzana de cajú, pulpa	Cashew apple, pulpa	BRA	<i>Anacardium occidentale L.</i>	amarillo	No	VM, nl=20					0,62±0,42	7,46±1,82	62
Manzana de cajú, zumo concentrado azucarado	Cashew apple, concentrated juice, sweetened	BRA	<i>Anacardium occidentale L.</i>	amarillo	No	VM, nl=5					0,58±0,11	3,23±0,82	62
Papaya	Papaya	CRI	<i>Carica papaya cv. Pococi hybrid</i>	naranja	Sí	nl=6, nw=3					330		1
Plátano	Banana	CRI	<i>MuAAA cv. Grand naine</i>	amarillo	Sí	nl=2, nw=3					30.5		1

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - evaluación de la calidad VM - método validad nl - número de lotes nw - número de repeticiones  
LD - límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 13.3. Carotenoides en frutas tropicales y subtropicales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (cont.)

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	QA	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	critoflavina	$\zeta$ -caroteno	mutatoxantina	sintaxantina	neocromo	Ref
Acerola	Acerola	BRA	<i>Malpighia emarginata DC / Malpighia glabra L.</i>	rojo-naranja	Sí	nw=3		99,21±10,21	36,62±5,90					45
Aguacate	Avocado	CRI	<i>Persea Americana cv. Hass</i>	verde	Sí	nl=3, nw=3			60.1					1
Camu-camu	Camu camu	BRA	<i>Myrciaria dubia</i>		Sí	nl=3						1,11±0,4		35
Camu-camu	Camu camu	BRA	<i>Myrciaria dubia</i>		Sí	nl=3						1,0±0,3		35
Canistel	Canistel	MEX	<i>Pouteria campechiana</i>	naranja-amarillo	No	nw=2				910±30*				7
Caryocar villosum frutos, liofilizado	Caryocar villosum fruits, lyophilized	BRA	<i>Caryocar villosum</i>	amarillo	No	nw=3					60±50**			71

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	Q A	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	critoflavina	ζ-caroteno	mutatoxantina	sintaxantina	neocromo	Ref
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Bolivia</i>	rojo	Sí	nw = 10				9560* 5220**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Darien</i>	rojo	Sí	nw = 10				5350* 5150**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Brasil</i>	rojo	Sí	nw = 10				1550* 1600**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw = 10				2000* 13200**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw = 10				920* 420**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Guatuso</i>	amarillo claro	Sí	nw = 10				190* 130**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Bolivia</i>	rojo	Sí	nw = 10				7240* 1550**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Darien</i>	rojo	Sí	nw = 10				6060* 780**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Brasil</i>	rojo	Sí	nw = 10				2170* 1100**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Costa Rica</i>	rojo	Sí	nw = 10				1960* 430**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Colombia</i>	naranja claro	Sí	nw = 10				1170* 820**				69
Chontaduro, fruto	Peach palm fruit	CRI	<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>Guatuso</i>	amarillo claro	Sí	nw = 10				180* 80**				69
Jaca	Jackfruit	BRA	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	crema-amarillo	No	nl = 3, nw = 2							<LD* <LD - 2,05*	55
Manzana de cajú, concentrado	Cashew apple, concentrated	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl = 25				1,09 ± 0,56				62
Manzana de cajú, pulpa	Cashew apple, pulp	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl = 20				2,60 ± 0,85				62
Manzana de cajú, zumo concentrado azucarado	Cashew apple, juice concentrated, sweetened	BRA	<i>Anacardium occidentale</i> L.	amarillo	No	VM, nl = 5				0,55 ± 0,00				62

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	SAP	QA	cucurbitaxantina A	cucurbitaxantina B	critoflavina	ζ-caroteno	mutatoxantina	sintaxantina	neocromo	Ref
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims CPAC MJ-36-01</i>	amarillo oscuro						540 ± 28* 628 ± 15**				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims CPAC MJ-21-01</i>	amarillo oscuro						1095 ± 30* 1210 ± 70**				63
Maracuyá	Passion fruit	BRA	<i>P. edulis Sims. Comercial</i>							685* (230 - 1140)* 442** (200 - 683)**				63
Papaya	Papaya	CRI	<i>Carica papaya cv. Pococi hybrid</i>	naranja	Sí	nl=6, nw=3	1040		27.5					1
Plátano	Banana	CRI	<i>MuAAA cv. Grand naine</i>	amarillo	Sí	nl=2, nw=3			6.6					1

\* isómeros-E \*\* isómeros-Z SAP - saponificación QA - Evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - Límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 14.** Carotenoides en raíces amiláceas ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesoing	SAP	QA	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy-β-caroteno	Ref	Obs
Batata	Sweet potato	PAN	<i>Ipomoea batatas</i>	Crudo	Sí	nw=4				90 ± 10	30 ± 10		8	
Batata	Sweet potato	CRI	<i>Ipomoea batata cv. Guapileño</i>	Cocido	Sí	VM	496 377*	14.9	58,5**	27,1 <sup>^</sup>			1	
Batata	Sweet Potato	COL	<i>Ipomoea batatas, var. Resisto</i>	Crudo		n=3	12700 ± 10 1840 ± 70*						76	
Batata	Sweet Potato	COL	<i>Ipomoea batatas, var. Brasilia</i>	Crudo		VM	1150 ± 30						76	
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas Lam., CNPH 1007</i>	Crudo	Sí	nw=30	79100 ± 4600* 14200 ± 300**			100 ± 0	100 ± 0	7000 ± 200	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas Lam., CNPH 1007</i>	Cocido	Sí	nw=30	68900 ± 4500* 8200 ± 100**			400 ± 0	300 ± 0	8000 ± 100	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas Lam., CNPH 1007</i>	Asado	Sí	nw=30	64600 ± 1600* 11600 ± 200**			100 ± 0	100 ± 0	7000 ± 500	77	ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesing	SAP	QA	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy-β-caroteno	Ref	Obs
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1007	Al vapor	Sí	nw = 30	69400 ± 1200* 11300 ± 500**			200 ± 0	100 ± 0	7600 ± 100	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1007	Harina	Sí	nw = 30	45400 ± 2800* 4700 ± 400**			100 ± 0	100 ± 0	3800 ± 300	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1194	Crudo	Sí	nw = 30	128500 ± 2200* 15400 ± 500**			400 ± 100	200 ± 0	11300 ± 200	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1194	Cocido	Sí	nw = 30	133300 ± 5000* 14600 ± 1200**			400 ± 100	200 ± 100	13100 ± 400	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1194	Asado	Sí	nw = 30	127000 ± 7900* 16600 ± 1300**			300 ± 0	200 ± 0	9600 ± 600	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1194	Al vapor	Sí	nw = 30	131000 ± 1900* 15900 ± 300**			1100 ± 0	600 ± 0	15400 ± 200	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1194	Harina	Sí	nw = 30	79700 ± 5500* 6800 ± 200**			300 ± 0	200 ± 0	6500 ± 500	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1202	Crudo	Sí	nw = 30	84600 ± 1600* 14300 ± 600**			200 ± 0	100 ± 0	8400 ± 100	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1202	Cocido	Sí	nw = 30	70600 ± 2700* 13200 ± 1100**			200 ± 0	100 ± 0	8600 ± 500	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1202	Asado	Sí	nw = 30	66500 ± 5200* 8100 ± 700**			600 ± 100	400 ± 0	8400 ± 500	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1202	Al vapor	Sí	nw = 30	77100 ± 1800* 13400 ± 300**			200 ± 0	100 ± 0	8900 ± 200	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1202	Harina	Sí	nw = 30	59200 ± 2300* 5500 ± 300**			200 ± 0	100 ± 0	5300 ± 100	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1205	Crudo	Sí	nw = 30	120100 ± 7700* 15500 ± 1000**			100 ± 0	100 ± 0	8900 ± 400	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1205	Cocido	Sí	nw = 30	76900 ± 4400* 10400 ± 100**			200 ± 0	200 ± 0	7800 ± 100	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1205	Asado	Sí	nw = 30	94500 ± 7700* 15300 ± 1500**			100 ± 0	100 ± 0	8800 ± 900	77	ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesado	SAP	QA	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy- $\beta$ -caroteno	Ref	Obs
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1205	Al vapor	Sí	nw=30	103000 $\pm$ 9000* 14700 $\pm$ 200**			100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	9500 $\pm$ 300	77	ps
Batata	Sweet potato	BRA	<i>Ipomoea batatas</i> Lam., CNPH 1205	Harina	Sí	nw=30	56300 $\pm$ 3500* 2900 $\pm$ 0**			100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	3800 $\pm$ 100	77	ps
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl CM 2772-3	Crudo	No	nw=3	370 $\pm$ 6						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl MBRA 1324	Crudo	No	nw=3	298 $\pm$ 25						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl MCOL 2401	Crudo	No	nw=3	303 $\pm$ 66						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Crudo	No	nl=3, nw=3	1034						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Cocido	No	nl=3, nw=2	614						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Gari	No	nl=3, nw=2	332						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Seco, horno	No	nl=3, nw=3	740						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Seco, horno harina, 2 semanas	No	nl=3, nw=3	417						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Seco, horno harina, 4 semanas	No	nl=3, nw=3	371						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Seco, horno harina, vacío, 2 semanas	No	nl=3, nw=3	421						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranzl	Seco, horno harina, vacío, 4 semanas	No	nl=3, nw=3	332						78	

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesoing	SAP	QA	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy-β-caroteno	Ref	Obs
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol	No	nl=3, nw=3	374						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, harina, 2 semanas	No	nl=3, nw=3	217						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, harina, 4 semanas	No	nl=3, nw=3	176						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, harina, vacío, 2 semanas	No	nl=3, nw=3	185						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, harina, vacío, 4 semanas	No	nl=3, nw=3	171						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, rodajas, 2 semanas	No	nl=3, nw=3	230						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sol, rodajas, 4 semanas	No	nl=3, nw=3	179						78	
Mandioca	Cassava	ESP	<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Seco, sombra	No	nl=3, nw=3	598						78	
Mandioca	Cassava	CRI	<i>Yucca schidigera</i> cv. Valencia	Cocido	Sí	nl=5, nw=3	13,4 7,26*						1	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> , var. IAC 576-70	Crudo		nl=3	260 ± 2						76	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / 1456 - Vermelhinha	Crudo	No	nw=3	199 ± 9 100 ± 5* 99 ± 4**						79	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / 1153 - Klainasik	Crudo	No	nw=3	329 ± 167 ± 1* 163 ± 6**						79	

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesing	SAP	QA	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy-β-caroteno	Ref	Obs
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / 1668 - <i>Cacau amarelo</i>	Crudo	No	nw=3	211 ± 2 101 ± 1 * 110 ± 2**						79	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / 1692 - <i>Dendê</i>	Crudo	No	nw=3	238 ± 14 171 ± 11* 67 ± 29**						79	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / 1721 - <i>Aipim cacau</i>	Crudo	No	nw=3	284 ± 35 158 ± 16* 126 ± 18**						79	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / <i>Hibrido 14-08</i>	Crudo	No	nw=3	811 ± 6 727 ± 5* 85 ± 2**						79	
Mandioca	Cassava	BRA	<i>Manihot esculenta</i> Crantz / <i>Hibrido 14-11</i>	Crudo	No	nw=3	537 ± 51 423 ± 47* 113 ± 4**						79	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2006)	Crudo	No	nl=288	230 (max-990)						80	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2007)	Crudo	No	nl=173	550 (max-1280)						80	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2009)	Crudo	No	nl=345	490 (max-1030)						80	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2010)	Crudo	No	nl=490	980 (max-1910)						80	
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2011)	Crudo	No	nl=332	850 (max-1500)						80	

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Procesoing	SAP	QA	β-caroteno	β-criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina	5,6-epoxy-β-caroteno	Ref	Obs
Mandioca	Cassava	COL	<i>Manihot esculenta</i> Crantz (2012)	Crudo	No	nl=415	860 (max-1620)						80	

ps - peso en seco \* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - Evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes  
nw - número de repeticiones LD - Límite de detección gama de valores entre paréntesis  
**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

**TABLA 15.** Carotenoides en tubérculos amiláceos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref	Obs
Patata	Potato	PAN	<i>Solanum tuberosum</i>		Crudo		Sí	nw=4		70±10	770±60				8	
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Cazona	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,3±0,1	27,2±1,8		11,7±1,4	8,2±0,9	2,2±0,3	81	ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena</i> Morada	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,1±0,1	14,3±0,6		17,6±0,5	12,7±0,4	3,1±0,1	81	ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Fina de carvalho	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,6±0,0	43,9±1,1		15,1±0,5	6,1±0,1	4,4±0,2	81	ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Maika	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	3,2±0,1	36,9±0,5		22,4±0,7	9,1±0,1	4,9±0,1	81	ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena</i> Jesus	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	3,0±0,1	33,4±2,2		28,6±1,8	8,6±0,4	4,5±0,3	81	ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Zorba	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,2±0,0	6,2±0,0		36,2±0,4	18±0,3	3,4±0,1	81	ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Emp06-134	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	8,3±0,2	38,7±0,6		27,7±0,3	14,1±0,2	5,7±0,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Tramontana	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,2±0,0	12,5±2,2		17,8±2,6	44,3±6,2	6,1±1,3	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Arrow	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	8,0±0,2	50,2±1,3		24,5±1,0	20,7±0,9	7,3±0,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Kenebec	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	4,7±0,4	58,9±3,4		39,2±3,8	10,9±0,6	5,9±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Desiree	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,2±0,0	21,8±0,9		42,1±1,5	16,7±0,6	8,7±0,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena</i> Puca Quitish	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	9,2±0,4	40,0±1,7		28,3±0,6	11,0±0,4	5,8±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Victor	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	6,8±0,3	54,5±4,1		37,5±1,4	34,1±0,6	10,2±0,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Opal	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	0,3±0,0	16,7±1,9		59,1±4,9	53,6±5,4	8,1±0,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> Red Pontiac	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	4,7±0,0	89,3±1,3		34,8±0,2	14,1±0,1	10,8±0,3	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena Negrita</i>	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	6,2±0,2	38,6±1,3		29,3±1,7	9,6±0,6	7,4±0,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Elodie</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,3±0,0	53,9±2,4		64,5±3,5	24,3±0,9	9,2±0,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Goniocalix Kashpadama amarilla</i>	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	12,4±1,3	112,2±11,3		34,6±2,1	19,9±0,8	12,6±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena Kasta</i>	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	9,7±0,4	55,0±1,0		53,5±1,3	15,5±0,1	5,0±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Stenotomum Morar Nayra Mari</i>	púrpura y amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	13,3±1,1	102,9±5,8		66,7±5,4	18,9±1,3	14,8±1,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Stenotomum V</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	7,3±0,4	68,5±7,8		69,5±8,7	81,1±10,3	15,9±1,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Spunta</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,6±0,1	31,2±1,2		72,4±3,4	122,5±7,2	13,2±1,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Fina de Gredos</i>	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	1,1±0,1	35,3±0,4		57,8±0,4	72,9±0,7	9,2±0,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena Muro Shocco</i>	púrpura y blanco	Liofilizado	Sin		nw=3	22,3±0,7	87,0±0,2		81,4±0,4	42,2±1,0	12,6±0,3	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena Morada Turuna</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	21,1±0,8	180,9±1,0		41,6±0,9	39,1±1,3	19,8±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Arene</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,9±0,0	77,2±3,8		63,9±3,0	143,8±4,6	16,5±0,5	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Cherie</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,3±0,0	49,6±2,3		81,1±3,2	129,4±5,8	11,0±0,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Mirari</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,6±0,1	53,4±2,4		63,1±3,2	183,6±12,0	27,5±2,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Buesa</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,5±0,1	51,7±0,2		42,1±1,0	132,9±5,3	24,1±0,3	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Zafira</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,0±0,0	43,9±0,2		103,8±0,3	203,0±1,4	17,1±0,8	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Corine</i>	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	2,4±0,1	51,0±2,1		59,4±1,4	177,5±7,8	13,5±0,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Onda</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,3±0,1	52,2±0,5		62,0±2,4	184,5±7,2	18,5±0,3	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Alegria oro</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,9±0,0	36,3±0,5		61,9±1,4	143,0±1,5	15,9±0,3	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Monalisa</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,1±0,1	32,9±5,0		81,4±12,1	99,6±16,1	14,6±2,7	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Roja riñón</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,7±0,1	67,0±2,3		61,5±3,1	202,7±11,5	22,0±2,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Iker</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,6±0,0	33,9±0,9		94,3±3,0	115,5±2,9	15,4±0,9	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Zela</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	4,0±0,2	74,0±9,8		76,9±8,8	182,9±18,4	21,7±2,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Zadorra</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,3±0,2	70,2±5,9		47,8±1,4	270,4±13,7	31,6±1,2	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Duquesa</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,5±0,3	55,4±2,6		44,2±2,6	262,9±9,7	30,1±2,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Zunta</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,1±0,3	47,3±2,3		52,8±2,1	258,3±8,5	19,3±1,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Sofía</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,5±0,1	59,2±4,8		70,2±5,6	239,7±21,7	19,1±2,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Nagore</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,8±0,1	37,3±0,2		139,2±2,5	171,1±2,9	13,9±0,7	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Ambition</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,7±0,0	72,4±3,7		123,7±1,7	152,1±2,7	24,3±0,3	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Stemster</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	4,5±0,1	56,2±1,9		95,2±3,7	255,3±5,4	21,7±1,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Emp06-133</i>	amarillo y granate	Liofilizado	Sin		nw=3	4,3±0,1	106,4±0,6		114,7±1,5	219,6±2,5	39,4±0,5	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Pedro Muñoz</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	5,8±0,2	62,6±0,1		140,3±0,9	81,3±0,7	14,8±0,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Murato</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	1,2±0,1	91,4±7,4		143,6±7,1	234,8±9,7	21,5±0,9	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Harana</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	3,9±0,3	88,5±1,5		111,9±2,6	213,7±2,7	36,2±1,5	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Nerea</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	0,6±0,0	77,4±4,2		127,3 ±4,9	286,9±10,7	22,8±1,3	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Montico</i>	amarillo claro	Liofilizado	Sin		nw=3	2,6±0,1	84,2±3,4		57,0±2,0	314,5±14,8	31,6±0,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum</i> <i>Leire</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,5±0,1	105,6±5,3		63,9±7,3	282,4±20,5	63,2±4,7	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Romula</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	4,2±0,2	101,2±5,1		189,3±13,3	331,6±25,0	29,0±1,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Miranda</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	6,3±0,5	130,6±7,5		137,2±5,1	255,9±14,8	36,4±1,6	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Ibenca</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	6,6±0,4	140,3±7,9		79,4±3,8	276,9±9,4	27,9±1,0	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Ayala</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	3,4±0,0	104,8±4,8		125,1±0,4	350,8±9,9	53,1±2,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Marfona</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	3,8±0,1	93,5±4,3		272,8±22,3	219,1±10,6	28,4±1,7	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Tuberosum Agria</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	2,9±0,2	97,5±5,1		124,3±3,3	292,6±6,3	22,8±0,1	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena Sipancachi</i>	amarillo	Liofilizado	Sin		nw=3	7,4±0,7	102,9±9,9		106,5±6,5	330,9±30,8	28,4±3,7	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Stenotomum Poluya</i>	amarillo y granate	Liofilizado	Sin		nw=3	13,6±1,4	91,0±6,1		206,0±8,4	248,8±11,3	51,2±2,4	81 ps
Patata	Potato	ESP	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Phureja Chaucha</i>	amarillo y granate	Liofilizado	Sin		nw=3	9,1±1,7	143,8±8,6		175,2±7,5	307,4±17,8	40,3±1,9	81 ps

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata	Potato	CRI	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Granola	amarillo	Cocido		Sí	nl=4, nw=3	2,93*	22,3^					1
Patata	Potato	COL	<i>Solanum tuberosum</i> L.	amarillo	Crudo	Sin		nl=4	1±0,2	12±1	4±0,5				11
Patata	Potato	COL	<i>Solanum tuberosum</i> L.	amarillo	Cocido	Sin		nl=4	1,5±0,3	44±1	21±0,5				11
Patata, amarilla	Potato, yellow	PAN	<i>Solanum tuberosum</i>	amarillo	Crudo		Sí	nw=3		70±10	50±10				8
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705821)	amarillo claro	Crudo	Con	Sí	nw=3	20±2	81±8	<LD		38±5	25±3	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705821)	amarillo claro	Cocido	Con	Sí	nw=3	26±3	95±19	<LD		11±4	16±4	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705172)	amarillo claro	Crudo	Con	Sí	nw=3	27±4	123±11	<LD		57±5	28±2	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705172)	amarillo claro	Cocido	Con	Sí	nw=3	32±3	155±10	<LD		10±4	12±1	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (704393)	amarillo	Crudo	Con	Sí	nw=3	7,4±0,3	180±10	17±1		294±19	168±14	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (704393)	amarillo	Cocido	Con	Sí	nw=3	<LD	185±14	41±3		78±10	71±15	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (701862)	amarillo	Crudo	Con	Sí	nw=3	12±2	290±22	<LD		432±30	63±8	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (701862)	amarillo	Cocido	Con	Sí	nw=3	9,2±0,6	253±5	21±1		36±7	<LD	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (702472)	amarillo oscuro	Crudo	Con	Sí	nw=3	7,3±0,9	77±5	562±16		59±5	172±7	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum goniocalix</i> (702472)	amarillo oscuro	Cocido	Con	Sí	nw=3	<LD	73±6	555±13		<LD	45±4	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705799)	amarillo oscuro	Crudo	Con	Sí	nw=3	15±2	105±21	588±32		72±10	310±17	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (705799)	amarillo oscuro	Cocido	Con	Sí	nw=3	10±2	113±23	571±33		34±7	163±63	72

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	Piel	SAP	QA	β-caroteno	luteína	zeaxantina	neoxantina	violaxantina	anteraxantina	Ref
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (704218)	amarillo oscuro	Crudo	Con	Sí	nw=3	<LD	96±6	1048±61		38±8	190±4	72
Patata, andina	Potato, Andean	PER	<i>Solanum phureja</i> (704218)	amarillo oscuro	Cocido	Con	Sí	nw=3	<LD	96±8	1013±55		<LD	<LD	72

ps - peso en seco \* isómeros-E ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - Evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones  
LD - Límite de detección gama de valores entre paréntesis  
ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

TABLA 16. Carotenoides en cereales y similares ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Maíz	Maize	CRI	<i>Zea mays cv. Diamantes</i>	amarillo	Cocido	Sí	VM	1.94	14 11,7*	1.25	42^		1
Maíz	Maize	BRA	<i>Zea mays, var. Assum preto</i>	amarillo			nl=3		53±7	91±3	360±12	401±7	76
Maíz	Maize	BRA	<i>Zea mays, var. BR 473</i>	amarillo			nl=3		28±1	82±5	148±4	467±25	76
Maíz	Maize	BRA	<i>Zea mays, var. Asa branca</i>	amarillo			nl=3		77±2	140±4	181±7	565±23	76
Maíz	Maize	BRA	<i>Asteca</i>	amarillo y naranja	Molido	No	nw=26			4±1	244±15	390±28	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Amarelao 3</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			1±0,0	590±3	118±5	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Branco</i>	blanco	Molido	No	nw=26			<LD	3±3	7±5	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Cateto</i>	amarillo y rojo	Molido	No	nw=26			2±0	110±11	188±20	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Cateto Vermelho</i>	amarillo y rojo	Molido	No	nw=26			3±0	125±3	252±3	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Composto São Luiz</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			4±0	144±12	203±19	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Cunha 1</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			2±1	480±26	350±52	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Lingua de Papagaio</i>	amarillo y púrpura	Molido	No	nw=26			4±0	61±59	443±20	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Mato Grosso</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			5±0	257±5	237±15	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Mato Grosso Palha Roxa</i>	amarillo y púrpura	Molido	No	nw=26			3±0	252±6	397±15	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Moroti</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			<LD	142±19	7±7	82

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Maíz	Maize	BRA	<i>MPA1</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			6±1	369±51	705±67	82
Maíz	Maize	BRA	<i>MPA2</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			5±1	276±34	597±75	82
Maíz	Maize	BRA	<i>MPA13</i>	blanco	Molido	No	nw=26			<LD	6±6	16±8	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Palha Roxa 2</i>	amarillo y púrpura	Molido	No	nw=26			1±0	63±6	149±16	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Palha Roxa 18</i>	amarillo y púrpura	Molido	No	nw=26			3±1	84±14	240±38	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pires</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			5±1	236±4	418±5	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pixurum 1</i>	naranja	Molido	No	nw=26			4±0	135±5	300±10	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pixurum 4</i>	amarillo y naranja	Molido	No	nw=26			5±0	248±10	149±25	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pixurum 5</i>	amarillo	Molido	No	nw=26			2±1	65±9	139±13	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pixurum 6</i>	naranja	Molido	No	nw=26			3±1	130±13	426±36	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Pixurum 7</i>	blanco	Molido	No	nw=26			<LD	4±2	8±2	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Rajado 8 Carreiras</i>		Molido	No	nw=26			4±0	10±1	30±3	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Rosado 38</i>		Molido	No	nw=26			1±0	35±5	64±7	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Roxo 29</i>	púrpura	Molido	No	nw=26			2±1	186±5	482±8	82
Maíz	Maize	BRA	<i>Roxo 41</i>	púrpura	Molido	No	nw=26			10±1	85±5	1070±147	82
Maíz	Maize	ESP	<i>Zea Mmays</i>	amarillo	Crudo	No	nw=3	ND	ND	ND	411	218	15
Maíz, cocido	Maize, cooked	PAN	<i>Zea mays</i>		Crudo	Sí	nw=4				280±40	370±50	8
Maíz, harina	Maize, flour	PAN	<i>Zea mays</i>		Crudo	Sí	nw=4				210±20	940±70	8
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum Don Pedro</i>		Harina						120' 30'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum Simeto</i>		Harina						70' 20'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum T155</i>		Harina						140' 40'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum T22</i>		Harina						60' 10'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum T60</i>		Harina						80' 20'' <LD'''		83

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum durum</i> <i>Vitrón</i>		Harina						90' 20'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, Durum	ESP	<i>Triticum sp durum</i> <i>DH2652</i>		Harina						100' 20'' <LD'''		83
Trigo candeal	Wheat, durum	ESP	<i>Triticum durum</i>	amarillo	Crudo	No	nl=7				90 (60-140)		83
Tritordeum	Tritordeum	ESP	<i>Tritordeum</i> <i>Ascherson et Graebner (HT1)</i>	amarillo	Crudo	No	nl=24				290 (130-590)		83
Tritordeum	Tritordeum	ESP	<i>Tritordeum</i> <i>Ascherson et Graebner (HT2)</i>	amarillo	Crudo	No	nl=29				260 (90-480)		83
Tritordeum	Tritordeum	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner</i>		Harina	Sí	n=4		7,7 $\pm$ 0,005		544 $\pm$ 0,064* 68,8 $\pm$ 0,011**		84
Tritordeum	Tritordeum	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT1</i>		Harina						300' 420'' 170'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT7</i>		Harina						230' 130'' 30'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT27</i>		Harina						270' 330'' 110'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT51</i>		Harina						250' 210'' 40'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT55</i>		Harina						180' 90'' 10'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT71</i>		Harina						360' 310'' 70'''		83
Tritordeum, 53 accesiones	Tritordeum, 53 accesiones	ESP	<i>xTritordeum</i> <i>ascherson et Graebner HT75</i>		Harina						370' 310'' 90'''		83

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT79</i>		Harina						360' 310'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT80</i>		Harina						340' 250'' 60'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT84</i>		Harina						260' 240'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT86</i>		Harina						340' 270'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT89</i>		Harina						250' 340'' 120'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT91</i>		Harina						300' 170'' 30'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT96</i>		Harina						400' 320'' 90'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT114</i>		Harina						280' 90'' 10'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT127</i>		Harina						230' 200'' 40'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT131</i>		Harina						240' 230'' 70'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT138</i>		Harina						130' 100'' 30'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT164</i>		Harina						270' 200'' 50'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT176</i>		Harina						140' 170'' 170'''		83

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT195</i>		Harina						210' 130'' 30'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT198</i>		Harina						400' 270'' 40'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT223</i>		Harina						250' 230'' 70'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT224</i>		Harina						590' 230'' 30'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>xTritordeum ascherson et Graebner HT2</i>		Harina						170' 210'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT9</i>		Harina						200' 380'' 210'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT10</i>		Harina						350' 350'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT13</i>		Harina						180' 230'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT28</i>		Harina						230' 330'' 170'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT31</i>		Harina						170' 300'' 190'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT64</i>		Harina						270' 370'' 150'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT110</i>		Harina						170' 280'' 190'''		83
Tritordeum, 53 accesions	Tritordeum, 53 accesions	ESP	<i>HT143</i>		Harina						300' 290'' 80'''		83

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT148		Harina						480' 360'' 100'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT150		Harina						310' 320'' 130'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT152		Harina						360' 270'' 80'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT157		Harina						480' 310'' 50'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT221		Harina						290' 290'' 70'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT240		Harina						220' 250'' 100'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT263		Harina						400' 380'' 110'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT265		Harina						250' 330'' 120'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT290		Harina						140' 250'' 160'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT292		Harina						180' 260'' 150'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT320		Harina						190' 270'' 100'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT323		Harina						210' 280'' 120'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT325		Harina						90' 190'' 160'''		83

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	luteína	zeaxantina	Ref
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT327		Harina						140' 160'' 70'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT332		Harina						220' 190'' 40'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT333		Harina						190' 280'' 110'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT335		Harina						230' 300'' 130'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT609		Harina						280' 360'' 170'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT630		Harina						390' 380'' 100'''		83
Tritordeum, 53 accessions	Tritordeum, 53 accessions	ESP	HT632		Harina						300' 240'' 70'''		83

‘ libre “ monoester “ diester \* isómeros-E \*\* isómeros-Z ^ incluye zeaxantina SAP - saponificación QA - Evaluación de la calidad VM - método validado nl - número de lotes nw - número de repeticiones LD - Límite de detección gama de valores entre paréntesis

ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHL: Chile; COL: Colombia; CRI: Costa Rica; ECU: Ecuador; ESP: España; MEX: México; PRT: Portugal; PAN: Panamá; PER: Perú

**TABLA 17.** Carotenoides en productos diversos ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	α-caroteno	β-caroteno	licopeno	luteína	zeaxantina	fitoflueno	z-carotene	neoxantina	violaxantina	latoxantina	Ref
Acajú	Cashew	PAN	<i>Anacardium occidentale</i>	rojo	Crudo	Sí	nl=2, nw=5				30 (20 - 40)	10						8
Leche de vaca	Cow milk	BRA		blanco		Sí	nw=15		944 807 - 1081*		115 97 - 132	95 83 - 106					994 (807 - 1081)	85
Palma chungu	Black palm	PAN	<i>Astrocaryum standleyaum</i>		Crudo	Sí	nw=4				440 ± 30	ND						8
Sofrito***	Sofrito	ESP			Cocido	No	nl=10, nw=4	80* (68 - 110)*	1876* (1330 - 2969)*	3088* (2932 - 4050)* 584** (518 - 678)**	288* (241 - 342)*							86

Nombre	Nombre (Inglés)	Origen (País)	Nombre científico	Color	Proceso	SAP	QA	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	licopeno	luteína	zeaxantina	fitoflueno	z-carotene	neoxantina	violaxantina	latoxantina	Ref
Tomate - ketchup	Tomato - ketchup	BRA		Ketchup			nl=6		350 $\pm$ 0,8* 100 $\pm$ 0,3**	9425* (8560 - 10290)* 815** (630 - 1000)**			1205 (850 - 1560)	255 (150 - 360)				25

\* isómeros-E    \*\* isómeros-Z    \*\*\*Sofrito - ajo, cebolla, pimiento, tomate, aceite de oliva    SAP - saponificación    QA - Evaluación de la calidad    VM - método validado    nl - número de lotes

nw - número de repeticiones    LD - Límite de detección    gama de valores entre paréntesis

**ARG:** Argentina; **BRA:** Brasil; **CHL:** Chile; **COL:** Colombia; **CRI:** Costa Rica; **ECU:** Ecuador; **ESP:** España; **MEX:** México; **PRT:** Portugal; **PAN:** Panamá; **PER:** Perú

## REFERENCIAS

- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., Olmedilla Alonso, B. 2012. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1334-1343.
- Biehler, E., Alkerwi, A., Hoffmann, L., Krause, E., Guillaume, M., Lair, M.L., & Bohn, T. 2012. *Journal of Food Composition and Analysis* 25: 56-65.
- Britton, G., y Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 5. Nutrition and Health*, 45-66. Basilea: Birkhäuser.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E.M., Ornelas-Paz, J. de J., Gardea-Béjar, A.A., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J.D. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10822-10833.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2009. En T. Bechtold y R. Mussak (eds.). *Handbook of Natural Colorants*. 53-64. Nueva York: John Wiley and Sons.
- Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C., Oliveira, L. 2009. *Food Chemistry* 113: 808-815.
- Health Canada. 1997. Canada's Food Guide to Healthy Eating. Minister of Public Works and Government Services. Canadá.
- Holden, J.M., Eldridge, A.L., Beecher, G.R., Buzzard, M., Bhagwat, S., Davis, C.S., Douglass, L.W., Gebhardt, S., Haytowitz, D., Schakel, S. 1999. *Journal of Food Composition and Analysis* 12: 169-196.
- Khachik, F. 2006. *Pure and Applied Chemistry* 78: 1551-1557.
- Lachance, P.A. 1997. En A. Bendich y R.P. Deckelbaum (eds.). *Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals*, 441-454. Totowa: Humana Press.
- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. 2009. *Molecular Nutrition and Food Research* 53: S194-S218.
- Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., Benítez-González, A., Stinco, C. M. 2014. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 572:188-200.
- Mercadante, A.Z. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, 213-240. Boca Raton: CRC Press.
- Micozzi, M.S., Brown, E.D., Edwards, B.K., Bieri, J.G., Taylor, P.R., Khachik, F., Beecher, G.R., Smith, J.C. 1992. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55: 1120-1125.
- Monge-Rojas, R. y Campos, H. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 202-216.
- Murkovic M., Gams K., Draxl, S., Pfannhauser, W. 2000. *Journal of Food Composition and Analysis* 13: 435-40.

## REFERENCIAS

- O'Neill, M.E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den Berg, H., Hininger, I., Rousell, A.M., Chopra, M., Southon, S., Thurnham, D.I. 2001. *British Journal of Nutrition* 85: 499-507.
- Reif, C., Arrigoni, E., Schärer, H., Nyström, L., Hurrell, R.F. 2013. *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 64-72.
- Rodríguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T., Amaya-Farfan, J. 2008. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 445-463.
- Silva, N.A., Rodrigues, E., Mercadante, A.Z., De Rosso, V. V. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 5072-5084.
- Yahia, E. M., y Ornelas-Paz, J. de J. 2010. En L.A. De la Rosa, E. Álvarez-Parrilla, G.A. González-Aguilar (eds.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, 177-222. Ames: Blackwell Publishing.
- Yong, L.C., Forman, M.R., Beecher, G.R, Graubard, B.I, Campbell, W.S, Reichman, M.E, Taylor, P.R., Lanza, E., Holden, J.M., Judd, J.T. 1994. *The American Journal of Clinical Nutrition* 60: 223-230.
- Zino, S., Skeaff, M., Williams, S. y Mann, J. 1997. *British Medical Journal* 314: 1787-1791.

## REFERENCIAS DE LAS TABLAS

- [1] Monge-Rojas, R. y Campos, H. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 202-216.
- [2] Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Gil-Martínez, E. 1998. En: S.G. Pandalai (ed.) *Recent Research Development in Agricultural & Food Chemistry*. vol.2 (part 1): 57-70. Kerala, India: Research Signpost.
- [3] García-Rodríguez, M.V., Serrano-Díaz, J., Tarantilis, P.A., López-Córcoles, H., Carmona, M., Alonso, G.L. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 8068-8074.
- [4] Kobori, C.N. y Rodríguez Amaya, D.B. 2008. *Food and Nutrition Bulletin* 29: 320-328.
- [5] Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C. y Oliveira, L. 2009. *Food Chemistry* 113: 808-815.
- [6] de Sá, M.C. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2003. *Food Chemistry* 83: 595-600.
- [7] Costa, T.S.A., Wondracek, D.C., Lopes, R.M., Vieira, R.F. y Ferreira, F.R. 2010. *Revista Brasileira De Fruticultura* 32: 903-906.

- [8] Murillo, E., Meléndez-Martínez, A.J., Portugal, F. 2010. *Food Chemistry* 122: 167-172.
- [9] de Azevedo-Meleiro, C.H. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2005. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 591-597.
- [10] Mercadante, A.Z. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1991. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1094-1097.
- [11] Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. y Rojas-Hidalgo, E. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2135-2140.
- [12] Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C., Oliveira, L., Nunes, B., Versloot, P., Hulshof, P.J.M. 2010. *Journal of Chromatography A* 1217: 3494-3502.
- [13] González, E., Montenegro, M.A., Nazareno, M.A. y López de Mishima, B.A. 2001. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 514: 395-399.
- [14] de Carvalho, L.M.J., Gomes, P.B., Godoy, R.L.D.O., Pacheco, S., do Monte, P.H.F., de Carvalho, J.L.V., Nutti, M.R., Neves, A.C.L.N., Vieira, A.C.R.A.V., Ramos, S.R.R. 2012. *Food Research International* 47: 337-340.
- [15] Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., Olmedilla-Alonso, B. 2012. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1334-1343.
- [16] García-Herrera, P., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Tardío, J. y Olmedilla-Alonso, B. 2013. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1692-1698. Erratum. 2014. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1914-1916.
- [17] Collera-Zúñiga, O., Jiménez, F.G., Gordillo, R.M. 2005. *Food Chemistry* 90: 109-114.
- [18] Azevedo-Meleiro, C.H., Rodríguez-Amaya, D.B. 2009. *Journal of Separation Science* 32: 3652-3658.
- [19] Guerra-vargas, M., Jaramillo-Flores, M.E., Dorantes-Álvarez, L. y Hernández-Sánchez, H. 2001. *Journal of Food Science* 66: 620-626.
- [20] García, M.I., Lozano, M., Espinosa, V.M., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., Vidal-Aragón, M.C., Pérez, M.M. 2007. *Scientia Horticultura* 113, 202-207.
- [21] Hornero-Méndez, D., Costa-García, J. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5711-5716.
- [22] Mínguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez, D. 1993. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1616-1620.
- [23] Niizu, P.Y., Rodríguez-Amaya, D.B. 2003. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 62: 195-199.
- [24] Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Rojas Hidalgo, E. 1993. En: Waldrom, K., Johnson, I.T., Fenwick, G.K. (eds). *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects* 141-145. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

- [25] Tavares, C.A. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1994. *LWT - Food Science and Technology* 27: 219-224.
- [26] Niizu, P.Y. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2005. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 739-749.
- [27] Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C. y Oliveira, L. 2008. *Food Chemistry* 109: 815-824.
- [28] Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., Cortés, M. 2011. *Food Research International* 44: 1733-1740.
- [29] Meléndez-Martínez, A.J., Mapelli-Brahm, P., Benítez-González, A., Stinco, C.M. 2015. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 572: 188-200.
- [30] de Azevedo-Meleiro, C.H. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2005. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 845-855.
- [31] López, A., Javier, G.A., Fenoll, J., Hellín, P., Flores, P. 2014. *Journal of Food Composition and Analysis* 33: 39-48.
- [32] Agostini-Costa, T.S., Wondracek, D.C., Rocha, W.S. y da Silva, D. B. 2012. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34: 234-238.
- [33] Bulux, J., De Serrano, J.Q., Pérez, R., Rivera, C. y Solomons, N.W. 1998. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 49: 173-179.
- [34] Cardoso, P.C., Tomazini, A.P.B., Stringheta, P.C., Ribeiro, S.M.R. y Pinheiro-Sant'Ana, H.M. 2011. *Food Chemistry* 126: 411-416.
- [35] Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. 2007. *Food Chemistry* 101: 1526-1532.
- [36] Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 638-649.
- [37] Escudero-López, B., Cerrillo, I., Herrero-Martín, G., Hornero-Méndez, D., Gil-Izquierdo, A., Medina, S., Ferreres, S., Berná, G., Martín, F., Fernández-Pachón, M. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 8773-8782.
- [38] Stinco, C.M., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. y Vicario, I.M. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1447-1455.
- [39] Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4219-4224.
- [40] Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109: 546-553.
- [41] Gama, J.J.T. y Sylos, C.M. 2005. *Food Research International* 38: 899-903.
- [42] de Faria, A.F., Hasegawa, P.N., Chagas, E.A., Pío, R., Purgatto, E. y Mercadante, A.Z. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 196-203.
- [43] Sentanin, M.A., Rodríguez-Amaya, D.B. 2007. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27: 13-19.

- [44] Porcu, O.M. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2006. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1916-1920.
- [45] Mezdari, T., Pérez-Gálvez, A. y Hornero-Méndez, D. 2005. *European Food Research and Technology* 220: 63-69.
- [46] de Rosso, V.V., and Mercadante, A.Z. 2005. *Food Research International* 38: 1073-1077.
- [47] Garzón, G.A., Narváez-Cuenca, C.E., Kopec, R.E., Barry, A.M., Riedl, K.M., Schwartz, S.J. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4709-4717.
- [48] de Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5062-5072.
- [49] Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B. y Mercadante, A.Z. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3022-3029.
- [50] Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A.J. y Mondello, L. 2013. *Food Chemistry* 140: 825-836.
- [51] Oliveira, D.S., Lobato, A.L., Ribeiro, S.M.R.R., Santana, A.M.C., Chaves, J.B.P., Pinheiro-Sant'Ana, H.M. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6166-6172.
- [52] Oliveira, D.S., Aquino, P.P., Ribeiro, Proença, R.P.C., Pinheiro-Sant'Ana, H.M. 2011. *Maringá* 33: 89-98.
- [53] González, I.A., Osorio, C., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L. y Heredia, F.J. 2011. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 840-848.
- [54] Jaramillo-Flores, M.E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-Álvarez, L., Gutiérrez-López, G.F. y Hernández-Sánchez, H. 2003. *Food Science and Technology International* 9: 271-278.
- [55] de Faria, A.F., de Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2009. *Plant Foods for Human Nutrition* 64: 108-115.
- [56] Hamano, P.S. y Mercadante, A.Z. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 335-343.
- [57] Ornelas-Paz, J.D. J., Yahia, E.M. y Gardea, A.A. 2008. *Postharvest Biology and Technology* 50: 145-152.
- [58] Mercadante, A.Z. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 128-130.
- [59] Mercadante, A.Z., Rodríguez-Amaya, D.B. y Britton, G. 1997. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 120-123.
- [60] Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Gardea-Bejar, A. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6628-6635.
- [61] Pinto de Abreu, F., Dornier, M., Dionisio, A.P., Carail, M., Caris-Veyrat, C., and Dhuique-Mayer, C. 2013. *Food Chemistry* 138: 25-31.

- [62] Assunção, R.B. y Mercadante, A. Z. 2003. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 647-657.
- [63] Wondracek, D.C., Faleiro, F.G., Sano, S.M., Vieira, R.F., Agostini-Costa, T.S. 2011. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 1222-1228.
- [64] Mercadante, A.Z., Britton, G. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4102-4106.
- [65] Schweiggert, R.M., Steingass, C., Esquivel, P. y Carle, R. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2577-2585.
- [66] Rivera-Pastrana, D.M., Yahia, E.M. y González-Aguilar, G.A. 2010. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2358-2365.
- [67] Barreto, G.P.M., Fabi, J.P., De Rosso, V.V., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M., do Nascimento, J.R.O., Mercadante, A.Z. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 620-624.
- [68] Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A.M., Bustos-Carmona, J. y Vaillant, F. 2011. *Food Research International* 44: 2377-2384.
- [69] Jatunov, S., Quesada, S., Díaz, C. y Murillo, E. 2010. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60: 99-104.
- [70] Hempel, J., Amrehn, E., Quesada, S., Esquivel, P., Jiménez, V.M., Heller, A., Carle, R., Schweiggert, R.M. 2014. *Planta* 240: 1037-1050.
- [71] Chisté, R.C. y Mercadante, A.Z. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5884-5892.
- [72] Burgos, G., Amorós, W., Salas, E., Muñoa, L., Sosa, P., Díaz, C. y Bonierbale, M. 2012. *Food Chemistry* 133: 1131-1137.
- [73] Rodríguez-Amaya, D.B., Bobbio, P.A. y Bobbio, F.O. 1983. *Food Chemistry* 12: 61-65.
- [74] Mertz, C., Gancel, A., Gunata, Z., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Vaillant, F., Pérez, A.M., Ruales, J., Brat, P. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 381-387.
- [75] da Silva, N.A., Rodrigues, E., Mercadante, A.Z., de Rosso, V.V. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 5072-5084.
- [76] Kimura, M., Kobori, C.N., Rodríguez-Amaya, D.B. y Nestel, P. 2007. *Food Chemistry* 100: 1734-1746.
- [77] Donado-Pestana, C.M., Salgado, J.M., de Oliveira Rios, A., dos Santos, P.R. y Jablonski, A. 2012. *Plant Foods for Human Nutrition* 67: 262-270.
- [78] Chávez, A.L., Sánchez, T., Ceballos, H., Rodríguez-Amaya, D.B., Nestel, P., Tohme, J. y Ishitani, M. 2007. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 388-393.
- [79] Carvalho, L.M.J., Oliveira, A.R.G., Godoy, R.L.O., Pacheco, S., Nutti, M.R., de Carvalho, J.L. V., Pereira E.J., Fukuda, W.G. 2012. *Food and Nutrition Research* 56: 15788-15797.

- [80] Ceballos, H., Morante, N., Sánchez, T., Ortiz, D., Aragón, I., Chávez, A.L., Pizarro M., Calle F., Dufour, D. 2013. *Crop Science* 53: 2342-2351.
- [81] Fernández-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L. y Hornero-Méndez, D. 2013. *Food Chemistry* 141: 2864-2872.
- [82] Kuhnen, S., Menel Lemos, P.M., Campestrini, L.H., Ogliari, J.B., Dias, P.F. y Maraschin, M. 2011. *Carotenoid. Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1548-1553.
- [83] Atienza, S.G., Ballesteros, J., Martín, A. y Hornero-Méndez, D. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4244-4251.
- [84] Mellado-Ortega, E. y Hornero-Méndez, D. 2012. *Food Chemistry* 135: 1344-1352.
- [85] Kuhnen, S., Moacyr, J.R., Trevisan, R., Machado Filho, L.C.P. y Maraschin, M. 2013. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 11: 221-224.
- [86] Vallverdú-Queralt, A., Alvarenga, J.F.R., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R.M. 2013. *Food Chemistry* 141: 3365-3372.

# ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE CAROTENOIDES EN LA DIETA

Begoña Olmedilla-Alonso y Rocío Estévez-Santiago



## INTRODUCCIÓN

La dieta, conjunto de alimentos que conforman nuestros hábitos alimentarios, tiene como objetivo principal el aporte suficiente de nutrientes para cubrir los requerimientos metabólicos de un individuo y proporcionar bienestar. Este aspecto básico, evitar enfermedades carenciales, sigue siendo prioritario en la mayor parte del mundo, pero, por otra parte, el papel de la dieta y la nutrición como factores de riesgo modificables en diversas enfermedades crónicas se ha puesto de manifiesto a través de numerosos estudios, que muestran cómo las modificaciones en la dieta tienen un gran efecto, tanto positivo como negativo, sobre la salud a lo largo de la vida.

Durante el pasado siglo hubo un avance importante en el conocimiento sobre alimentación, nutrición y salud-enfermedad con base en la gran cantidad de estudios sobre la composición de los alimentos, estudios epidemiológicos, modelos analíticos,

experimentales y estadísticos y estudios de laboratorio para determinar actividades biológicas. Todo ello contribuyó a la identificación de determinados componentes de la dieta (bioactivos: fitoquímicos o zooquímicos) como factores potencialmente implicados en la prevención y en la disminución del riesgo de diversos procesos patológicos (Olmedilla Alonso, 2010). Entre dichos componentes se encuentra el grupo de los carotenoides, que son pigmentos liposolubles. Estos compuestos están presentes en el organismo humano, el cual no los sintetiza, por lo que los obtiene a través de la dieta. Los humanos obtenemos carotenoides fundamentalmente a partir de frutas y hortalizas, y en menor proporción a partir de fuentes animales y a través de los aditivos alimentarios (colorantes). En nuestra dieta habitual están presentes más de 40 carotenoides, disponibles para ser absorbidos, metabolizados o utilizados por el organismo. Sin embargo, hasta ahora el interés se ha centrado en los seis carotenoides mayoritarios en la sangre, tres con actividad de provitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina) y otros tres sin dicha actividad (luteína, zeaxantina y licopeno).

Por otra parte, debido a que la dieta es uno de los determinantes más importantes, y modificable, del estilo de vida en la salud humana y a que tanto la desnutrición como la sobrealimentación juegan un papel fundamental en la morbilidad y mortalidad, la evaluación del estado nutricional es un aspecto clave para mejorar la salud a nivel individual y poblacional. La valoración del estado nutricional se puede realizar mediante cuatro enfoques complementarios: la antropometría (estimación de dimensiones y composición corporal), los biomarcadores (de la ingesta de componentes de alimentos y del efecto derivado de la misma), el examen clínico (manifestaciones clínicas derivadas de desequilibrios en la ingesta de nutrientes) y la evaluación dietética (estimación

de ingesta de alimentos o de componentes de alimentos) (Patterson y Pietinen, 2006). Cada uno de estos enfoques tiene ventajas e inconvenientes respecto a su utilización en individuos o en poblaciones, y además, la viabilidad y el costo asociado a la recopilación de datos es muy diferente de unos a otros.

En el momento de seleccionar un método de evaluación nutricional, es imprescindible considerar el contexto en el cual se van a utilizar los datos que, en general, son los ámbitos clínico, de salud pública y de investigación. En el ámbito clínico, la evaluación nutricional se utiliza para determinar la idoneidad de la dieta de un sujeto o el riesgo, y su propósito es aconsejar o tratar. En el ámbito de la salud pública, se utiliza en general para monitorear la nutrición y la vigilancia de las poblaciones con objeto de valorar la idoneidad de la dieta o el riesgo, y tomar decisiones políticas a escala pública. Finalmente, en el ámbito de la investigación, la evaluación nutricional se utiliza en estudios epidemiológicos sobre ingesta dietética y riesgo de enfermedades y para comparación de grupos (por ejemplo, control y de intervención) (Patterson y Pietinen, 2006). En general, la evaluación del estado nutricional es de gran interés para valorar la idoneidad de la dieta o el riesgo asociado a ingestas por exceso o por defecto, y es esencial para la implementación y seguimiento de estrategias nutricionales a escala individual y en salud pública.

Este capítulo se centra en los métodos de valoración de la ingesta dietética de carotenoides, con el propósito de obtener información sobre su estado nutricional de forma individualizada, para que se puedan interpretar los datos tanto respecto a la actividad provitamínica A que algunos de ellos muestran, como respecto a los diversos grados en que cada uno de ellos exhiben otras actividades biológicas que

están relacionadas con la disminución de riesgo de diversas enfermedades crónicas y con la mejora de la calidad de vida.

## MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA

En la valoración de la ingesta de nutrientes se necesita conocer los alimentos ingeridos, el peso de las raciones habituales o de las medidas caseras (ej. Moreiras *et al.*, 2013) y disponer de tablas de composición de alimentos (TCA) o bases de datos de composición de alimentos (BDCA) que aporten datos sobre el contenido del o los nutrientes en estudio.

La ingesta de alimentos se puede estudiar por una amplia variedad de métodos, aunque ninguno está globalmente aceptado. La elección del método para la valoración de la ingesta dietética es la tarea más importante para el éxito de un estudio y se realiza con base en el tipo de muestra (individuos o población), el diseño, el objetivo del estudio y los recursos disponibles, entre otros. Todos los métodos deben ser validados para comprobar si han medido exactamente lo que se buscaba medir. Las encuestas pueden clasificarse en dos grupos según estudien ingesta actual (estudios prospectivos) o pasada (estudios retrospectivos).

Los métodos que estudian la ingesta actual son: *a)* la pesada individual precisa (es el procedimiento más exacto), *b)* la estimación de los alimentos consumidos (se diferencia del anterior en que la cantidad consumida se estima utilizando medidas caseras o fotografiadas de raciones de los alimentos y platos que habitualmente se consumen).

Las técnicas que estudian la ingesta pasada o habitual tienen

una amplia aplicación en epidemiología nutricional, ya que la dieta es uno de los factores (modificables) implicados en diversas patologías. Estas técnicas utilizan la información obtenida mediante: *a)* recuerdo de 24 horas, *b)* historia dietética, *c)* frecuencia de consumo de alimentos. El principal inconveniente de estos métodos es que basan la recogida de datos en la memoria del encuestado.

En términos generales los métodos de encuesta de ingesta de alimentos se pueden definir como una investigación dirigida a conocer y juzgar la deficiencia de la dieta de un individuo o grupo de población.

### Métodos para estudios poblacionales

En los estudios a nivel de población general, la valoración de la ingesta se realiza de forma indirecta, teniendo en cuenta como unidad de estudio el hogar y no el individuo. Se realizan mediante encuestas generalmente dirigidas a la obtención de resultados representativos de los consumos familiares o de los hogares. Estas metodologías para el cálculo de los consumos alimentarios de la población se pueden agrupar en: *a)* hojas de balance de alimentos, *b)* encuestas de presupuestos y gastos familiares, *c)* encuestas específicas de consumo (Martín-Moreno y Gorgojo, 2007).

En los estudios a escala nacional son muy utilizadas las hojas de balance de alimentos, donde la información se presenta en cantidades *per cápita*, obtenidas al dividir las cantidades totales anuales de cada alimento por la población del país en el año estudiado (kg/cápita/año o g/cápita/día), asumiendo un consumo constante a lo largo del año.

Las encuestas de presupuestos familiares se han realizado

periódicamente en España para valorar el consumo en el hogar y utilizan diversos métodos, como son el registro diario (generalmente de siete días), el recordatorio de una lista de alimentos, el inventario y el recuento. La primera encuesta realizada en España a escala nacional utilizando la metodología de análisis individual de consumo corresponde a los años 2009 y 2010 y fue realizada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). En esta encuesta, en población adulta (18 y 64 años), se incluyeron 3000 sujetos (ENIDE, 2011) y los datos de consumo se obtuvieron a partir de recuerdos de 24 horas y registros de tres días.

## Métodos para valoración de ingesta individual

Para la valoración de la ingesta individual se utilizan encuestas y cuestionarios. Es preferible que las encuestas las lleven a cabo entrevistadores entrenados. En el caso de los registros de dieta, éstos los realizará el individuo tras recibir instrucciones lo más precisas posible.

### Recuerdo de 24 horas

Consiste en recordar y anotar todos los alimentos y bebidas consumidas, así como la forma en que se elaboran los platos, en las últimas 24 horas. Es una de las técnicas más utilizadas por su sencillez y, en general, para una mayor fiabilidad de la información. Se requiere realizar tres recuerdos de 24 h con la condición de que uno de ellos debe corresponder a un día festivo.

### Registro de dieta

Este método consiste en pedir al entrevistado que anote diariamente durante tres, cinco, siete o más días los alimentos y bebidas que ingiere, así como su cantidad. En el caso de

que el registro sea de tres días, se debe realizar a lo largo de una semana e incluyendo un día festivo. El método requiere previamente que el entrevistado sea instruido con la ayuda de modelos y medidas caseras.

Tanto en la realización del recuerdo de 24 horas como de los registros de dieta, es importante: 1) No olvidar ningún alimento. Es importante poner atención en las recetas complejas, en algunos alimentos que tienden a olvidarse (pan, el postre, el aceite, el azúcar, las bebidas) y en lo que se consume fuera de casa o entre horas. 2) Identificar correctamente todos los alimentos ingeridos con todo el detalle que sea posible (ej. marcas comerciales, tipo de melón o de tomate o de aceite). 3) Concretar la cantidad ingerida ya sea en gramos (registros con pesada precisa), raciones habituales o medidas caseras. Puede ser útil emplear un atlas fotográfico de alimentos.

### Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

Este procedimiento consiste en la utilización de una lista de alimentos sobre la que se solicita al entrevistado responder respecto a la frecuencia diaria, semanal o mensual de consumo de cada uno de ellos referida al último mes, seis o 12 meses. Debe ponerse atención en evitar la sobreestimación o subestimación del consumo. El cuestionario puede ser cerrado (se incluyen preguntas sobre los alimentos de interés en el estudio en concreto) o abiertos (el sujeto puede incluir los alimentos que consume). Es importante evitar posibles ambigüedades o contradicciones al elaborar las preguntas de las encuestas (ej. no usar el término “ingesta reciente” sino “ingesta en la última semana o en el último mes”).

La elaboración de este cuestionario es específica para cada estudio y depende del tipo de componentes de los alimentos

que se deseen valorar. En el caso de los carotenoides es de gran importancia un detallado y completo listado de alimentos de origen vegetal. El aporte energético total de la dieta es un dato útil en la interpretación de resultados.

### Historia dietética

La historia dietética está formada por un recuerdo de 24 horas, una frecuencia de consumo y otras preguntas complementarias relacionadas con el objeto del estudio. Es importante tomar las precauciones ya mencionadas para ambos procedimientos.

## PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE CUESTIONARIOS

Los cuestionarios utilizados en los estudios deben permitir la obtención de información que pueda ser cuantificable, verificable y comparable. Los cuestionarios pueden estar diseñados específicamente para un estudio o utilizar cuestionarios previos. En este último caso, para conocer los cuestionarios existentes, se debe hacer una búsqueda bibliográfica, valorarlos de forma crítica en cuanto a su validez aparente y de contenido, y finalmente, utilizar o modificar uno existente o bien, diseñar un cuestionario nuevo.

### Diseño de cuestionarios

En el diseño y desarrollo de un cuestionario de ingesta hay que establecer de forma clara el objeto del estudio, los objetivos específicos, la población y la muestra en estudio, la técnica de recogida de información y, finalmente, validar el cuestionario. En la preparación del cuestionario hay que utilizar preguntas claras y enunciadas de forma que no condicionen la respuesta. Si el cuestionario se basa en alguno previo y se copian ítems,

se ahorra trabajo, pero hay que tener cuidado en revisar la terminología (para que sea actual y comprensible por la población en estudio) y la escala de medición.

En la preparación (o en la selección) de un cuestionario para valorar la ingesta, es importante definir qué componentes de la dieta interesan, en qué formas químicas se presentan (ej. carotenoides en forma libre, en formas éster, como formas totales o isómeros) y en qué tipo de alimentos se encuentran. En general, en todos los cuestionarios de valoración de dieta es útil incluir otros datos de interés general que facilitarán una adecuada interpretación de los resultados (ej. la edad, el peso y la talla) y es preferible que sean medidos *in situ* en lugar de autorreferidos. En el caso de los carotenoides, interesa además conocer aquellos factores que puedan condicionar la absorción y metabolismo de los carotenoides, como por ejemplo: hábito tabáquico, enfermedad crónica, uso de medicamentos o de complementos alimenticios.

El cuestionario debe contener preguntas y respuestas que permitan una transformación cuantitativa de la información, la cual debe cumplir unos criterios de calidad, confiabilidad y validez. Todo ello permitirá la comparación entre resultados de diferentes estudios y la obtención de conclusiones (en relación con diagnóstico de estatus nutricional, asociaciones con nivel de riesgo y la clasificación de sujetos).

El registro de dieta de varios días (3-7 días) y los recuerdos de 24 horas son las formas de valorar la ingesta utilizadas con más frecuencia, por ser rápidas, de bajo costo económico y necesitan sólo un entrenamiento sencillo del entrevistador. La principal desventaja del registro es que suele alterar el patrón de alimentación del sujeto, y la del recuerdo de 24 horas que depende de la memoria del encuestado.

## Criterios de calidad de los cuestionarios (confiabilidad, validez)

Antes de generalizar la aplicación de un cuestionario es necesario evaluar su confiabilidad y validez, lo que permitirá la comparación de resultados. La validación se debe realizar siempre que: *a)* el cuestionario sea de nueva creación; *b)* los resultados sean poco satisfactorios; *c)* sea eficaz pero en un medio distinto (ej. validación transcultural). La validez (exactitud) y reproducibilidad (confiabilidad) están muy condicionadas por las características del diseño del cuestionario.

La confiabilidad (o precisión) es el grado de reproducibilidad de un estudio o de un procedimiento de medida. Es una medida de la capacidad del cuestionario para distinguir en qué medida una variable fluctúa como resultado de un error en la medición o como resultado de un cambio real. Para valorar si el cuestionario da lugar a resultados similares (valorar si es reproducible) se debe repetir en distintas ocasiones (ej. con los cuestionarios autocumplimentados) y observar el grado de acuerdo entre diversos entrevistadores y el grado de acuerdo entre distintos resultados obtenidos por el mismo entrevistador.

En la confiabilidad influye tanto el tipo de muestra (la muestra de sujetos debe ser lo más heterogénea posible) como el número de alimentos o componentes que se estén valorando, así como la estimación y cuantificación de las porciones o raciones de los alimentos. Se expresa con un valor entre cero y uno.

La validez (exactitud) se refiere a la capacidad de un procedimiento, método o instrumento para medir realmente lo que se espera que mida. Con ello se determina el nivel de confianza que se puede tener en las inferencias obtenidas a

partir de los resultados. La validez de un cuestionario para estimar ingestas similares a las obtenidas por otros métodos se estudia comparando sus resultados con los obtenidos por otros métodos considerados como referencias (ej. con registros dietéticos, con recuerdos de 24h). La correlación entre ambos debería estar entre 0.4 y 0.8 (por debajo implica que la confiabilidad de alguno de ellos es inaceptable o que ambos están midiendo cosas diferentes). La validez de la estimación de la ingesta alimentaria está asociada con frecuencia a factores como el sexo, la edad, etc., por lo que hay que tener en cuenta las características personales en el diseño de cuestionarios.

## CODIFICACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LOS DATOS DE INGESTA DE ALIMENTOS

La información de los alimentos ingeridos permitirá conocer los grupos y subgrupos de alimentos que se consumen y que son utilizados en bases de datos de consumo de alimentos (ej. Langual, EuroFir) (Grupo Innovadieta, 2014). Los alimentos ingeridos se tienen que transformar en gramos de alimento, por lo que hay que identificar correctamente los alimentos que constituyen cada plato y determinar el número de gramos de cada uno de ellos. Para ello, se usan tablas de raciones habituales, medidas caseras o recetas (Moreiras *et al.*, 2013). En este proceso de codificación hay que establecer, de forma previa, criterios homogéneos para tomar decisiones ante la falta de información suficiente o adecuada. Por ejemplo, hay que valorar si la persona entrevistada está cualificada para informar sobre la cantidad ingerida en gramos, si no es así, habrá que ignorar la medida que nos ofrece y utilizar lo que se establezca *a priori* como ración habitual. En caso de que la posterior transformación vaya a llevarse a cabo por un método

que no tenga en cuenta la porción comestible, ésta debe considerarse en el cálculo del número de gramos, así como también el cambio de peso del alimento crudo a cocinado.

La transformación de gramos de alimentos por día en  $\mu\text{g}$  carotenoides por día puede llevarse a cabo mediante el uso de bases de datos de composición de alimentos, con información individualizada de carotenoides (ej. Moreiras *et al.*, 2013; Beltrán *et al.*, 2012; USDA-NCC, 1998; O'Neill *et al.*, 2001) o mediante el uso de aplicaciones informáticas especialmente desarrollados para este fin (Estévez-Santiago *et al.*, 2013). Debido a que en la composición y el contenido de carotenoides en alimentos influyen diversos factores, entre los que se encuentran la localización geográfica y el clima, la estacionalidad, las condiciones de crecimiento, etc. (Maiani *et al.*, 2009) es preferible la utilización de TCA que contengan datos de alimentos del país donde se esté realizando la valoración de la ingesta de carotenoides, siempre que cumplan unos criterios mínimos de calidad. En España, por ejemplo, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha coordinado y financiado la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA), construida por una red de investigadores (red BEDCA) conforme a los estándares europeos de la red de excelencia europea EuroFIR (Martínez Burgos *et al.*, 2009; Ros, Martínez de Victoria y Farran, 2009; BEDCA, 2006), pero no incluye datos individualizados de contenido de carotenoides. Para obtener este tipo de información hay que utilizar los datos publicados en artículos científicos (ej. Granado *et al.*, 1992, Olmedilla *et al.*, 1993 con datos de hortalizas y frutas españolas). Existen pocas tablas de composición de carotenoides en alimentos y entre ellas destacan las de West y Poortvliet (1993) y las compilaciones publicadas por O'Neill *et al.*, 2001; USDA-NCC 1998; Beltrán *et al.*, 2012.

## Criterios para la adecuada selección de las tablas y bases de datos de composición de carotenoides en alimentos

Tradicionalmente, las tablas y bases de datos de composición de alimentos (TCA, BDCA) han incluido datos de los carotenoides con actividad de provitamina A, expresando su contenido total o su aporte al contenido de vitamina A en el alimento. Estos datos, en la mayoría de las TCA elaboradas en España, son bibliográficos (Moreiras *et al.*, 2013; CESNID, 2009; Mataix *et al.*, 2003; BEDCA, 2006; Martínez Burgos *et al.*, 2009), pocas incluyen datos analíticos (Requejo *et al.*, 2004). Aunque todavía muy pocas TCA ofrecen datos individualizados de carotenoides, con y sin actividad provitamínica (West y Poortvliet, 1993; Holden *et al.*, 1999; USDA-NCC, 1998; O'Neill *et al.*, 2001), debido al cada vez mayor número de estudios sobre la actividad biológica de los diferentes carotenoides en relación con la salud humana (ej. luteína y zeaxantina en la función visual, licopeno en relación con el sistema cardiovascular), la información que ofrecen se está ampliando y también mejorando su confiabilidad al incluir datos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que permite la separación individualizada de carotenoides, incluso de formas *E* y *Z* y, por lo tanto, facilita el cálculo de la actividad vitamínica del alimento expresada en equivalentes de retinol (ER), equivalentes de actividad de retinol (EAR) o en otras formas de expresión que puedan plantearse con base en el conocimiento sobre su biodisponibilidad y conversión en formas activas.

En general, las fuentes de la variabilidad observada en los datos de contenido de carotenoides en alimentos incluyen aspectos relacionados con la representatividad de la muestra, la identificación del alimento y el método analítico. Estos

factores determinan el grado de confianza con el que el usuario de las TCA puede manejar los datos.

En la identificación del alimento se incluyen los siguientes aspectos: nombre local y nombre científico, descripción del alimento, parte de la planta consumida y porcentaje de porción comestible, análisis del alimento en forma cruda o cocida o procesada, grado de maduración, estacionalidad y humedad de la muestra. En cuanto a la forma de expresar los datos de contenido de carotenoides en alimentos, hay que considerar la técnica analítica utilizada (HPLC, cromatografía en columna, espectrofotometría), el término utilizado para referirse a los carotenoides y si en el análisis se ha incluido un proceso de saponificación. A este respecto, hay que recordar que con la cromatografía en columna y la espectrofotometría no se suelen cuantificar los carotenoides de forma separada. Por otra parte, en las TCA no se indica si en el análisis de alimento se ha incluido un proceso de saponificación, paso crítico cuando el alimento contiene sustancias que pueden interferir en el análisis (ej. clorofilas) y cuando los carotenoides se encuentran en forma esterificada en el alimento.

En las tablas de composición de alimentos hay numerosos factores que pueden dar lugar a una falta de confiabilidad en los datos (ej. identificación del alimento, valores de alimento crudo o cocinado) y dificultar la comparación de la ingesta (ej. términos erróneamente usados para referirse a los carotenoides, como puede ser indicar carotenos para designar al  $\beta$ -caroteno solamente; técnicas analíticas para el análisis de carotenoides en alimentos, como HPLC y espectrofotometría, que dan lugar a resultados que en general no son comparables) (Granado *et al.*, 1997), dando lugar a que el contenido de carotenoides en determinados alimentos puede ser sobre o infra-estimado en las bases de datos (Granado *et*

*al.*, 1997; Faber *et al.*, 2013), por lo que la utilización de una única fuente puede magnificar el error, dependiendo de la frecuencia de consumo de determinados alimentos y, como resultado, la “verdadera” ingesta en una población o grupo puede estar enmascarada, debilitando la fuerza del estudio y dando lugar a conclusiones erróneas (Granado *et al.*, 1997).

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la ingesta dietética de carotenoides se pueden interpretar con base en la contribución de la ingesta de vitamina A, de los carotenoides con actividad provitamínica A, o de forma individual, ya que en general las ingestas de todos los carotenoides han sido asociadas con una menor incidencia de diversas enfermedades crónicas (ej. luteína y zeaxantina con enfermedades oculares tales como las cataratas y la degeneración macular asociada a la edad; el licopeno con el cáncer de próstata;  $\beta$ -criptoxantina con el aumento de la masa ósea). Como ya se ha comentado, con la dieta habitual se ingieren más de cuarenta carotenoides, de los cuales, los más estudiados son:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina (con actividad de provitamina A) y luteína, zeaxantina, licopeno (no provitamínicos). La valoración individual de cada uno de ellos facilita un correcto estudio de la relación con distintas situaciones de salud o enfermedad; de gran importancia, ya que, como se ha observado en la última encuesta de nutrición y salud en Estados Unidos, cada uno de ellos tiene diferentes efectos en relación con las causas de mortalidad y además muestran interacciones entre ellos (Shardell *et al.*, 2011).

Para una adecuada valoración de la contribución de los carotenoides a la ingesta de vitamina A es necesario considerar no sólo la concentración de los carotenoides provitamínicos en

los alimentos, sino también la biodisponibilidad y la capacidad de conversión en retinol de los carotenoides que se ingieren (Maiani *et al.*, 2009; Burri, Chang y Neidlinger, 2011), pero estos aspectos no han sido todavía incluidos en las TCA, aunque sí son tenidos en cuenta en las fórmulas utilizadas para valorar la contribución de cada alimento a la ingesta de vitamina A, como equivalentes de retinol (ER) (FAO-WHO, 2001, Moreiras *et al.*, 2013) o como equivalentes en actividad de retinol (EAR) (IOM, 2000):

respectivamente). Recientemente se ha publicado la ingesta dietética de vitamina A (datos individualizados de retinol,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) en la población española valorada con base en los datos de consumo de alimentos aportados por la Encuesta Nacional de Ingestas Dietéticas realizada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en 2009-2010 (ENIDE, 2011), siendo el consumo medio de vitamina A de 716.4  $\mu\text{g}$  ER (565.8  $\mu\text{g}$  EAR), del cual, 57.9% ER (79.3% EAR) se aporta como retinol preformado a partir de leche y productos lácteos y de carne y productos cárnicos.

$$\text{ER } (\mu\text{g/día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/6) + (\alpha\text{-caroteno}/12) + (\beta\text{-criptoxantina}/12) \quad [1]$$

$$\text{EAR } (\mu\text{g/día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/12) + (\alpha\text{-caroteno}/24) + (\beta\text{-criptoxantina}/24) \quad [2]$$

Actualmente, la contribución de los carotenoides con actividad provitamínica A a la ingesta de vitamina A expresada como EAR está siendo cuestionada ya que, según las últimas investigaciones, podría ser mayor (Burri, Chang y Neidlinger, 2011; Tang, 2010).

En estas estimaciones no se valoró la ingesta de los numerosos alimentos fortificados o enriquecidos con vitamina A (principalmente en forma de carotenoides con actividad de provitamina A) que están comercialmente disponibles, por lo que habrá una cierta infravaloración de la ingesta dietética.

La adecuación de la ingesta dietética se obtiene al compararla con las recomendaciones de ingesta que emiten o adoptan en cada país diversos organismos científicos o de salud pública. En España, son ampliamente utilizadas las recomendaciones emitidas por la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD, 2010) (700 y 600  $\mu\text{g}$  ER/día para hombres y mujeres, respectivamente), por Moreiras *et al.* (2013) y por el Institute of Medicine (2000) (900  $\mu\text{g}$  y 700  $\mu\text{g}$  EAR/día para hombres y mujeres,

Las recomendaciones de ingesta de componentes esenciales presentes en la dieta se emiten con base en el conocimiento científico disponible en cada momento, que relacione la ingesta de los nutrientes con el estado de salud. Hay recomendaciones de ingesta para los carotenoides en cuanto a su capacidad de contribuir a la ingesta de vitamina A, pero no hay en relación con otros posibles beneficios para la salud. El Institute of Medicine (IOM, 2000) emite las estimaciones de las ingestas dietéticas de referencia (DRI, Dietary Reference

Intakes) para ser utilizadas en la preparación y valoración de dietas para personas sanas, y que deberían ser de ayuda para que los individuos mantengan la salud, y para prevenir enfermedades y evitar consumir demasiado de un mismo nutriente. La DRI es un término colectivo que incluye: EAR (*Estimated Average Requirement*, requerimiento medio estimado), RDA (*Recommended Dietary Allowance*, ingesta dietética recomendada; es el nivel de ingesta que cubre las necesidades de 97.5% de la población sana), AI (*Adequate Intake*, ingesta adecuada), UL (*Tolerable Upper Intake Level*, nivel de ingesta máximo tolerado). Se utiliza un componente u otro de las DRI según el ámbito de aplicación, así, la EAR, es apropiado para aplicaciones relacionadas con planificación y valoración de ingestas en grupos de personas; las DRI son utilizadas por agentes implicados en salud pública, desde aquellos que establecen políticas nacionales de nutrición hasta los profesionales de la salud en zonas comunitarias.

En el establecimiento de las DRI se tienen en cuenta las posibles pérdidas que se producen, tanto por tratamientos sobre el alimento (culinarios, industriales, de conservación, etc.) como por la incompleta utilización debida a la variabilidad individual en los casos de digestión, absorción y metabolismo. Los valores de ingestas recomendadas pueden ser diferentes para cada grupo de sexo, edad, nivel de actividad física y, en el caso de las mujeres, para los diferentes estados fisiológicos (embarazo, lactancia, etc.). Las ingestas de referencia (IR) están expresadas como cantidad por persona y día. Esto no significa que el consumo deba ser diario. Habitualmente se juzga la dieta media de 7-15 días aproximadamente, porque una persona en un estado de salud óptimo, tiene suficientes reservas corporales para cubrir las posibles variaciones diarias en la ingesta (Carbajal, 2013). Sin embargo, hay que recordar que las recomendaciones de ingesta de nutrientes se basaron

inicialmente en el mantenimiento de la salud definida como ausencia de enfermedad, pero que, desde mediados del siglo XX, la Organización Mundial de la Salud considera la salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y esto hace que se trate de buscar en la alimentación, no sólo un medio de evitar la enfermedad carencial, sino también de tener una salud óptima y disminuir el riesgo de enfermedades crónicas o degenerativas. En general, las cantidades son mayores para obtener una prevención de enfermedad crónica que para cubrir las necesidades metabólicas (asociadas, cuando hay deficiencia, a la enfermedad carencial correspondiente).

Independientemente de su contribución a la ingesta de vitamina A, para los carotenoides, al igual que para otros muchos componentes de la dieta, no hay recomendaciones de ingesta establecidas. Sin embargo, cuando con su ingesta se persiguen una disminución de riesgo de enfermedades crónicas o alcanzar un estado óptimo de salud, se observa que los niveles de ingesta de carotenoides asociados a esos beneficios son muy variables según los diferentes tipos de estudios, debido a la gran variabilidad en la ingesta dietética entre sujetos y en el mismo sujeto, así como entre poblaciones (IOM, 2000) derivada tanto de factores naturales o intrínsecos (ej. cambios dietéticos, estacionalidad) como de aspectos metodológicos (ej. métodos de valoración de la ingesta y confiabilidad de las TCA) (Granado *et al.*, 1997). Por otra parte, la comparabilidad entre estudios poblacionales está condicionada por aspectos como el nivel de representatividad de la muestra (ej. tamaño de la muestra, rango de edades), el tipo de encuesta dietética y las TCA utilizadas.

De entre los carotenoides, para el que se dispone de un mayor nivel de información, por ser el que muestra mayor

especificidad en la distribución y actividad en el organismo humano, es la luteína. Con base en la gran información disponible sobre contenido en alimentos y en suero, estudios epidemiológicos e *in vitro*, estudios de intervención en humanos (con diversos objetivos), se puede considerar que es deseable mantener una concentración de luteína en suero en el rango de entre 0.6 y 1.05  $\mu\text{mol/L}$  (34-60  $\mu\text{g}$  luteína /dl) (Granado, Olmedilla y Blanco, 2003) para procurar un efecto beneficioso sobre la función visual y asegurar una adecuada disponibilidad en tejidos (ej. en mácula), ya que estos niveles se han asociado con efectos benéficos, sin riesgo de posibles efectos secundarios (el nivel de ingesta considerado seguro es de 20 mg/día (Shao y Hathcock, 2006). Esta concentración en sangre se puede alcanzar por medio de una ingesta media de 6 mg luteína y zeaxantina/día, mediante la ingesta habitual de alimentos ricos en luteína que permita asegurar un aporte algo mayor al indicado, ya que la biodisponibilidad a partir de alimentos es variable (O'Neill *et al.*, 2001), así como también mediante el consumo de complementos alimenticios y de alimentos funcionales.

Otros dos carotenoides que merecen ser mencionados en relación con su posible papel en la reducción de riesgo de enfermedades son el  $\beta$ -caroteno y el licopeno. La cantidad media de consumo de  $\beta$ -caroteno en España es 1.5 mg/persona/día (Granado, Blázquez y Olmedilla, *et al.*, 2007) y de 2-5 mg/persona (europea)/día (O'Neill *et al.*, 2001) a partir de fuentes dietéticas naturales (excluyendo su ingesta como aditivo y como complemento alimenticio). Como aditivo alimentario,  $\beta$ -caroteno se ingiere entre 1-2 mg/p/día (EFSA, 2006). Hay que diferenciar entre los niveles de ingesta que pueden beneficiar a la salud (hasta 10 mg/d, principalmente

a partir de fuentes naturales) y aquellos que pueden producir efectos adversos (aumento de riesgo de cáncer de pulmón) en fumadores de la población general (20 mg/día) (EFSA, 2006). En cuanto al licopeno, la ingesta media en España es de 3 mg/p/d (datos no publicados calculados con base en la ENIDE 2011), y está establecido el nivel de ingesta seguro en 75 mg licopeno/día (Shao y Hathcock, 2006).

## OPORTUNIDADES PARA INVESTIGACIÓN

La estimación de la ingesta dietética de carotenoides sería más precisa y permitiría una mejor comparación de datos si se utilizasen tablas de composición de carotenoides en alimentos que incluyan datos de su contenido de forma individualizada (obtenidos mediante HPLC), de información adicional, como por ejemplo la inclusión de saponificación y, finalmente, si en ellas se empezase a incluir información sobre su bioaccesibilidad.

La forma más reciente de expresión de la contribución de los carotenoides a la ingesta de vitamina A, los equivalentes en actividad de retinol (EAR), implica una reducción en su aporte respecto al cálculo realizado mediante los equivalentes de retinol (ER) y conlleva un aumento en la detección de inadecuaciones en la ingesta de esta vitamina, que no suele confirmarse al utilizar marcadores bioquímicos (retinol en sangre) en grupos de población de sociedades desarrolladas. Sería de gran utilidad ampliar los estudios sobre biodisponibilidad y bioaccesibilidad, generalmente realizados con  $\beta$ -caroteno, con alimentos ricos en  $\beta$ -criptoxantina y en  $\alpha$ -caroteno.

## REFERENCIAS

- BEDCA. Base Española de Datos de Composición de Alimentos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2006. Disponible en: [www.bedca.net](http://www.bedca.net) [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion\\_riesgos/subdetalle/riesgos\\_bedca.shtml](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subdetalle/riesgos_bedca.shtml) [consulta: octubre de 2014].
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S. y Olmedilla Alonso, B. 2012. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1334-1343.
- Burri, B.J., Chang, J.S.T. y Neidlinger, T.R. 2011. *British Journal of Nutrition* 105: 212-219.
- Carbajal, A., Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid. 2013. Disponible en: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/manual-de-nutricion> Cap. 3 <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-3-ingestas-recomendadas.pdf> [consulta: 7 de diciembre de 2014].
- CESNID. Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica. Tablas de composición de alimentos. Coordinadas por Andreu Farran. Barcelona: Mc-Graw-Hill/Edicions de la Universitat de Barcelona. 2009.
- EFSA. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*. 2006. Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. European Food Safety Authority (EFSA).
- ENIDE, Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (2009-2010) 2011. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (Aecosan). Disponible en: [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/Presentacion\\_ENIDE.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentacion_ENIDE.pdf) [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion\\_riesgos/subseccion/enide.shtml](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subseccion/enide.shtml) [consulta: 15 de diciembre de 2014].
- Estévez-Santiago, R., Beltrán de Miguel, B., Cuadrado-Vives, C. y Olmedilla-Alonso, B. 2013. *Nutrición Hospitalaria* 28: 823-829.
- Faber, M., Wenhold, F.A.M., MacIntyre, U.E., Wentzel-Viljoen, E., Steyn, N.P., Oldewage-Theron, W.H. 2013. *Nutrition* 29: 1286-1292.
- FAO-WHO. 2001. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a Joint FAO-WHO Expert Consultation. Roma: FAO.
- Federación Española de Sociedades de Nutrición Alimentación y Dietética (FESNAD). 2010. Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. Pamplona: EUNSA.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. y Rojas-Hidalgo, E. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2135-2140.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Gil-Martínez, E. y Rojas-Hidalgo, E. 1997. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 621-633.
- Granado, F., Olmedilla, B. y Blanco, I. 2003. *British Journal of Nutrition* 90: 487-502.

## REFERENCIAS

- Granado, F., Blázquez, S. y Olmedilla, B. 2007. *Public Health Nutrition* 10: 1018-1023.
- Grupo Innovadieta. Sistemas de clasificación de alimentos. Disponible en: <https://www.ucm.es/innovadieta/composicion-alimentos> [consulta: 20 de diciembre de 2014].
- Holden, J., Eldrige, A., Beecher, G., Buzzard, I., Bhagwat, S., Davis, C. 1999. *Journal of Food Composition and Analysis* 12: 169-196.
- IOM. Institute of Medicine. 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington D.C.:National Academy Press.
- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D. y Schlemmer, U. 2009. *Molecular Nutrition in Food Research* 53: S194-S218.
- Martín-Moreno, J.M. y Gorgojo, L. 2007. *Revista Española de Salud Pública* 81: 507-518.
- Martínez-Burgos, M.A., Martínez-Victoria I., Milá R., Farrán A., Farré, R., Ros, G., Yago, M.D., Audi, N., Santana, C., López Millán, M.B., Ramos López, S., Mañas, M., Martínez-Victoria, E. en nombre de la red BDECA. 2009. *Food Chemistry* 113: 784-788.
- Mataix, J., Mañas, M., Llopis, J. y Martínez de Victoria, E. 2003. *Tablas de composición de Alimentos Españoles*. Granada: Universidad de Granada.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, M.L. y Cuadrado, C. 2013. *Tablas de Composición de Alimentos. Guía de Prácticas*. Madrid: Ediciones Pirámide.
- O'Neill, M., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I. 2001. *British Journal of Nutrition* 85: 499-507.
- Olmedilla Alonso, B. 2010. En B. Olmedilla (dir.), *Alimentos funcionales: importancia del laboratorio clínico y nuevas perspectivas*. Barcelona: Comité de Comunicación de la Sociedad Española de Química Bioquímica Clínica y Patología Molecular. pp. 11-29..
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I. y Rojas-Hidalgo. E. 1993. En K.W. Waldron, I.T. Johnson y G.R. Fenwick (eds.). *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 141-145.
- Patterson, R.E. y Pietinen, P. 2006. En M.L. Gibney, B.M. Margetts, J.M. Kearney, L. Arab, L. Acribia, S.A. *Nutrición y Salud Pública*. Zaragoza: Acribia.
- Requejo, A., Ortega, R., Andrés, P., Ruiz, F., Sánchez-Muniz, F. y González-Fernández, M. 2004. En M.L. Carretero y M.D. Gómez. *Tablas de composición de alimentos españoles*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

## REFERENCIAS

- Ros, G., Martínez de Victoria, E. y Farran, A. 2009. *Food Chemistry* 113: 789-794.
- Shao, A. y Hathcock, J.N. 2006. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45: 289-298.
- Shardell, M., Alley, D., Hick, G. y El-Kamary, S. 2011. *Nutrition Research* 31: 178-189.
- Tang, G. 2010. *American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1468S-1473S.
- USDA-NCC Carotenoid Database for U.S. Foods. 1998. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference- release 26. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/car98/car98.html> [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- West, C.E. y Poortvliet, E.J. 1993. The Carotenoid Content of Foods with Special Reference to Developing Countries. Vitamin A Field Support Project, Virginia: International Science and Technology Institute.

## CAPÍTULO 20

# METABOLISMO DE CAROTENOIDES EN EL FRUTO DEL OLIVO Y SUS MODIFICACIONES EN EL PROCESADO INDUSTRIAL

María Roca, Lourdes Gallardo-Guerrero y Beatriz Gandul-Rojas



## INTRODUCCIÓN

El olivo, *Olea europaea* L. es la única especie de la familia Oleácea, con fruto comestible. Es una de las plantas cultivadas más antiguas, cuyos orígenes como cultivo datan de unos 4000 años antes de Cristo en la zona de Palestina (Rapoport, 1997). Tras la floración, polinización y fecundación (abril-mayo), se inicia el periodo de crecimiento y desarrollo, que en el caso de la aceituna puede ser muy prolongado (6-7 meses) comparado con otros frutales de hueso (Hermoso *et al.*, 1997). La aceituna es un fruto pequeño de forma elipsoidal a globosa. Normalmente mide 1-4 cm de longitud y 0.6-2 cm de diámetro, dependiendo de la variedad. Botánicamente, la aceituna es una drupa, con una sola semilla, y compuesta por tres tejidos: endocarpio (o hueso), mesocarpio (o pulpa) y exocarpio (o piel) (Rapoport, 1997). El periodo de maduración comienza en torno a las 30 semanas después de la floración (Sánchez, 1994) y conlleva grandes cambios en el fruto, tales como la respiración (Maxie, Catlin

y Hartman, 1960), modificaciones en la fracción lipídica (Catalano y Sciencalepore, 1965), la evolución de ácidos grasos (Gutiérrez *et al.*, 1999), la variación del contenido de hierro como metabolizante de hormonas de abscisión (Vioque y Albi, 1975), la evolución de los polifenoles (Vázquez, Maestro y Graciani, 1971), etc. Sin embargo, el signo más evidente de la maduración es el cambio de coloración que experimenta el fruto durante esta fase. La aceituna, que inicialmente presenta una coloración verde, va tornándose a un verde amarillento. A continuación comienza una síntesis de antocianinas, que resulta en un cambio de coloración a morado-negro que va cubriendo al fruto, inicialmente en la epidermis para ir profundizando hasta cubrir todo el mesocarpio (Humanes, 1992).

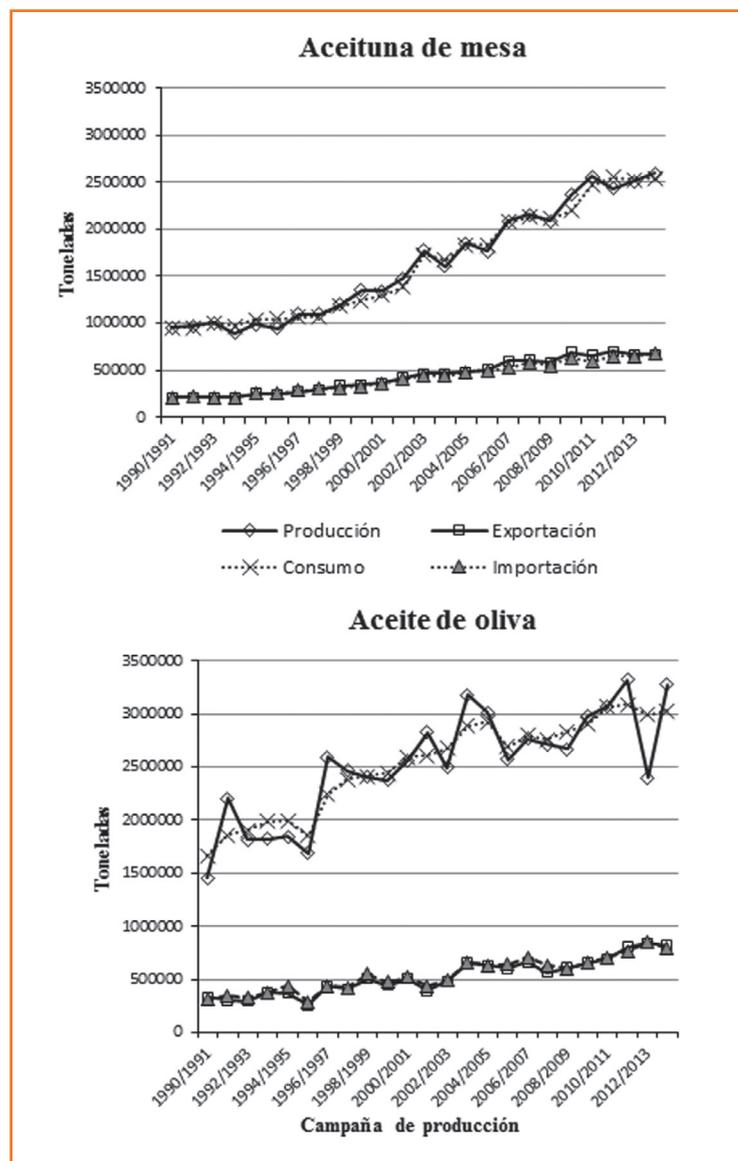
La aceituna contiene entre 60-75% de agua, 10-25% de lípidos, 3-6% de azúcares, 1-4% de fibra, 1-3% de proteínas, y una serie de compuestos minoritarios, entre los que se encuentran hidrocarburos, terpenos, esteroides, alcoholes, clorofilas y carotenoides, polifenoles y compuestos volátiles, que son responsables de las exclusivas características de la aceituna de mesa y del aceite de oliva.

En la actualidad se tienen descritas más de un centenar de variedades en todo el mundo (IOC, 2013a), que se pueden clasificar en función de sus aptitudes en tres grandes grupos: variedades para ser procesadas como aceitunas de mesa, variedades para la obtención del aceite de oliva y variedades que pueden ser destinadas a ambos procesamientos. En la actualidad, se producen unos 10 millones de toneladas de aceitunas en el mundo, 90% de las cuales son destinadas a la obtención del aceite de oliva y 10% para su elaboración como aceituna de mesa (Civantos, 2008). Entre las variedades más importantes se encuentran Hojiblanca, Picual y Arbequina

(España), Koroneiki (Grecia), Coratina, Frantoio y Leccino (Italia) (IOC, 2013a).

En la figura 1 se muestran las tendencias ascendentes en los valores de producción, exportación, importación y consumo de aceitunas de mesa y aceite de oliva desde la campaña 1990-1991. Según datos del Comité Oleícola Internacional (IOC, 2014), la producción media mundial de aceitunas de mesa en las últimas seis campañas (comprendidas entre 2008-2009 y 2013-2014) asciende a 2 425 800 t, de las cuales 528 800 se produjeron en España, es decir, 21.8% del total, lo que la convierte en el principal país productor, seguido por Egipto (16.7%) y Turquía (15.5%), y con mucha más diferencia por Argelia, Siria, Grecia y Argentina (con valores comprendidos entre 6.6 y 5.2%, de la producción mundial). La exportación media mundial de las últimas seis campañas alcanzó las 661 400 t (IOC, 2014), siendo asimismo España el primer país exportador de aceituna de mesa, con 200 800 t (30.4% de la exportación mundial), seguida a gran distancia por Egipto (13.8%), Argentina (12.2%), Marruecos (10.4%), Turquía (10.1%), Grecia (8.1%), Siria (3.9%) y Perú (3.5%). Estados Unidos es el principal país importador de aceitunas de mesa, con 143 300 t (que representan 23% del total de aceitunas importadas), seguido por Brasil (15%), Rusia (12%), Arabia Saudita (5.1%) y Canadá (4.5%). De entre todos los países consumidores de aceituna de mesa destacan dos de los principales países productores, Egipto y Turquía, con valores que representan 13.4 y 12.9% de la cantidad total media de aceitunas consumidas en los últimos seis años, y que ha sido de 2 398 300 t, seguidos de Estados Unidos, con 8.9%, España (6.8%), Argelia (6.7%), Italia (5.7%) y Rusia (3.1%).

Con respecto al aceite de oliva, (IOC, 2014a), la producción media mundial de las últimas seis campañas asciende a



**FIGURA 1.** Evolución en los valores de producción, exportación, importación y consumo de aceitunas de mesa y aceite de oliva desde la campaña 1990-1991. El término *campaña* se refiere al periodo comprendido entre el primero de octubre de un año y el 30 de septiembre del siguiente. (Fuente: IOC, 2014,a.)

2951 800 t, de las cuales 71.7% se producen en la Unión Europea (UE). España es el primer país productor con 1 305 400 t (44.2% del total mundial), seguido a gran distancia por Italia (16.2 %), Grecia (9.7%), Turquía (5.7%), Siria (5.6%), Túnez (5.1%), Marruecos (3.9%), Portugal (2.3%) y Argelia (1.7%). La exportación media mundial de las últimas seis campañas alcanzó las 736 800 t, correspondiendo 67.2% a la Unión Europea. España e Italia son los principales exportadores, con 29.5% y 29.2% respectivamente de la exportación total mundial. En segundo término destaca Túnez (16.1%), y a menor escala Portugal (6.0%) y Turquía (5.0%), seguidos de Siria (3.1%), Argentina (2.3%) y Marruecos (2.0%). En importación, Estados Unidos también ostenta el liderazgo en el aceite de oliva, con 99 600 t (que representan 38.4% del total mundial). Le sigue la Unión Europea que importa 99 600 t (13.7%), donde destaca sobre todo Italia, que importa 69 500 t (9.5% del total mundial). Le siguen Brasil (8.4%), Japón (5.8%), Canadá (5.1%), Australia (4.1%), Rusia (3.1%), Arabia Saudita (1.8%), Suiza (1.7%), España (1.6%) y México (1.6%).

El aceite de oliva se consume fundamentalmente en los países olivareros, aunque su consumo entre los países no productores ha aumentado en los últimos años. Algo más de la mitad del consumo mundial se hace en la Unión Europea (59.8%), Italia ocupa el primer puesto con 637 600 t (21.4% del total mundial). Le siguen importantes países productores como España (18.0%), Grecia (6.9%), Turquía (4.5%), Siria (4.2%), Marruecos (3.6%), Portugal (2.7%) y Argelia (1.7%). Entre los países poco productores (<1%) destacan por un relativamente alto consumo, Estados Unidos (9.4%), Francia (3.7%), Brasil (2.1%), Australia (1.4%), Japón (1.4%) y Canadá (1.3%).

## METABOLISMO

### Biosíntesis de carotenoides y perfil en fruto verde

Los carotenoides presentes en el fruto de la aceituna son los siguientes: luteína, que es el carotenoide mayoritario en la aceituna y el único representante de la serie  $\beta,\epsilon$ . Mientras el resto de los carotenoides que conforman el perfil de carotenoides en la aceituna pertenecen a la serie  $\beta,\beta$ :  $\beta$ -caroteno, violaxantina, neoxantina, anteraxantina y  $\beta$ -criptoxantina. Luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina constituyen más de 95% de los carotenoides presentes en la aceituna, y son los carotenoides característicos de un fruto verde (Gross, 1987). Cuando la intensidad lumínica es alta, violaxantina se transforma vía anteraxantina en zeaxantina (Schindler y Lichtenthaler, 1996). Sin embargo, zeaxantina no ha sido identificada en ningún momento del crecimiento o maduración de las aceitunas (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995; Roca y Mínguez-Mosquera, 2001; Criado *et al.*, 2007; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2009; Roca, León y De la Rosa, 2011). En paralelo, e independientemente del alto contenido graso del fruto, las xantofilas permanecen sin esterificar (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989), indicando que el cloroplasto permanece intacto (Goodwin, 1976).

Desde un punto de vista cuantitativo, se puede hablar de tres grupos de variedades, aquellas denominadas de alta pigmentación (tipo Hojiblanca o Picual, con unos contenidos en fruto verde de 70-85 mg carotenoides/kg peso seco), variedades de contenido intermedio (tipo Cornicabra, con unos 50 mg carotenoides/kg peso seco) y las denominadas variedades de baja pigmentación, tipo Arbequina o Blanqueta,

con unos 20 mg de carotenoides/kg peso seco en el estado de verde) (Roca and Mínguez-Mosquera, 2001).

No son muchos los trabajos que han estudiado la biosíntesis de carotenoides durante el periodo de crecimiento de la aceituna. Concretamente, Roca y Mínguez-Mosquera (2003) estudiaron la evolución del contenido de los carotenoides mayoritarios en las variedades Hojiblanca, Picual y Arbequina durante las 12-16 semanas de crecimiento. Durante dicha fase, la curva de biosíntesis de carotenoides del fruto exhibe un incremento continuado en las primeras fases del periodo, para luego permanecer constante, a diferentes niveles, dependiendo de la variedad, hasta que el fruto está completamente desarrollado.

Pormenorizando el estudio a carotenoides individuales, luteína mantiene constante prácticamente su concentración durante el periodo de crecimiento en los frutos de las tres variedades y es el que representa el mayor porcentaje de los cuatro carotenoides básicos que constituyen el “cloroplasto universal”. Este hecho confirma su función vital en la fotosíntesis. Estudios recientes con mutantes de *Arabidopsis* (Dall’Osto *et al.*, 2006) han puesto de manifiesto que la ausencia de luteína en el cloroplasto supone una merma importante en la fotosíntesis, aunque pueda ser sustituida parcialmente por violaxantina.

En cuanto a los carotenoides de la serie  $\beta,\beta$ , al ser  $\beta$ -caroteno el precursor de los mismos, las fluctuaciones que describe su línea de evolución durante todo el periodo de crecimiento del fruto (Roca y Mínguez-Mosquera 2003), repercuten y se corresponden con las mostradas por los carotenoides cuya formación depende directa o indirectamente de la síntesis de este compuesto. Además, para las tres variedades, se constata que el descenso en la concentración de anteraxantina repercute en un mantenimiento de concentración

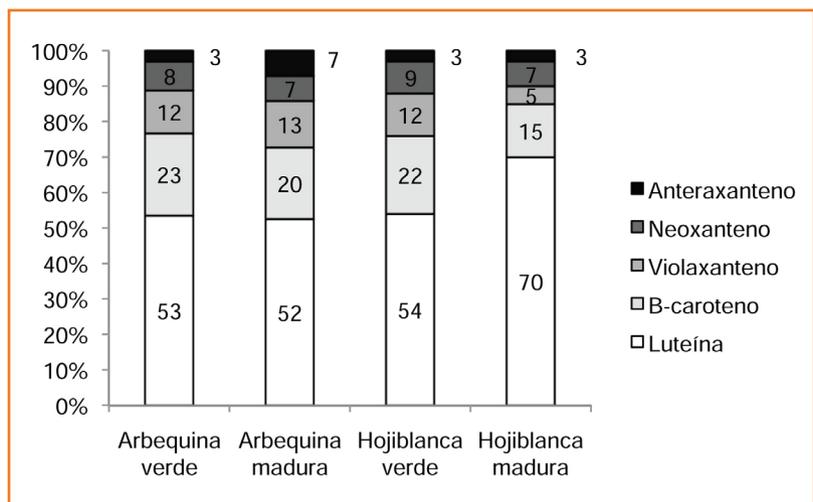
de violaxantina y neoxantina, y que el mantenimiento de concentración de neoxantina se realiza a costa de sus respectivos predecesores. En el caso específico de la variedad Arbequina, la evolución de carotenoides hasta la semana siete de crecimiento del fruto coincide con lo ocurrido en las anteriores, de forma que anteraxantina vuelve a ser intermediario en la síntesis del resto de pigmentos. Pero, además, seguidamente se constata un incremento progresivo de concentración que coincide con un descenso en la de violaxantina en favor de la concentración de neoxantina. Eso implica que durante este tiempo ocurre una síntesis neta de  $\beta$ -caroteno, que acusan de forma directa y distinta los carotenoides que origina. En las tres variedades,  $\beta$ -criptoxantina actúa únicamente como intermediario, por lo que su concentración, a nivel de trazas, fluctúa durante toda la etapa de crecimiento.

La constante transformación de unos pigmentos en otros a partir de sus precursores inmediatos pone de manifiesto la actividad biosintética de carotenoides durante la etapa de crecimiento de los frutos en las tres variedades. Como consecuencia del proceso biosintético, la composición porcentual de carotenoides en un fruto verde es (figura 2) de 50-55% de luteína, 20-23% de  $\beta$ -caroteno, 12% de violaxantina, 8% de neoxantina y 2% de anteraxantina.

## Degradación de carotenoides

Los carotenoides están asociados a las clorofilas en los tejidos fotosintéticos, por eso la mayoría de los frutos, cuando están inmaduros, son de coloración verde. Conforme avanza la maduración, la actividad fotosintética decrece y las clorofilas se degradan. Los carotenoides asociados con estos compuestos suelen ser catabolizados al mismo tiempo. Alternativamente, la concentración de los carotenoides puede mantenerse constante o, como resultado de la síntesis de nuevos carotenoides, incluso incrementar. Este es el caso de los llamados frutos carotenogénicos, que se diferencian de aquellos frutos en los que la maduración está asociada con la síntesis de antocianinas y betalaínas (Gross, 1987). En tales casos, el típico patrón carotenoides del cloroplasto no se modifica durante la maduración. Sin embargo, la velocidad de degradación de cada uno de los carotenoides del cloroplasto puede ser muy diferente, por lo que las proporciones relativas de cada carotenoides en un cloroplasto maduro pueden haberse modificado.

El periodo de maduración de una aceituna suele comenzar en noviembre o diciembre y extenderse entre 4-6 semanas, dependiendo de la variedad. El proceso de degradación de carotenoides en el fruto de la aceituna durante la fase de



**FIGURA 2.** Composición porcentual de carotenoides individuales en frutos de olivo de las variedades Arbequina y Hojiblanca en diferentes estados de madurez.

maduración ha sido estudiado en varias variedades: Gordal (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995a), Hojiblanca, Picual, Blanqueta y Cornicabra (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001), Farga (Criado *et al.*, 2007), Coratina, Frantoio y Koroneiki (Aparicio-Ruiz, Gandul-Rojas y Roca, 2009), Sikitita (Roca, León y De la Rosa, 2011). En todas ellas, cualitativamente, el perfil de carotenoides de la aceituna no se modifica durante el proceso de maduración de la aceituna. Durante este periodo, en los frutos se observa una degradación paulatina y progresiva de todos los carotenoides, tanto de la serie  $\beta,\epsilon$  como de la serie  $\beta,\beta$ .

Específicamente, se ha analizado la cinética de degradación de los principales carotenoides de la aceituna durante la maduración en las variedades Hojiblanca y Picual (Roca y Mínguez-Mosquera, 2003). Las pendientes obtenidas de las ecuaciones cinéticas permiten comparar directamente las velocidades de degradación entre variedades y entre carotenoides. Se observa cómo los mayores coeficientes corresponden a los frutos de la variedad Picual ( $B = -0.298$  de media) en comparación con los de Hojiblanca ( $B = -0.236$  de media), pero existe entre ambas un paralelismo en el orden de degradación de los carotenoides. Para ambas variedades, luteína es el carotenoide que más lentamente se degrada ( $B = -0.21$  y  $-0.15$ , respectivamente), seguido de anteraxantina ( $B = -0.28$  y  $-0.21$  respectivamente), posteriormente, y con valores similares,  $\beta$ -caroteno y neoxantina, y el carotenoide que más rápidamente se degrada es violaxantina ( $B = -0.34$  y  $-0.29$ ).

## Carotenogénesis

Durante la maduración de un fruto no carotenogénico, las clorofilas se degradan gradualmente, y la concentración de carotenoides desciende en paralelo. Sin embargo, en un

fruto carotenogénico, la evolución es diferente; mientras las clorofilas son catabolizadas, los carotenoides son sintetizados, ya sea los pre-existentes o los nuevos carotenoides. En los frutos carotenogénicos, el patrón típico de carotenoides del cloroplasto, en los que  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina son mayoritarios, se transforma gradualmente en otro, en algunos casos más complejo, con patrón típico de cromoplastos.

De forma exclusiva, en los frutos de la variedad Arbequina (Gandul-Rojas *et al.*, 1999) y en los de la variedad Sikitita (Roca, León y De la Rosa, 2011), además de los carotenoides típicos del cloroplasto verde, se acumulan durante todo el ciclo de maduración xantofilas esterificadas, específicamente neoxantina y violoxantina.

A diferencia de lo que acontece en los frutos del resto de las variedades de aceitunas durante la maduración, que consiste en una degradación continuada durante toda la etapa, en los frutos de la variedad Arbequina, en etapas tempranas de maduración, se observan incrementos significativos de carotenoides en mitad del proceso catabólico. Este hecho, en conjunción con una degradación masiva de clorofilas y un menor contenido de pigmentos en esta variedad (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001) provoca que los frutos de la variedad Arbequina tengan una coloración amarillenta, relativamente intensa, mientras el resto de las variedades muestran, para esa misma etapa, una coloración verde claro.

Específicamente (tabla 1), en los primeros estados de maduración en los frutos de la variedad Arbequina se observan incrementos netos en las concentraciones de luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y anteraxantina, mientras que

**TABLA 1.** Evolución en la concentración de carotenoides en frutos de la variedad Arbequina durante el comienzo de la maduración (mg/kg ps)

Estado madurez	Luteína	$\beta$ -caroteno	Neoxantina	Violaxantina	Anteraxantina	Xantofilas esterificadas
1	11.2	4.0	1.4	2.3	1.2	0.3
2	13.0	4.8	1.3	3.2	1.7	0.4
3	11.5	3.6	1.0	2.2	1.7	0.5
4	9.9	3.5	1.0	2.3	1.3	0.5

**Fuente:** Los autores.

el contenido de xantofilas esterificadas aumenta gradual y continuamente durante todo el periodo controlado (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001).

Como generalización se acepta (Gross, 1987) que, durante el proceso carotenogénico, la ruta  $\beta,\epsilon$ , normalmente predominante, sea reemplazada en parte por carotenoides de la serie  $\beta,\beta$ . Sin embargo, en el caso específico de los frutos de la variedad Arbequina, se contabiliza biosíntesis en los carotenoides de ambas series (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001).

La investigación sobre el proceso carotenogénico que tiene lugar en ciertos frutos se ha desarrollado en aquellas especies en las que el proceso biosintético es muy intenso, tipo tomate (Bramley, 2002) o pimiento (Rodríguez-Urbe *et al.*, 2011). Se ha establecido que, a diferencia de lo que ocurre en los cloroplastos, que contienen un número concreto de carotenoides similares entre las distintas especies vegetales, el cromoplasto puede acumular en algunos casos una gran diversidad de nuevos carotenoides (Price *et al.*, 1995). En los frutos de la variedad Arbequina el proceso carotenogénico

está expresado a un nivel bajo, con incrementos puntuales de carotenoides, no excesivos pero sí estadísticamente significativos. Al estar acompañados de la identificación de xantofilas esterificadas, que se acumulan progresivamente durante toda esta etapa, permiten asegurar que los frutos de esta variedad son carotenogénicos. La esterificación de xantofilas tiene lugar exclusivamente a nivel de carotenoides sintetizados *de novo* en cromoplastos y no en cloroplastos. Dicha esterificación incrementa la naturaleza lipofílica de los carotenoides, contribuyendo a su acumulación en los plastoglobulos. En este sentido, es plausible pensar que cierta fracción de los cloroplastos en los frutos de la variedad Arbequina no sean transformados en gerontoplastos sino que evolucionen a cromoplastos.

### Diferencias en carotenoides según la variedad y los estados de madurez

Como consecuencia del metabolismo específico de cada variedad de aceituna, la contribución porcentual de cada carotenoide en un fruto maduro es altamente dependiente de la variedad. La figura 2 muestra la contribución porcentual de los

principales carotenoides, tanto en un fruto inmaduro (verde), como en uno maduro (negro), para las variedades Arbequina y Hojiblanca (esta última como patrón representativo del resto de las variedades). Debido a las diferentes velocidades relativas de degradación, en una variedad como Hojiblanca, el perfil carotenoide de un fruto maduro se ve enriquecido en luteína (llegando a suponer más de 70% de la fracción carotenoide). Eso ocurre a costa de una menor representación del resto de los carotenoides (véase  $\beta$ -caroteno, violaxantina, neoxantina y anteraxantina), que reducen sus porcentajes en un fruto inmaduro con respecto a una aceituna madura.

En exclusividad, en los frutos de la variedad Arbequina (como consecuencia del proceso carotenogénico), la maduración no implica un incremento en el porcentaje de luteína sino que, al contrario, mantiene la misma importancia relativa que en un fruto verde (alrededor de 50%). A diferencia,  $\beta$ -caroteno y neoxantina se encuentran menos representados en el fruto negro, mientras que violaxantina y anteraxantina incrementan sus porcentajes relativos en el fruto maduro de Arbequina.

Estas diferencias en el metabolismo carotenoide de la variedad Arbequina con respecto a otras variedades se verán posteriormente traducidas en grandes diferencias en el contenido de carotenoides en los respectivos aceites, llegando a ser parámetros de autenticidad de aceites de oliva virgen monovarietales (Gandul-Rojas *et al.*, 2000).

## ACEITUNA DE MESA

### Introducción

La aceituna de mesa es, junto al aceite de oliva, uno de los alimentos más tradicionales de la dieta mediterránea. La utilización de los frutos del olivo como aceitunas de mesa se pierde en la antigüedad, correspondiendo la primera cita histórica a Columela, que data del siglo primero de nuestra era (Fernández Díez *et al.*, 1985). Favorecido por sus características nutricionales y su agradable paladar, el consumo de la aceituna de mesa se ha extendido alrededor del mundo, llegando a encontrarse entre los alimentos vegetales fermentados más importantes. Son altamente nutritivas y saludables, debido a sus equilibrados y saludables niveles de grasa. También proporcionan ácidos grasos esenciales, fibra, vitaminas y minerales, sin mencionar otros ingredientes con propiedades antioxidantes, como tocoferoles, polifenoles, carotenoides y clorofilas (López *et al.*, 2006).

Las aceitunas no pueden consumirse tal cual se recogen del árbol debido al amargor que les confiere la elevada concentración que tienen del glucósido llamado oleuropeina. Por ello, la aceituna debe comerse tras ser sometida a un proceso de elaboración que elimine, al menos parcialmente, dicho compuesto. Según la norma comercial actualmente en vigor aplicable a las aceitunas de mesa en el comercio internacional (IOC, 2004), se denominará “aceituna de mesa” al producto preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europaea* L.), elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el

amargor natural y conservado mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes; envasado con o sin líquido de gobierno.

Según el grado de madurez del fruto fresco, las aceitunas de mesa se clasifican como aceitunas verdes (frutos recogidos durante el ciclo de maduración, antes del envero, cuando han alcanzado su tamaño normal), aceitunas de color cambiante (frutos recogidos antes de su completa madurez, durante el envero) y aceitunas negras (frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella) (IOC, 2004). El color de las aceitunas verdes se debe a los pigmentos cloroplásticos, clorofilas y carotenoides (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández 1989), mientras que en la aceituna madura negra el color se debe mayoritariamente a las antocianinas (Vázquez-Roncero y Maestro-Durán, 1970), que se sintetizan durante la maduración del fruto.

Cada tipo de aceituna puede elaborarse de diferentes maneras. Las tres formas más importantes de preparaciones comerciales de aceitunas de mesa a escala mundial son las aceitunas verdes estilo español o sevillano, las negras oxidadas o estilo californiano y las negras naturales en salmuera o estilo griego. No obstante, existen otros tipos de aceitunas elaboradas como las deshidratadas o arrugadas, u otras muchas clasificadas como especialidades, y que suelen ser características de una zona o país. En esta sección sólo se tratarán las aceitunas verdes, en cuya coloración participan los pigmentos carotenoides.

## Modificaciones durante el procesado de aceitunas de mesa

Generalmente el color es uno de los atributos de calidad más importantes para la aceituna de mesa y puede ser considerado como un índice de calidad. Para elaborar aceitunas verdes de mesa, los frutos se recolectan cuando han alcanzado su máximo tamaño y su color varía entre el verde y verde amarillento. Como ya se ha mencionado antes, el color de las aceitunas verdes se debe a los pigmentos cloroplásticos, es decir, a las clorofilas *a* y *b*, y a los carotenoides luteína,  $\beta$ -caroteno, neoxantina, violaxantina y anteraxantina (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989), pigmentos que pueden ser transformados en ciertos derivados durante el procesado de los frutos (Mínguez-Mosquera, Garrido-Fernández y Gandul-Rojas, 1989). En algunos casos también se detecta  $\beta$ -criptoxantina, aunque en muy pequeñas cantidades (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2015).

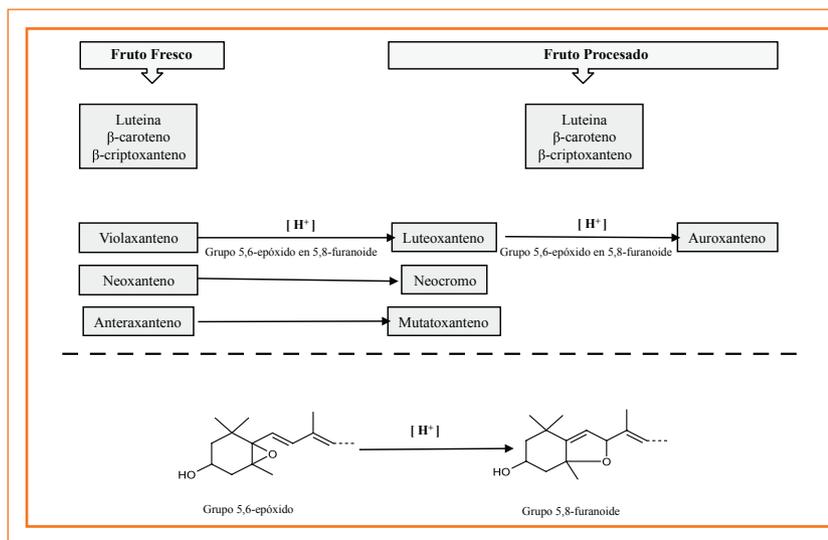
La principal forma de preparación comercial de aceitunas verdes de mesa, la llamada estilo español o sevillano, consiste en un tratamiento inicial de los frutos con una solución diluida de NaOH para favorecer la permeabilidad de la piel e hidrolizar el glucósido amargo, oleuropeína. Posteriormente, tras el tratamiento alcalino, las aceitunas se lavan con agua para eliminar el NaOH adherido a la piel y se ponen en solución de NaCl (salmuera), en la cual tiene lugar una fermentación láctica natural (Garrido-Fernández, Fernández-Díez y Adams, 1997; Rejano *et al.*, 2010). Durante la fermentación, los azúcares del fruto pasan a la salmuera y son metabolizados por microorganismos formando ácido láctico y otros ácidos orgánicos, que proporcionan un característico y distintivo sabor ácido al producto fermentado, alcanzándose al final del proceso valores de pH suficientemente bajos (alrededor de

4) que permiten la conservación del producto en condiciones seguras.

Puesto que los carotenoides de la aceituna son compuestos bastante estables a los álcalis (Schiedt y Liaaen-Lensen, 1995) el tratamiento inicial con NaOH, a que son sometidos los frutos cuando son procesados al estilo español o sevillano, no provoca cambios en dichos pigmentos (Mínguez-Mosquera, Garrido-Fernández y Gandul-Rojas, 1989, 1990). Sin embargo, el posterior descenso de pH que tiene lugar debido a la fermentación de la aceituna, sí afecta a los carotenoides cuyas estructuras son sensibles al medio ácido, es decir, aquellos con algún grupo 5,6-epóxido en su molécula, que en tales condiciones de pH se reorganiza a 5,8-furanoide. Así, violaxantina, con dos grupos 5,6 epóxidos, se transforma primero en luteoxantina, con un grupo 5,6-epóxido y otro 5,8 furanoide, y finalmente ambos pigmentos terminan transformándose en auroxantina, con dos grupos 5,8 furanoides. Por la misma razón, neoxantina y anteraxantina, ambos con un grupo 5,6-epóxido en su estructura, se degradan en sus correspondientes derivados 5,8-furanoides, neocromo y mutatoxantina, respectivamente (figura 3). De esta forma, durante el procesado de las aceitunas verdes de mesa al estilo español o sevillano, las concentraciones de violaxantina, neoxantina y anteraxantina van decreciendo y, en su lugar, aumentan las correspondientes a auroxantina, neocromo y mutatoxantina. Con respecto a las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y luteína, ambas permanecen constantes durante todo el proceso, así como el contenido total de carotenoides de los frutos, siendo indicativo de que no hay degradación oxidativa de estos compuestos a productos incoloros (Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1994). No obstante, la introducción de nuevas tecnologías en el proceso tradicional de elaboración de aceitunas verdes de mesa, como

son la reutilización de la solución alcalina y la disminución de los lavados de los frutos para reducir el volumen de las aguas de vertido (Garrido-Fernández, Fernández-Díez y Adams, 1997), puede propiciar ciertos cambios en los frutos, entre los que se incluye una lenta pero progresiva disminución en la concentración de todos los carotenoides presentes en los mismos (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995a).

Además de las aceitunas de mesa al estilo español o sevillano, se encuentran otras preparaciones comerciales de aceitunas verdes que son también muy apreciadas por los consumidores. Entre ellas se pueden distinguir las conocidas como aceitunas verdes naturales, que son aceitunas fermentadas directamente en salmuera sin ningún tratamiento alcalino previo. En este caso se producen las mismas transformaciones de los carotenoides que en las aceitunas de mesa de estilo español o sevillano



**FIGURA 3.** Transformación estructural y mecanismo de degradación de carotenoides en aceitunas de mesa durante el proceso de fermentación.

(figura 3), puesto que la principal diferencia entre ambas formas de preparación se refiere al tratamiento alcalino, que no afecta a los carotenoides de la aceituna (Ramírez *et al.*, 2015). Un tipo concreto de aceituna verde natural es la preparación con denominación de origen protegida “Aceituna Aloreña de Málaga”. Se trata de una especialidad de aceituna aliñada o sazónada, cuya elaboración incluye el partido inicial de los frutos, proceso que provoca cierta transformación de violaxantina en luteoxantina y auroxantina, y de anteraxantina en mutatoxantina (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2013). Tales transformaciones, que están catalizadas por un medio ácido, se han relacionado con la liberación de ácidos orgánicos durante el proceso de partido, ya que la pérdida de la integridad celular del fruto permite la salida generalizada de ácidos, pudiendo alcanzar un pH interno de 5.5 en el caso de las aceitunas. Posteriormente, a medida que los frutos permanecen en salmuera, se incrementa la transformación antes descrita de los carotenoides con grupo 5,6-epóxido, afectando ya también a neoxantina. Además, se produce cierta degradación de  $\beta$ -caroteno.

Existen otras especialidades de aceitunas verdes de mesa cuya elaboración incluye un tratamiento alcalino pero no la fase de fermentación láctica. Tales preparaciones tienen características y nombres específicos en los diferentes países productores, siendo las condiciones del tratamiento alcalino (tiempo y concentración de NaOH) y el número y particularidades de los lavados de los frutos, las principales diferencias entre las elaboraciones comerciales. En España son conocidas como aceitunas estilo Campo Real (De Lorenzo *et al.*, 2000); en Italia, estilo Castelvetro (Rejano *et al.*, 2010); en Francia estilo Picholine (Rejano *et al.*, 2010) y en Estados Unidos como aceitunas verdes maduras (*greenripe olives*) (USDA, 1983). El estilo Castelvetro ha sido utilizado como modelo para estudiar las modificaciones que experimentan los

pigmentos cloroplásticos en estas especialidades de aceitunas verdes de mesa ya que, en dicho sistema de procesado, las aceitunas son mantenidas más tiempo en condiciones alcalinas que en las otras elaboraciones y, *a priori*, esta situación podría provocar una degradación mayor de los cloroplastos del fruto (Gandul-Rojas y Gallardo-Guerrero, 2014). En el proceso de elaboración de aceitunas al estilo Castelvetro los frutos están sometidos durante 10-15 días a un pH altamente alcalino, de alrededor de 10-11 unidades, habiéndose constatado que, si bien la fracción de pigmentos clorofílicos de las aceitunas se afecta durante el mencionado proceso, no se observa cambio alguno en la fracción carotenoide.

## Mecanismo y cinética de degradación

El estudio cinético de la degradación de carotenoides durante el proceso de fermentación de la aceituna ha sido llevado a cabo por Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas (1994). Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, los únicos carotenoides que se transforman durante la elaboración de las aceitunas verdes fermentadas son aquellos cuyas estructuras moleculares son sensibles al medio ácido, encontrándose catalizada dicha degradación por el progresivo incremento de la acidez del medio de fermentación. La ecuación cinética que describe estos cambios es  $-dC/dt = k[H^+]^n[\text{pigmento}]^n$ , donde  $C$  es la concentración del carotenoide,  $t$  es tiempo y  $k$  es la constante de velocidad aparente. Aunque físicamente la reacción ocurre dentro del cloroplasto, el medio en el cual tiene lugar es el fermentador, puesto que es la difusión por ósmosis a través de las membranas la que conduce a la fermentación, alterándose así el pH intracelular por el pH de la salmuera.

Cuando las aceitunas son puestas inicialmente en salmuera, el pH de ésta es ligeramente alcalino. Considerando el cambio

en pH que tiene lugar en la salmuera durante la fermentación, podría parecer en principio que cuando el interior del fruto alcanza un pH de 8, la concentración del carotenoide en el fruto fuera mayor que la de los iones hidrógeno, en cuyo caso las cinéticas de transformación de los grupos 5,6-epóxidos en grupos 5,8-furanoides, si tuvieran lugar, podrían ser de segundo orden. Sin embargo, considerando el fermentador en su conjunto, la concentración de iones hidrógeno no se afecta en absoluto por esta reacción, la cual tiene lugar sin que este reactivo sea limitante. Como resultado, comparado con los carotenoides presentes en los frutos, la concentración de iones H<sup>+</sup> en el medio de fermentación está en exceso desde el comienzo del proceso, y puede así ser considerada como una constante. En este caso la cinética de reacción puede expresarse como  $-dC/dt = k [H^+]^n [\text{pigmento}]^n$ , donde  $k' = k[H^+]^n$ , lo cual ha sido llamado una reacción de pseudo-orden (González, 1991).

Con base en el porcentaje de retención de violaxantina y neoxantina durante el procesado de las aceitunas, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas (1994) llevan a cabo el estudio cinético de degradación de los carotenoides con grupos 5,6-epóxidos. Los resultados obtenidos por dichos autores concluyen que la degradación de los anteriores pigmentos, y que da lugar progresivamente a sus respectivos isómeros auroxantina y neocromo, sigue cinéticas de pseudo-primer orden ( $y = e^{-(kt+b)}$ ), siendo las constantes de velocidad del mismo orden para ambos carotenoides.

### Valor de provitamina A de la aceituna de mesa

El contenido en β-caroteno de las aceitunas de mesa las convierte en un producto con un valor añadido como fuente de provitamina A. En dieciséis muestras comerciales de aceitunas de estilo español o sevillano, Mínguez-Mosquera y Gandul-

Rojas (1994) encontraron valores de β-caroteno que variaban entre 141 y 245 μg/100 g de fruto deshuesado o porción comestible, valores que, según la relación 1 μg de β-caroteno equivale a 0.167 μg de retinol o vitamina A, corresponden a un contenido en provitamina A de entre 23.51 y 40.84 μg/100 g. No obstante, estos valores son sólo orientativos puesto que la eficiencia de la conversión de β-caroteno en retinol en los humanos es muy variable (Tang, 2010). Posteriormente, López, Montaña y Garrido (2005) llevaron a cabo un estudio sobre el contenido en β-caroteno en 67 muestras de aceitunas de mesa, teniendo en cuenta diferentes estilos de procesado, variedades y presentaciones comerciales. El estudio incluyó aceitunas verdes al estilo español o sevillano, aceitunas verdes o de color cambiante al natural (puestas directamente en salmuera) y aceitunas negras oxidadas al estilo californiano, distinguiendo presentaciones de aceitunas enteras, deshuesadas o rellenas con diferentes productos, entre otras. Por un lado, López, Montaña y Garrido (2005) encuentran diferencias en el contenido en β-caroteno de las aceitunas, según el estilo de procesado, que son más atribuibles al diferente grado de maduración de la materia prima que al propio efecto del proceso. En general, las mayores cantidades de β-caroteno se encuentran en las aceitunas verdes al estilo español (con un contenido medio de 305 μg/100 g de porción comestible), aunque sin diferencias significativas con respecto a las aceitunas negras oxidadas (228 μg/100g), mientras que los valores más bajos corresponden a las aceitunas puestas directamente en salmuera, con valores de β-caroteno inferiores a 200 μg/100g. No obstante, existen presentaciones comerciales de aceitunas en las que el valor de provitamina A se incrementa notoriamente gracias a la contribución de otros ingredientes que contienen β-caroteno. Tal es el caso de las aceitunas rellenas de pimiento natural, o aquellas otras preparaciones comerciales que están aliñadas con rodajas

de zanahoria o trozos de tiras de pimiento, y que constituyen una parte importante del producto (López-López, Montaña y Garrido-Fernández, 2010).

Un producto derivado de la aceituna de mesa que está ganando popularidad entre los consumidores como artículo gourmet es la llamada pasta o paté de aceitunas, que también incluye aceite de oliva virgen como otro de sus ingredientes principales. En un estudio de 42 muestras de pastas de aceitunas comerciales distintas, disponibles en el mercado griego, Anniva y Tsimidou (2009) encuentran que  $\beta$ -caroteno y luteína son los carotenoides mayoritarios que están presentes en las mismas. En aquellas muestras de pastas de aceitunas verdes contabilizan niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína que varían entre 0.8 y 5 mg/kg de producto y entre 0.7 y 1.2 mg/kg, respectivamente, mientras que en el resto de las muestras, todas ellas de pasta de aceitunas negras, se encuentran, en general, valores inferiores.

## ACEITE DE OLIVA

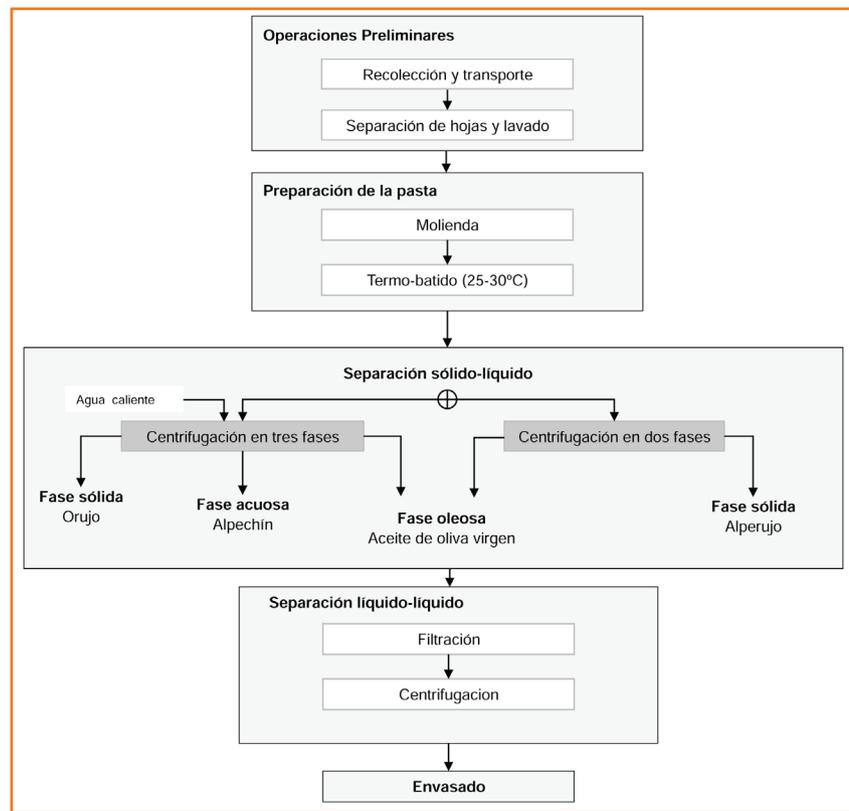
### Introducción

Cómo se ha comentado en la introducción, según datos del Consejo Oleícola Internacional (IOC 2014a), 90% del total de la producción anual de aceitunas se dedica a la obtención de aceite de oliva virgen (AOV). Es un excelente alimento natural, obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no produzcan la alteración del aceite. Las fases fundamentales del proceso de obtención son el molturado del fruto, el termobatido de la pasta de aceituna, y la separación de la

fase oleosa. Finalmente, el aceite así obtenido no tiene más tratamientos que lavado, decantación, centrifugación y filtrado.

En el interior de la célula, el aceite se encuentra distribuido entre la vacuola ( $\approx 76\%$ ) y el citoplasma ( $\approx 24\%$ ) y, a medida que el fruto madura, el tamaño de la vacuola se incrementa por acumulación gradual del aceite, llegando a ocupar hasta 90% del volumen celular. El aceite de la vacuola es fácilmente extraíble por medios físicos, mientras que el localizado en el citoplasma se encuentra disperso en un sistema coloidal de microgel, siendo más difícil de extraer. El objetivo del molturado es liberar las gotas de aceite contenidas tanto en la vacuola como en el citoplasma, mediante destrucción mecánica del tejido vegetal, y modificar su grado de dispersión integrándolas en una fase oleosa continua y fácilmente separable por medios físicos. Actualmente, se ha generalizado el uso para este fin del molino de martillos de acero inoxidable, que ha sustituido al tradicional molino de empiedro. En este proceso de rotura del tejido vegetal, las interacciones líquido-líquido generan una emulsión del aceite con el agua de vegetación y con el agua adicionada al proceso, quedando gran cantidad de este aceite disperso sin extraer que, por lo tanto, se pierde con los subproductos del proceso.

En la etapa del batido de la pasta, las pequeñas gotas de aceite se van uniendo y aumentando su tamaño hasta que forman una fase oleosa continua, en un fenómeno denominado coalescencia. Cuando alcanzan un diámetro mayor de 30 micras, y el peso adquirido les permite superar la fuerza que las une en el sistema coloidal, el aceite se puede extraer por centrifugación (Martínez, Gómez y Janer, 1957). La eficiencia de esta operación depende tanto de las características reológicas de la pasta de aceitunas como de las variables del batido: tiempo, temperatura y adición de coadyuvantes



**FIGURA 4.** Esquema del proceso de obtención del aceite de oliva: sistemas de dos y tres fases.

tecnológicos. En esta etapa se efectúa un ligero calentamiento de la pasta de aceitunas (25-30 °C) para facilitar la formación de una fase oleosa continua con la mínima pérdida de compuestos responsables del aroma.

Finalmente, en la tercera etapa, se separan las fases mediante centrifugación sólido-líquido, en el caso de los sistemas de extracción tradicional de tres fases, o centrifugación líquido-

líquido, en los sistemas de extracción de dos fases (figura 4). En el sistema de tres fases se obtienen como subproductos el orujo, que es la parte sólida formada por huesos, pieles y pulpa de aceituna, y el alpechín, que es una fase líquida constituida por el agua de vegetación y al agua adicionada al proceso. El sistema actualmente más extendido es el de centrifugación en dos fases, en el que la pasta de aceitunas batida se centrifuga directamente sin adición de agua, obteniendo como único subproducto una fase semisólida, denominada alperujo, mezcla de alpechín y orujo. Este residuo, con 75% de agua, es de más difícil gestión, siendo necesarias temperaturas del orden de 1200 °C para su deshidratación. Por el contrario, es un proceso de obtención de aceite que utiliza mucha menos agua que el de tres fases (Civantos, 2008).

Las aceitunas maduras contienen 15-30% de aceite de extraordinaria calidad que, cuando se extrae en las debidas condiciones, posee un aroma y sabor muy agradables y es prácticamente el único, entre los aceites vegetales, que puede consumirse crudo, conservando íntegras sus propiedades nutritivas y funcionales (Vázquez-Roncero, 1963). El deterioro del AOV se produce, casi exclusivamente, como consecuencia de una manipulación defectuosa de los frutos y/o de un proceso de elaboración mal conducido. Independientemente de la variedad de aceituna, sólo los frutos afectados por plagas o enfermedades, o que han caído al suelo antes de su recolección, producen un aceite inevitablemente alterado que debe ser sometido a procesos de refinación.

El aceite de oliva se comercializa de acuerdo con diferentes categorías, establecidas fundamentalmente en función de la valoración organoléptica y del grado de acidez libre, expresado como porcentaje de ácido oleico, aunque también se consideran otras características fijadas por la norma

**TABLA 2:** Parámetros de calidad establecidos por la UE para los aceites de oliva

Categoría	Acidez (%)	IP <sup>a</sup> (mEq O <sub>2</sub> /kg)	Evaluación organoléptica <sup>c</sup>				
			K <sub>232</sub>	K <sub>268</sub> o K <sub>270</sub> <sup>b</sup>	DK	Md	Mf
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0.8	≤ 20	≤ 2.50	≤ 0.22	≤ 0.01	0	> 0
Aceite de oliva virgen	≤ 2.0	≤ 20	≤ 2.60	≤ 0.25	≤ 0.01	≤ 3.5	> 0
Aceite de oliva lampante	> 2.0	-	-	-	-	> 3.5 <sup>d</sup>	-
Aceite de oliva refinado	≤ 0.3	≤ 5	-	≤ 1.10	≤ 0.16	-	-
Aceite de oliva <sup>e</sup>	≤ 1.0	≤ 15	-	≤ 0.90	≤ 0.15	-	-
Aceite de orujo de oliva crudo							
Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0.3	≤ 5	-	≤ 2.00	≤ 0.20	-	-
Aceite de orujo de oliva <sup>f</sup>	≤ 1.0	≤ 15	-	≤ 1.70	≤ 0.18	-	-

Nota: las categorías comerciales son: aceite de oliva virgen extra, de oliva virgen, de oliva y de orujo de oliva.

<sup>a</sup> IP, Índice de peróxido. <sup>b</sup> Valores de K<sub>270</sub> después de tratamiento con alúmina. <sup>c</sup> Mediana del defecto (Md) y mediana del aroma frutado (Mf). <sup>d</sup> Cuando Md es superior a 3.5 o cuando Md es ≤ 3.5 y la Mf es igual a 0. <sup>e</sup> Compuesto de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen. <sup>f</sup> Compuesto de aceite de orujo de oliva refinado y aceite de oliva virgen.

**Fuente:** Reglamento núm. 1348/2013 de la Unión Europea (UE, 2013).

comercial establecida por la Unión Europea y el COI (UE, 2013; IOC, 2013) (tabla 2). El aceite de oliva de categoría superior se denomina *aceite de oliva virgen extra*, cuya acidez libre debe ser como máximo de 0.8% (m/m). En la evaluación organoléptica la mediana del aroma frutado debe ser positiva (Mf > 0) y no debe tener defectos (Md = 0) (tabla 2). La siguiente categoría es *el aceite de oliva virgen*, en el que se admite una acidez libre de hasta 2.0% y una mediana de defectos máxima de 3.5. Cuando se superan estos límites por una elevada acidez libre, caracteres organolépticos desagradables u otros límites establecidos por la norma comercial, el aceite de oliva no se considera apto para su consumo directo en crudo. Este tipo de aceite se denomina *aceite de oliva virgen lampante* y se destina a las industrias de refinado de aceites vegetales o a usos técnicos. El *aceite de*

*oliva refinado* debe obtenerse mediante técnicas de refinado que no provoquen ninguna modificación de la estructura glicéridica inicial, su acidez libre ser como máximo de 0.3% y el resto de características de acuerdo con las fijadas para esta categoría en la norma comercial del COI o la Unión Europea. El producto comercial *aceite de oliva* es el aceite constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de aceite de oliva virgen apto para el consumo en la forma en que se obtiene. Su acidez libre es como máximo de 1%, no tiene evaluación organoléptica, y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la norma (UE, 2013, IOC, 2013).

Los componentes del aceite de oliva, como en todos los aceites vegetales, se pueden clasificar en fracción saponificable (triglicéridos, ácidos grasos libres, ceras, mono

y diglicéridos, ésteres de esteroides, alcoholes terpénicos y fosfolípidos) y fracción insaponificable (hidrocarburos, tocoferoles, esteroides, terpenos, alcoholes, pigmentos, polifenoles y compuestos volátiles) (tabla 3). El AOV, aunque está constituido principalmente de triglicéridos (98%), no se considera un medio homogéneo ya que trazas de agua y numerosos componentes menores son transferidos desde la pasta de aceituna original al aceite durante las diferentes etapas del proceso de extracción, siendo estos componentes los que constituyen la “huella digital” del aceite y juegan un importante papel en la estabilidad y en las características

**TABLA 3:** Composición del aceite de oliva.

Componentes	Contenido
Fracción saponificable (98.5%)	g/kg
Ácido grasos monoinsaturados	775
Ácidos grasos poliinsaturados	63
Ácidos grasos saturados	163
Fracción insaponificable (1.5%)	mg/kg
Terpenos	3000-7000
Hidrocarburos (principalmente escualeno)	1500-7000
Esteroides (principalmente $\beta$ -sitosterol)	800-2500
Fenoles	50-500
Tocoferoles (principalmente $\alpha$ -tocoferol)	30-150
Clorofilas	1-40
Carotenoides	2-20
Otros compuestos aromáticos (cetonas, ésteres, éteres)	250

**Fuente:** Elaboración propia con datos de Civantos (2008), Gandul-Rojas *et al.* (2000) y Mínguez-Mosquera, Garrido-Fernández y Gandul-Rojas (1990).

organolépticas de sabor, aroma y color (Aparicio y Harwood 2013).

La mayor parte de los ácidos grasos del aceite de oliva están presentes como triglicéridos. La proporción de ácidos grasos libres es pequeña y está directamente relacionada con el nivel de hidrólisis de los triglicéridos, normalmente asociada con los procesos de deterioro. Los triglicéridos mayoritarios son OOO (43.5%), POO (18.4%), OOL (6.8%), POL (5.9%) y EOO (5.1%) (O, oleico; P, palmítico; L, linoleico y E, esteárico). Las ceras son ésteres de ácidos grasos y alcoholes ácidos, siendo los principales ésteres de C36 y C38, mientras que en aceite de orujo de oliva y aceite de oliva refinado, la mayoría de los ésteres son de cadena larga (C40, C42, C44 y C46). El reglamento de calidad del aceite de oliva establece un máximo contenido de ceras de cadena larga de 150 mg/kg para el aceite de oliva virgen (no lampante) y 350 mg/kg para el aceite refinado (UE, 2013; IOC, 2013).

Los componentes menores del AOV son generalmente de carácter lipofílico, aunque algunos de ellos son de naturaleza anfifílica o polar. Los compuestos anfifílicos, como mono y diacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos libres y los pigmentos clorofílicos, tienen la capacidad de agregarse de forma espontánea, debido a interacciones hidrofóbicas, formando diferentes tipos de estructuras termodinámicamente estables conocidas como asociaciones coloidales, las cuales incluyen micelas, micelas reversas, bicapas y vesículas (Chaiyasit *et al.*, 2008). Las trazas de agua también pueden alterar las estructuras y características de estas asociaciones coloidales. Además, los compuestos polares, como proteínas, fenoles y también aldehídos, cetonas y epóxidos producidos durante las reacciones de oxidación lipídica, debido a su carácter hidrofílico, se localizan preferentemente en el interior

de estas estructuras coloidales formadas en presencia de compuestos anfífilos endógenos y agua.

## Modificaciones y grado de transferencia del fruto al aceite

La composición en pigmentos del aceite de oliva virgen está mediatizada tanto por factores que afectan al fruto, como son la variedad de aceituna (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996, Gandul-Rojas *et al.*, 1999, Psomiadou y Tsimidou, 2001, Roca y Mínguez, 2001a, Criado *et al.*, 2007, Giuffrida *et al.*, 2007, Aparicio-Ruiz, Gandul-Rojas y Roca, 2009), su estado de madurez (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990; Gallardo-Guerrero, Roca y Mínguez-Mosquera, 2002; Roca y Mínguez-Mosquera, 2003) o las prácticas de cultivo, como el riego (Criado, Romero y Motilva, 2007), como por las condiciones empleadas en el proceso industrial de extracción del aceite (Gandul Rojas *et al.*, 2000; Psomiadou y Tsimidou, 2001; Morelló *et al.*, 2003; Ranalli *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2003; Criado, Romero y Motilva, 2007).

En lo que a pigmentos se refiere, la etapa fundamental del proceso de obtención del aceite es el termobatido de la pasta de aceitunas, en la que estos compuestos se van transfiriendo al aceite, desde el tejido vegetal molturado. Para obtener el aceite se utiliza el fruto maduro, de mayor contenido graso y coloración morada-negra. Los compuestos clorofílicos y carotenoides, dada su naturaleza liposoluble, son los únicos pigmentos que se van transfiriendo desde las membranas tilacoidales a la fase oleosa, aportando su característico color verde-amarillento al aceite, mientras que las antocianinas, responsables de la coloración del fruto en el estado maduro, se retienen en la fase acuosa (alperujo) dada su naturaleza hidrosoluble. Durante esta etapa, los pigmentos carotenoides,

al tiempo que se van transfiriendo a la fase oleosa, experimentan una serie de transformaciones estructurales que son inherentes al propio proceso de extracción del aceite, y que están mediatizadas por la liberación de ácidos al medio, la oxigenación y la mayor accesibilidad de sustratos y enzimas, incluidos los de la semilla, ya que el fruto se moltura con el hueso. Entre las reacciones más generalizadas destaca la formación de isómeros 5,8-furanoides, aunque también es frecuente la formación de isómeros *Z/E* (*cis-trans*) y la degradación a productos incoloros (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990, Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996, 1996a; Gandul-Rojas *et al.*, 2000). El perfil de pigmentos carotenoides que es inherente al AOV está formado por luteína,  $\beta$ -caroteno, y las xantofilas minoritarias violaxantina, neoxantina, anteraxantina y  $\beta$ -criptoxantina, todos ellos procedentes del fruto fresco, junto con las xantofilas 5,8-furanoides (luteoxantina, auroxantina, neocromo y mutatoxantina) que se forman en el proceso de extracción del aceite (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990, Mínguez-Mosquera, Gandul-Rojas y Gallardo-Guerrero, 1992; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera 1996).

Otro factor de gran importancia en cuanto a la presencia y perfil de pigmentos carotenoides en el AOV es la variedad oleícola y el estado de madurez de los frutos. El perfil de pigmentos es básicamente el mismo en todos los aceites de oliva monovarietales, excepto en los de aquellas variedades, como Arbequina y Blanqueta, que además presentan otros pigmentos en exclusividad, como  $\alpha$ -caroteno o xantofilas esterificadas (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996). Entre las variedades de aceitunas de origen español destacan Hojiblanca y Picual, con un alto contenido en carotenoides, frente a otras, como Arbequina, Blanqueta y Cornicabra de baja y media pigmentación. Esto permite diferenciar a los respectivos aceites

por el contenido total de pigmentos (Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Asimismo, para una misma variedad, la concentración de pigmentos disminuye a medida que los frutos están más maduros, siendo la velocidad de degradación de carotenoides durante la maduración inferior a la de clorofilas. Esto repercute directamente en la relación que mantienen entre sí ambas fracciones de pigmentos, que desciende con el progreso de la maduración de los frutos y, por lo tanto en el color del aceite obtenido, que puede variar a lo largo de la campaña de producción desde el verde intenso al amarillo claro (Roca y Mínguez-Mosquera 2001, 2001b, 2003).

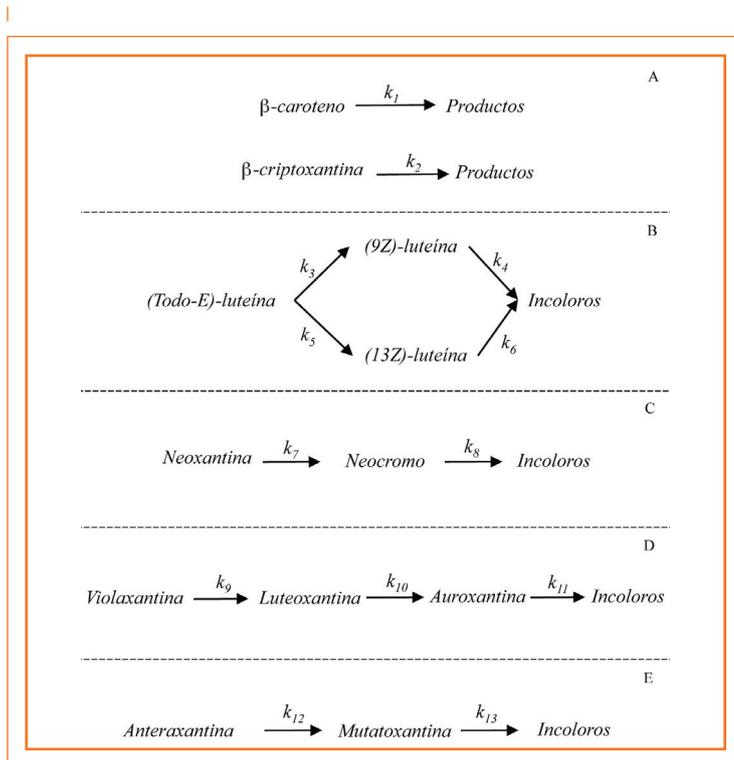
Desde el punto de vista cuantitativo, la principal modificación que ocurre durante la extracción del aceite es una disminución considerable de esta relación clorofilas/carotenoides al pasar del fruto al aceite. Un balance de materia del proceso revela que, a pesar del carácter lipofílico de estos pigmentos, su transferencia al aceite durante el proceso de extracción es sólo parcial; hay un porcentaje que queda retenido en el alperujo y otro porcentaje que se oxida a productos incoloros. Un mayor porcentaje de transferencia de los carotenoides que de los pigmentos clorofílicos es lo que nos explica que la relación entre ambas fracciones de pigmentos disminuya al pasar del fruto al aceite. Las diferencias estriban principalmente en una menor retención de carotenoides en el alperujo, que se valora en torno a 25%, mientras que la de clorofilas puede alcanzar hasta 60%. El porcentaje de oxidación a productos incoloros se ha estimado del mismo orden para ambas fracciones de pigmentos, entre 20-25% (Mínguez-Mosquera, Garrido-Fernández y Gandul-Rojas, 1990; Gallardo-Guerrero, Roca y Mínguez-Mosquera, 2002). No obstante, de forma individualizada, el porcentaje de transferencia no es el mismo para todos los carotenoides. Específicamente, se estima un mayor grado de retención en el alperujo para  $\beta$ -caroteno que

para luteína, consecuencia de un mayor grado de decoloración de luteína en el proceso de extracción, probablemente mediatizado por su posible mayor capacidad antioxidante (Gallardo-Guerrero, Roca y Mínguez-Mosquera, 2002; Woodall *et al.*, 1997).

Esta distribución de pigmentos entre las distintas fases del proceso de extracción del aceite, así como el grado de decoloración, puede estar sujeta a cierto margen de variación en función de las variantes introducidas en las distintas etapas del proceso. Técnicas que permiten el procesado de frutos poco maduros mediante el uso de tratamientos térmicos con aire caliente (García *et al.*, 2001), o en baño de agua (García *et al.*, 2005, Luaces *et al.*, 2005; Yousfi *et al.*, 2010), consiguen adelantar la campaña de producción, modulan la intensidad del amargor del AOV y, aunque disminuyen en cierto grado su estabilidad, también permiten obtener aceites más pigmentados. El deshuesado del fruto proporciona aceites con óptimas características cualitativas, aumentando el contenido en compuestos volátiles y fenoles (Servili *et al.*, 2007), sin embargo tiene un efecto negativo sobre la transferencia de clorofilas y carotenoides, obteniéndose aceites menos coloreados (Ranalli *et al.*, 2007; 2009).

En lo que se refiere a la etapa de termobatido se ha visto que, en general, a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de operación, en el rango comprendido entre 20 y 30°C, aumenta la concentración de los pigmentos en el aceite, debido a que se favorece la liberación de estos compuestos desde el tejido vegetal. Sin embargo, a temperaturas superiores a 30°C, ya no se observan estos incrementos, probablemente motivado por la destrucción térmica que pueden experimentar los pigmentos (Ranalli *et al.*, 2001, 2003, 2005, Stefanoudaki, Koutsaftakis y Harwood, 2011).

El uso de coadyuvantes de extracción que mejoran en general el rendimiento en aceite, como enzimas de plantas con actividades pectolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas (Ranalli *et al.*, 2005), talco micronizado (Criado *et al.*, 2007), o sal común (NaCl) (Cruz *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008), también proporcionan aceites más ricos en pigmentos. Sin embargo el único aditivo autorizado en la extracción del AOV por el gobierno español, y no afectado por las restricciones del reglamento de la Unión Europea, es el talco micronizado (Cert *et al.*, 1996; UE, 2013).



**FIGURA 5.** Mecanismo cinético para las reacciones de degradación térmica de los carotenoides del aceite de oliva.

## Mecanismo y cinética de degradación térmica

Los modelos cinéticos están ganando en interés para estudiar cambios en la composición química de los alimentos y predecir el tiempo de vida útil de los mismos. En este sentido, la formulación de las reacciones químicas de degradación de los carotenoides puede tener inmediata aplicación en el diseño de modelos cinéticos que permitan predecir estos cambios. Los datos experimentales resultan, por lo tanto, necesarios para estimar los parámetros del modelo matemático y es, con la ayuda de algoritmos estadísticos, como se puede determinar qué parámetros son los relevantes en la predicción.

En el AOV, los parámetros cinéticos y termodinámicos para la oxidación de los principales pigmentos carotenoides se han caracterizado mediante estudios de termodegradación, a diferentes temperaturas y en ausencia de luz y oxígeno. Un mecanismo cinético de reacciones irreversibles y orden uno resultó apropiado para describir la degradación térmica de luteína,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2011), así como de las xantofilas epoxidadas neoxantina, violaxantina y mutatoxantina (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2012).

Se ha estudiado un modelo cinético complejo de reacciones paralelas y consecutivas para la degradación de (todo-E)-luteína (figura 5B). Las primeras reacciones generan un cambio en la configuración estructural por isomerización, siendo predominante en estas condiciones la formación de (13Z)-luteína frente a (9Z)-luteína. Las segundas reacciones generan productos incoloros por rotura de la cadena polienoica. La degradación de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina se estudió como modificación global a productos incoloros (figura 5A), siendo la

estabilidad térmica de ambos inferior a la de luteína (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2011).

Los mecanismos de degradación de las xantofilas epoxidadas neoxantina, violaxantina y mutatoxantina (figura 5 C, D y E), transcurren mediante reacciones consecutivas que implican la reorganización de los grupos 5,6-epóxidos a 5,8-furanoides, y su posterior degradación a productos incoloros por ruptura de la cadena polienoica (Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2012). La estabilidad térmica se ve significativamente afectada por los cambios en la estructura química, siendo la mayor estabilidad para neoxantina. Se ha encontrado un efecto de compensación cinética para una serie de reacciones similares, esto es la degradación de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína y xantofilas 5,8-furanoides en productos incoloros.

Un estudio isocinético permitió comparar los parámetros cinéticos y termodinámicos determinados en tres matrices de aceite de oliva virgen obtenidos de frutos de olivo en distintos grados de madurez y con diferente contenido en pigmentos (alto, medio y bajo), demostrándose que el medio oleoso no afecta significativamente los mecanismos de reacción. En consecuencia, los parámetros cinéticos obtenidos, como funciones de la temperatura según un modelo de Arrhenius, pueden usarse para desarrollar modelos matemáticos de predicción para la formación de isómeros *Z* de luteína, xantofilas 5,8-furanoides, así como la degradación global de carotenoides a productos incoloros (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2011; Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2012; Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2014).

Un marcado efecto de la temperatura se ha puesto de manifiesto en todas las reacciones de termodegradación de pigmentos en AOV y, al contrario de lo que podría pensarse,

las constantes cinéticas para la degradación de la fracción carotenoide fueron alrededor de 3.6 veces más altas que las correspondientes a la fracción de clorofilas, que mostraron una estructura más estable a la decoloración. Asimismo, una energía de activación superior en clorofilas indica que para incrementar sus constantes cinéticas es necesario un incremento menor de temperatura que para la fracción carotenoide (Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2014).

## El perfil carotenoide como índice de frescura y autenticidad

El color del aceite de oliva virgen se debe exclusivamente a la solubilización en el aceite de los pigmentos cloroplásticos presentes en el fruto fresco, junto con aquellos otros que resultan de las transformaciones que éstos pueden experimentar durante el proceso de extracción del AOV. Se han descrito una serie de cambios cualitativos en el perfil de pigmentos carotenoides, es decir transformaciones estructurales a productos coloreados, asociadas al proceso de extracción del aceite. Se trata de modificaciones en el perfil de pigmentos que van a dejar una huella específica en el producto. Además del perfil básico de pigmentos que es común a todos los AOV, la presencia de pigmentos exclusivos como  $\alpha$ -caroteno o xantofilas esterificadas puede usarse como marcador del origen varietal del aceite (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera 1996, Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Por otro lado, se han propuesto tres relaciones (Gandul-Rojas *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2003) para determinar si es genuino y el correcto procesado de los AOV españoles:

- Relación clorofilas/carotenoides entre 0.5 y 1.4.
- Relación xantofilas menores/luteína entre 0.2 y 1.2.
- Relación luteína/ $\beta$ -caroteno mayor de 1.

En el producto comercial aceite de oliva (mezcla de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva refinado), en función de la proporción de aceite virgen que se utilice, se obtienen mezclas con características sensoriales más o menos intensas. Así, podemos encontrar en el mercado las denominaciones sabor intenso y sabor suave, que deberían hacer referencia al porcentaje de aceite de oliva virgen utilizado en la mezcla, aunque este concepto no está aún reglamentado. El color del AOV puede variar desde el verde oscuro al amarillo pálido, dependiendo de la composición en pigmentos del fruto empleado como materia prima. Como se ha descrito antes, este contenido está sujeto a una amplia variabilidad; para clorofilas entre 1-40 mg/kg, y para carotenoides entre 2-20 mg/kg, en función de la variedad de aceituna (de alta o baja pigmentación) y del estado de madurez (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990, Gandul-Rojas *et al.*, 2000). Por tanto, aunque pueda ser orientativo, el color del aceite envasado no se puede identificar exactamente con la cantidad de aceite virgen presente en la mezcla.

En general, el consumidor identifica el aceite más coloreado con AOV, mientras que aceites de oliva poco pigmentados recuerdan más a los aceites de semilla refinados, a lo que hay que añadir las preferencias específicas de cada mercado. Como resultado, algunos productores refuerzan la coloración de sus aceites de oliva con aditivos colorantes verdes o amarillos, aunque se trate de una práctica fraudulenta de acuerdo con las normativas (UE, 2013; IOC, 2013).

Existen métodos que determinan un índice de Color Global del Aceite de Oliva (ICG), mediante la medida de la absorbancia a las longitudes de onda de máxima absorción del aceite con respecto al aire. Estos métodos, efectivamente, permiten obtener una medida de color global del aceite, pero en ningún caso pueden ser válidos para discriminar científicamente su

sabor, la cantidad de aceite virgen presente en la mezcla, ni tampoco pueden sustituir el análisis individualizado de pigmentos como método de detección de la adulteración del color. En este caso, la detección de pigmentos ajenos al perfil común que es definido para el AOV en general, o la alteración de las relaciones cuantitativas antes mencionadas para ciertos pigmentos, indica la adulteración del color del aceite de oliva comercializado (Roca *et al.*, 2010).

Además de los colorantes verdes naturales de carácter lipofílico relacionados estructuralmente con los pigmentos clorofílicos (E-140i y E-141i), en la amplia lista de colorantes alimentarios amarillos, los de uso más probable, por su similitud estructural con los carotenoides del AOV serían: E-160a (carotenos) y E161b (luteína). Se han detectado casos de aceites de oliva comercializados en los que no se detectan las xantofilas minoritarias, y se encuentra  $\beta$ -caroteno o luteína en exclusividad (o en un porcentaje superior a 90%). Este perfil cuantitativo de carotenoides no está dentro de los márgenes definidos para el AOV e indica adulteración por adición del colorante E-160a o E-161b, respectivamente.

En otros casos, la luteína se detecta en forma esterificada (menos polar). Este carotenoide tiene en su estructura dos grupos hidroxilos susceptibles de esterificación con ácidos grasos, pero dicho proceso no ocurre en el fruto de olivo, a pesar de su alto contenido en ácidos grasos, ya que tiene un metabolismo típico de fruto no-carotenogénico, y las xantofilas como luteína permanecen sin esterificar. Su presencia en el AOV indica adición del colorante E-161b.

Este perfil cualitativo de pigmentos genuinos del AOV es afectado por el pequeño grado de degradación del aceite que ocurre durante su almacenamiento, incluso bajo condiciones

apropiadas de oscuridad y temperatura controlada (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005, Aparicio-Ruiz, 2008). En general ocurre un avance de todas aquellas reacciones de degradación que comenzaron durante el proceso de extracción del aceite y que en la fracción de pigmentos carotenoides afectaban a la isomerización geométrica (isomerizaciones *Z/E*), la transformación de xantofilas 5,6-epoxidos en derivados 5,8-furanoídeos y la degradación a productos incoloros. En todas estas reacciones se observa un marcado efecto de la temperatura de almacenamiento en la velocidad de la reacción y algunas relaciones, como el porcentaje de isómeros *Z* de luteína o el porcentaje de neocromo, pueden ser sugeridos como marcadores químicos para monitorizar la degradación del AOV, esto es “índices de frescura”.

La presencia de ciertos isómeros geométricos de carotenoides en alimentos suele estar relacionada con el procesado térmico. Condiciones de reacción similares a

aquellas utilizadas en la desodorización suave de aceites de oliva (aceite deodorato), que eliminan ligeros defectos sensoriales que no permiten su comercialización como aceite virgen, son suficientes para incrementar significativamente el porcentaje de isómeros *Z* de luteína (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2011) o del isómero 5,8-furanoídeo de la neoxantina (neocromo) (Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2012). Ello lleva a proponer estos criterios como marcadores del tratamiento térmico en AOV, en adición al marcador establecido en la fracción de pigmentos clorofílicos (porcentaje de pirofeofitina *a*) (Aparicio-Ruiz, Roca y Gandul-Rojas, 2012). Estos resultados han llevado a los investigadores a estudiar el comportamiento cinético de la isomerización de pigmentos carotenoides en aceite de oliva para establecer modelos matemáticos de predicción de su evolución en el tiempo como una función de la temperatura (Aparicio-Ruiz, Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 2011; Aparicio-Ruiz y Gandul-Rojas, 2012).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT-EU, Gobierno español y europeo, AGL2015-63890-R) y por la Junta de Andalucía (AGR 6271-2011).

## REFERENCIAS

- Anniva, C. y Tsimidou, M.Z. 2009. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 328-336.
- Aparicio, R. y Harwood J.L. (eds.). 2013. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*. Nueva York: Springer Science.
- Aparicio-Ruiz, R. 2008. "Caracterización de las reacciones de termo-degradación de pigmentos clorofílicos y carotenoides en aceite de oliva virgen". Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Aparicio-Ruiz, R., Gandul-Rojas, B. y Roca, M. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10831-10836.
- Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 811-820.
- Aparicio-Ruiz, R. y Gandul-Rojas, B. 2012. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60: 5180-5195.
- Aparicio-Ruiz, R., Roca, M. y Gandul-Rojas, B. 2012. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60: 7040-7049.
- Aparicio-Ruiz, R. y Gandul-Rojas B. 2014. *Food Research International* 65: 199-206.
- Bramley, P.M. 2002. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2107-2113.
- Catalano, M. y Sciencalepore, V. 1965. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 50: 114-116.
- Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W. y Pérez-Camino, M.C. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(12): 3930-3934.
- Chaiyasit, W., McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E.A. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(2): 550-556.
- Civantos L. 2008. *Obtención del aceite de olive virgen*. Madrid: Editorial Agrícola Española.
- Criado, M.N., Motilva, M.J., Ramo, T., Romero, M.P. 2006. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 593-600.
- Criado, M.N., Motilva, M.J., Goñi, M., Romero, M.P. 2007. *Food Chemistry* 100: 748-755.
- Criado, M.N., Romero, M.P. y Motilva, M.J. 2007. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55: 5681-5688.
- Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A.G., Mariscal, C., Garcia, J.M. 2007. *European Food Research and Technology* 225: 359-365.
- Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M., Bass, R. 2006. *BMC Plant Biology* 6(6): 32-52.
- De Lorenzo, C., González, M., Iglesias, G., Lázaro, E., Valiente, E., Blázquez, N., Vergara, G. 2000. *La aceituna de Campo Real*. Madrid: Consejería de Medio Ambiente.

## REFERENCIAS

- Fernández-Díez, M.J., De Castro Ramos, R., Garrido-Fernández, A., González-Pellisó, F., Nosti-Vega, M., Heredia-Moreno, A., Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Durán-Quintana, M.C., Sánchez-Roldán, F., García-García, P., De Castro y Gómez-Millán, A. 1985. *Biotecnología de la aceituna de mesa*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. 2002. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 105-109.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., y Mínguez-Mosquera, M.I. 2005. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82: 33-39.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Moreno-Baquero, J. M., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3737-3747.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. 1996. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 31-39.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. 1996a. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 291-294.
- Gandul-Rojas, B., Roca-L. Cepero, M., Mínguez-Mosquera, M.I. 1999. *Journal of Agricultural Food Chemists' Society* 47: 2207-2212.
- Gandul-Rojas, B., Roca-L., Cepero, M., Mínguez-Mosquera, M.I. 2000. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 853-858.
- Gandul-Rojas, B. y Gallardo-Guerrero, L. 2014. *Food Research International* 65: 224-230.
- García, J.M., Yousfi, K., Mateos, R., Olmo, M., Cert, A. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4231-4235.
- García, J.M., Yousfi, K., Oliva, J.S., García-Díaz, M.T., Pérez-Camino, M.C. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8248-8252.
- García, J.M. y Yousfi, K. 2006. *Grasas y Aceites* 57: 16-24.
- Garrido-Fernández, A., Fernández-Díez, M.J. y Adams, M.R. 1997. *Table Olives: Production and Processing*. Londres: Chapman and Hall.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pera, L., Dugo G. 2007. *Food Chemistry* 101: 833-837.
- González Ureña, A. 1991. *Cinética y dinámica molecular química*. Madrid: Eudema/Ediciones de la Universidad Complutense.
- Goodwin, T.W. (ed.). 1976. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Londres: Academic Press.
- Gross, J. 1987. En Schweigert, B.S. (ed.). *Pigment in Fruits*. Londres: Academic Press.

## REFERENCIAS

- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A., Albi, A. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 121-127.
- Hermoso, M., Uceda, M., Frías, L., Beltran, G. 1997. "Maduración". En *El cultivo del olivo*. Madrid: Junta de Andalucía/Ediciones Mundi-Prensa.
- Humanes, J. 1992. *Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo*. Sevilla: Junta de Andalucía-Consejería de Agricultura y Pesca.
- IOC, International Olive Council. 2004. Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa. COI/OT/NC Núm. 1. Madrid. Disponible en: [www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3627-normotes](http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3627-normotes) [consulta: diciembre de 2014].
- IOC, International Olive Council. 2013. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC núm. 3/Rev.7. Madrid. Disponible en: [www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3617-normaesp](http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3617-normaesp) [consulta: diciembre de 2014].
- IOC, International Olive Council. 2013a. *World Catalogue of Olive Varieties*.
- IOC, International Olive Council. 2014. World Table Olive Figures. Disponible en: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures> [consulta: diciembre de 2014].
- IOC, International Olive Council. 2014a. World Olive Oil Figures. Disponible en: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> [consulta: diciembre de 2014].
- López, A., Montaña, A. y Garrido, A. 2005. *European Food Research Technology* 221: 406-411.
- López-López, A., García-García, A., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A. 2006. Características nutricionales del aceite de oliva y las aceitunas de mesa: Vol 2. *Enciclopedia del olivo*. Madrid: Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario.
- López-López, A., Montaña, A. y Garrido-Fernández, A. 2010. "Nutrient profiles of comercial table olives: proteins and vitamins". En V.R. Preedy y R.R. Watson (eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Oxford: Academic Press, 705-714.
- Luaces, P., Pérez, A.G., García, J.M., Sanz, C. 2005. *Food Chemistry* 90: 169-174.
- Martínez, J.M., Gómez, C. y Janer, C. 1957. *Grasas y Aceites* 8: 112:120.
- Maxie, E.C., Catlin, P.B. y Hartman, H.T. 1960. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 75: 275-291.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. 1989. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 37: 1-7.

## REFERENCIAS

- Mínguez-Mosquera, M.I., Garrido-Fernández, J. y Gandul-Rojas, B. 1989. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 8-11.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L. 1990. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67: 192-196.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Garrido-Fernández, J. y Gandul-Rojas, B. 1990. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1662-1666.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. y Gallardo-Guerrero, M.L. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 60-63.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Gandul-Rojas, B. 1994. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1551-1554.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Gallardo-Guerrero, L. 1995. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 1-6.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Gallardo-Guerrero, L. 1995a. *Journal of Food Protection* 58: 1241-1248.
- Morelló, J.R., Motilva, M.J., Ramo, T., Romero, M.P. 2003. *Food Chemistry* 81: 547-553.
- Pérez, A.G., Romero, C., Yousfi, K., García, J.M. 2008. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 685-691.
- Price, C. A., Hadjeb, N., Newman, L.A., Reardon, E.M. 1995. *Methods in Cell Biology* 50: 189-207.
- Psomiadou, E. y Tsimidou, M. 2001. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 640-647.
- Ramírez, E., Gandul-Rojas, B., Romero, C., Brenes, M., Gallardo-Guerrero, L. 2015. *Food Chemistry* 166: 115-124.
- Ranalli, A., Benzi, M., Gomes, T., Delcuratolo, D., Marchegiani, D., Lucera, L. 2007. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 437-442.
- Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., Simone, N. 2001. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103: 228-238.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., Sotiriou, E. 2005. *Food Research International* 38: 873-878.
- Ranalli, A., Marchegiani, D., Pardi, D., Contento, S., Girardi, F., Kotti, F. 2009. *Food Bioprocess Technology* 2: 322-327.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., Lucera, L. 2003. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 57-67.
- Rapoport, H.F. 1997. "Botánica y morfología". En *El cultivo del olivo*. Sevilla: Junta de Andalucía/Ediciones Mundi-Prensa.

## REFERENCIAS

- Rejano, L., Montaña, A., Casado, F.J., Sánchez, A.H., De Castro A. 2010. "Table Olives: Varieties and Variations". En V.R. Preedy y R.R. Watson (eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Oxford: Academic Press, 5-15.
- Roca, M. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2001. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 133-138.
- Roca, M. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2001a. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 4414-4419.
- Roca, M. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2001b. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 832-839.
- Roca, M., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Mínguez-Mosquera, M.I. 2003. *Journal of the American Oil Chemistry Society* 80: 1237-1240.
- Roca, M., y Mínguez-Mosquera M. I. 2003. *Journal of Plant Physiology* 160: 451-459.
- Roca, M. Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2007. *Postharvest Biology and Technology* 44: 150-156.
- Roca, M., Gallardo-Guerrero, L., Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas B. 2010. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 58: 51-56.
- Roca, M., León, L., y De la Rosa, R. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2049-2055.
- Rodríguez-Urbe, L., Guzman, I., Rajapakse, W., Richins, R.D., O'Connell, M.A. 2011. *Journal of Experimental Botany* 63: 517-526.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Fregapane, G. 2003. *Food Chemistry* 80: 359-366.
- Sánchez, J. 1994. *Progress in Lipid Research* 33: 97-104.
- Schiedt, H. y Liaaen-Jensen, S. 1995. "Isolation and analysis". En Britton, G. 1995b. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Volume 1B: Isolation and Analysis*, pp. 81-108. Basilea: Birkhäuser.
- Schindler, C. y Lichtenthaler, H.K. 1996. *Journal of Plant Physiology* 148: 399-412.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7028-7035.
- Stefanoudaki, E., Koutsaftakis A., y Harwood, J.L. 2011. *Food Chemistry* 127: 1481-1486.
- Tang, W. 2010. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1468S-1473S.
- UE. 2013. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento de ejecución (UE) núm. 1348/2013, L338, 16 de diciembre de 2013.
- USDA, United States Department of Agriculture. 1983. United States Standards for Grades of Canned Ripe

## REFERENCIAS

- Olives. Washington, D.C. Disponible en: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELD EV3010754>> [consulta: diciembre de 2014].
- Vázquez Roncero A. 1963. *Grasas y Aceites* 14: 262-270.
  - Vázquez-Roncero, A. y Maestro-Durán, R. 1970. *Grasas y Aceites* 21: 208-214.
  - Vázquez, R.A., Maestro, D.R. y Graciani, C.E. 1971. *Grasas y Aceites* 22: 336-370.
  - Vioque, A. y Albi, M.A. 1975. *Grasas y Aceites* 16: 73-78.
  - Woodall, A.A., Lee, S.W., Weesie, R.J., Jackson, M.J. Britton, G. 1997. *Biochimie et Biophysica Acta* 1336: 33-42.
  - Yousfi, K., Cayuela, J.A. y García, J.M. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10085–10091.
  - Yousfi, K., Moyano, M.J., Martínez, F., Cayuela, J.A., García, J.M. 2010. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87: 1053-1061.

# CAROTENOIDES EN CEREALES

Elena Mellado-Ortega y Dámaso Hornero-Méndez



## INTRODUCCIÓN

Los cereales son alimentos de origen vegetal, básicos en la dieta, que se caracterizan por ser mayoritariamente fuentes de hidratos de carbono y proteínas, presentando un contenido en carotenoides relativamente bajo comparado con la mayoría de frutos y el resto de los vegetales. Sin embargo, el consumo diario de cereales y productos derivados por la mayoría de la poblaciones, especialmente las más desfavorecidas, los convierte en una fuente no despreciable de estos compuestos (Graham y Rosser, 2000) y en alimentos ideales para ser utilizados en estrategias de biofortificación (Bai *et al.*, 2011).

En el proceso de biofortificación de los cultivos en carotenoides, un paso imprescindible es la caracterización exhaustiva del perfil carotenóide existente en el vegetal. Este conocimiento facilita la exploración del metabolismo de los mismos, ya que este aspecto es el que se persigue. El éxito de tales procesos radica en la existencia de una

variabilidad más o menos amplia, entre los distintos cereales, para dicho contenido carotenoide. Esta variabilidad no es más que el reflejo de tres factores: a) genotipo del cereal, b) la selección de variedades, la presión ejercida por el hombre y la domesticación, y c) las condiciones de crecimiento, y el posterior almacenamiento y procesado (doméstico o industrial). En relación a estos últimos, la evaluación de dichos cambios es un área habitual de estudio de la tecnología de alimentos, lo cual permite estimar las condiciones óptimas para la preservación de estos compuestos, impulsado tanto por sus propiedades nutricionales como por las aplicaciones derivadas de su naturaleza como responsables del color de los alimentos. Los tratamientos térmicos y los que conllevan una homogenización de la matriz alimentaria, así como la composición de ésta, son factores que ejercen un efecto potenciador de la bioaccesibilidad de los carotenoides, ya que se facilita la solubilización de éstos. En este contexto, alimentos como los cereales, que habitualmente se consumen procesados, podrían presentar ventajas frente a los alimentos no procesados.

Hasta la fecha, existen numerosos datos sobre composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides en frutos y vegetales, pero muy pocos con respecto a los cereales, por lo que es necesario realizar estudios que permitan la caracterización de dicho perfil carotenoide en este tipo de alimentos. Las investigaciones dirigidas a mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides en cereales se beneficiarán, sin duda, del conocimiento así generado, que facilita la orientación y recomendaciones al consumidor sobre la adecuación de los hábitos de procesado y consumo de los alimentos básicos.

En el presente capítulo revisamos la información existente acerca de la composición y distribución de carotenoides

presentes en cereales, abordando factores que alteran este perfil, como el almacenamiento y procesado del alimento, así como las características y avances en el análisis de estos compuestos. Por otra parte, las estrategias para potenciar el contenido de carotenoides en cereales, ya sea mediante mejora clásica o manipulación genética, son también discutidas.

## COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOIDES EN CEREALES

Los cereales y sus derivados son buenos ejemplos de alimentos que contienen una mezcla compleja de compuestos de interés nutricional, como fenoles, folatos, vitamina E, ácido fólico, esteroides y carotenoides, estos últimos considerados minoritarios en relación a su concentración (McKevith, 2004). En general, en cereales estas especies químicas se concentran principalmente en las fracciones de salvado y germen, y la mayoría son más abundantes en la capa de aleurona. Asimismo, su contenido está sujeto a variaciones importantes atendiendo a factores como el tipo de cereal, la variedad, condiciones de cultivo, estadio de desarrollo, condiciones de almacenamiento o procesado (Liu, 2007; Fardet, Rock y Rémésy, 2008), cobrando especial relevancia las interacciones genotipo-ambiente (Hidalgo, Brandolini y Ratti, 2009; Van Hung y Hatcher, 2011; Lv *et al.*, 2013). El perfil carotenoide en cereales está conformado en su mayoría por xantofilas, siendo luteína la más abundante, seguida por zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, además de carotenos como  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno de forma minoritaria (figura 1). El embrión es el que presenta la mayor concentración de carotenoides, pero éste sólo representa entre el 3-5% del contenido total; por el contrario, la contribución del endospermo está en

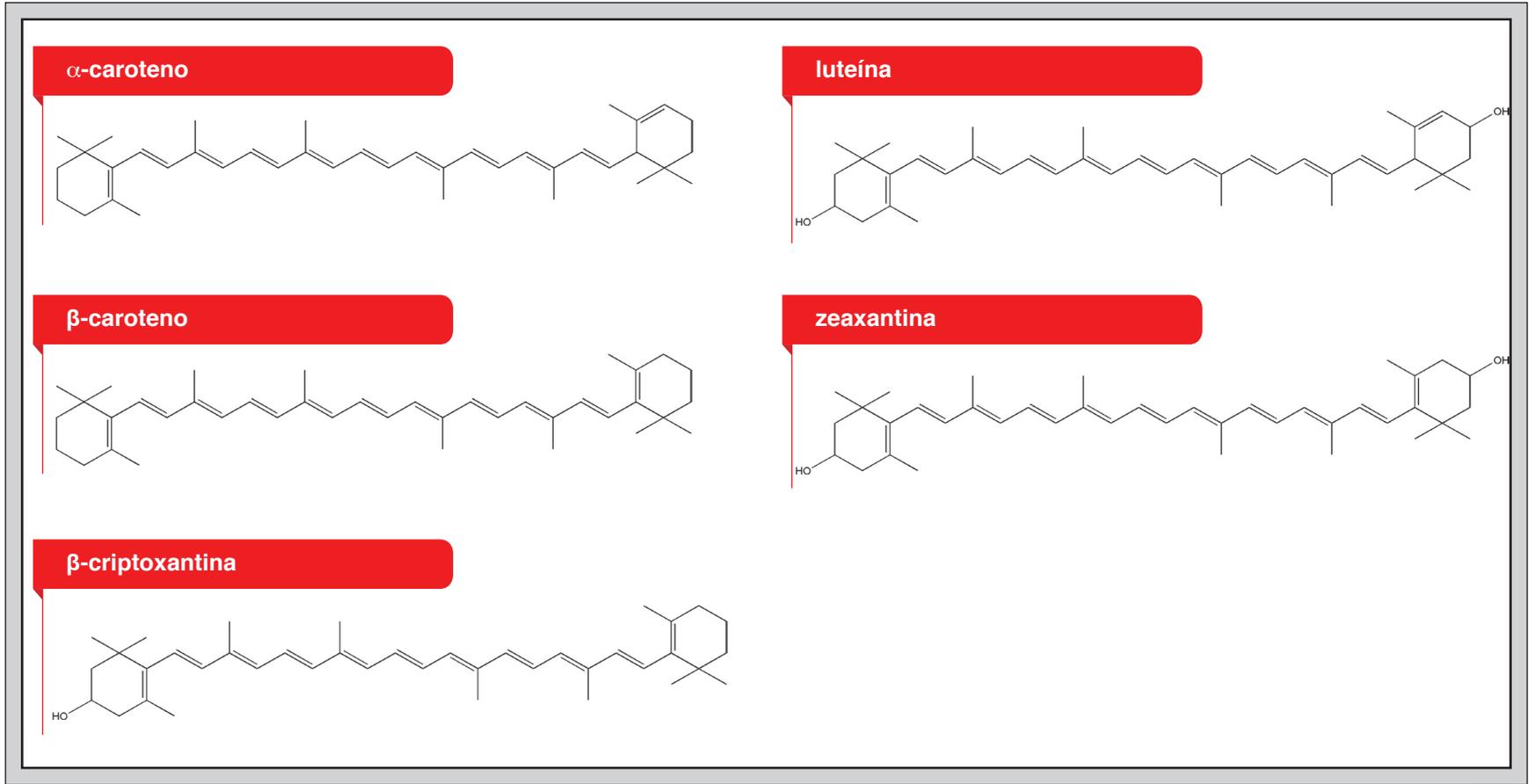


FIGURA 1. Estructura de los pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas) más comunes presentes en granos de cereales.

torno a 80-85% del grano de cereal, el que más influye en la contenido total de carotenoides del grano. La distribución de este perfil carotenoides parece variar entre genotipos de un mismo tipo de cereal (Siebenhandl *et al.*, 2007) y dentro del mismo grano, concentrándose  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina en el germen y salvado, mientras que luteína se distribuye más homogéneamente (Konopka, Kozirok y Rotkiewicz, 2004; Panfili, Fratianni y Distaam, 2004; Borrelli *et al.*, 2008; Ndolo y Beta, 2013). La bibliografía en relación a la composición de

carotenoides en cereales es bastante escasa, en especial para algunos como cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*) y mijo (*Panicum miliaceum*) (Choi, Jeong y Lee, 2007; Kandlakunta, Rajendran y Thingnganing, 2008; Mamatha, Sangeetha y Baskaran, 2011).

Entre todos los cereales, y aun siendo el nivel de carotenoides en estos alimentos relativamente bajo en comparación con frutas o verduras, podemos citar al maíz (*Zea mays*) de genotipo amarillo como el que presenta mayores niveles de

estos compuestos. La mayoría de los cultivares presentan zeaxantina como pigmento mayoritario y muestran también cantidades considerables de  $\beta$ -criptoxantina, y de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en menor medida (Panfili, Fratianni y Distaam, 2004). De los estudios cuantitativos realizados con este cereal se desprende que existe una gran variabilidad en el contenido de carotenoides entre variedades (Quackenbush *et al.*, 1961; Kurilich y Juvik, 1999; Egesel *et al.*, 2003; Berardo *et al.*, 2004; 2009), lo que evidencia que el genotipo es el factor más determinante en dicha variabilidad (Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Ibrahim y Juvik, 2009) seguido de las condiciones de almacenamiento y procesado (Scott y Eldridge, 2005; De Oliveira y Rodríguez-Amaya, 2007; Burt *et al.*, 2010).

En el caso del arroz (*Oryza sativa*) obviamente son las variedades pigmentadas las que resultan de mayor interés desde el punto de vista cuantitativo. El grano de arroz convencional concentra su contenido en carotenoides, casi en exclusividad, en el salvado (Fardet, Rock y Rémésy, 2008; Sellappan *et al.*, 2009) por lo que las habituales prácticas de molienda y pulido del grano conllevan una reducción drástica de estos componentes en el producto que llega al consumidor (Tan *et al.*, 2005). Al igual que para casi todos los cereales, la luteína resulta ser el pigmento mayoritario (Belefant-Miller y Grace, 2010), estando acompañada de zeaxantina y  $\beta$ -caroteno en cultivares de pigmentación oscura o negra (Frei y Becker, 2005; Lamberts y Delcour, 2008; Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008; Kim *et al.*, 2010). En algunas variedades de arroces negros tailandeses la concentración de  $\beta$ -caroteno en el salvado (33.58-41.48  $\mu\text{g/g}$ ) puede ser considerable (Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008).

Un estudio reciente realizado con semillas de mijo ha puesto de manifiesto su considerable contenido en  $\beta$ -caroteno (5.3-6.3

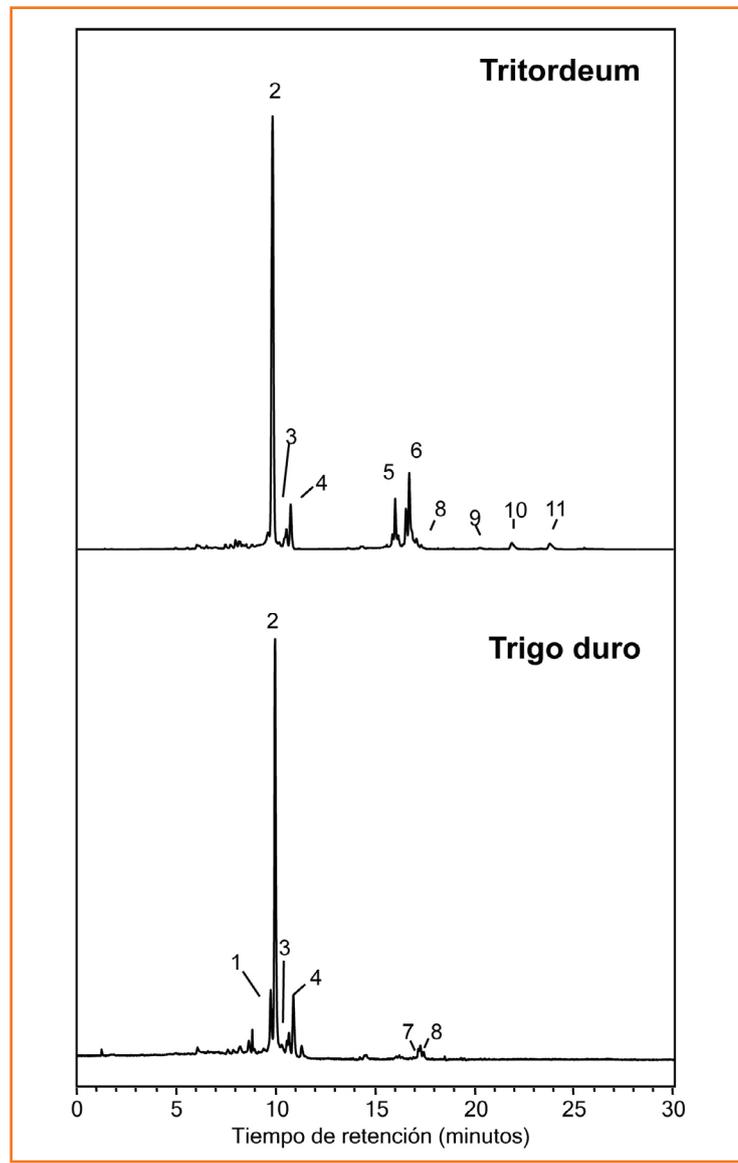
$\mu\text{g/g}$ ), siendo éste el pigmento mayoritario en este cereal (Li y Beta, 2012). Con respecto al sorgo (*Sorghum bicolor*), aunque ha sido considerado como uno de los cereales con menor contenido de carotenoides, los trabajos pioneros de Blessin, VanEtten y Wiebe (1958) y Suryanarayana Rao, Rukmini y Mohan (1968) sobre variedades de endospermo amarillo, así como los recientes estudios de Kean *et al.* (2007, 2011), ofrecen mejores perspectivas. Estos autores encontraron un contenido de carotenoides entre 0.11-0.32 mg/kg que, aunque sigue siendo bastante más bajo que el correspondiente del maíz amarillo, no debe ser despreciado dada la importancia de este cereal en la dieta de algunas poblaciones. La avena (*Avena sativa*) también se cita en la bibliografía como uno de los cereales con menor nivel de carotenoides, ya que presenta contenidos de luteína y carotenos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno) del orden de 0.20 mg/kg y 0.01 mg/kg, respectivamente (Panfili, Fratianni y Distaam, 2004).

El trigo (genero *Triticum*), junto con el maíz y el arroz, son los cereales más populares debido a su consumo generalizado. Este aspecto se ve más que constatado en la literatura, y existe interés especial en estudiar su perfil de compuestos saludables, así como la distribución inter- e intravarietal de los mismos (Lier y Lacroix, 1974; Velioglu *et al.*, 1998; Adom, Sorrells y Liu, 2003, 2005; Zhou, Su y Yu, 2004; Zhou y Yu, 2004; Okarter *et al.*, 2010; Di Silvestro *et al.*, 2012). Al igual que en maíz, la variabilidad genética encontrada entre genotipos para el contenido de carotenoides ofrece una herramienta interesante que puede ser adecuadamente utilizada en programas de mejora dirigidos a aumentar el contenido en compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (Leenhardt *et al.*, 2006; Digesù *et al.*, 2009). Los trigos de genoma diploide, en particular el trigo Einkorn (*Triticum monococcum*), están considerados como los que presentan

unos niveles más altos, aproximadamente del orden de dos a cuatro veces con respecto a los demás trigos. El trigo Einkorn también destaca por una mayor actividad antioxidante *in vitro* (Lavelli *et al.*, 2009). Seguidos de éstos se encuentran los trigos tetraploides, y en este caso son los trigos duros (*Triticum turgidum* conv. *durum*) los que presentan mayor contenido de carotenoides (en torno a 5-6 µg/g), aunque podemos mencionar otros, como el trigo ancestral Emmer (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) con niveles similares (aproximadamente de 3-5 µg/g). Por último, los trigos de genoma hexaploides están considerados los de menor contenido de carotenoides, pero se presta atención casi en exclusividad al trigo harinero común (*T. aestivum*) cuyo contenido medio está en torno a 2 µg/g (Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2008; Serpen *et al.*, 2008). Estos datos cuantitativos no son más que un reflejo de la selección y domesticación realizada por el hombre. Las especies cultivadas presentan mayor contenido que las variedades silvestres, fruto de la actividad de los programas de mejora y selección dirigida hacia variedades con un mayor contenido en nutrientes, entre los que destacan los carotenoides (Digesù *et al.*, 2009). Un ejemplo lo constituye el trigo duro, que ha sido ampliamente analizado debido a que el color amarillento de la sémola (también referido como *yellow pigment content*, YPC) está considerado como uno de los principales criterios de calidad de los productos derivados, principalmente la pasta, (Hentschel *et al.*, 2002; Humphries, Graham y Mares, 2004; Fratianni *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2011). La situación inversa ocurre con el trigo harinero, que como ya se indicó, presenta los niveles más bajos de carotenoides debido a la presión ejercida por el hombre, motivada por la preferencia de harinas cada vez más blancas para la posterior generación de derivados por exigencias del mercado.

La tribu *Triticeae*, que incluye las especies de trigo, cebada y centeno, es una serie de poliploides que se encuentran estrechamente relacionados, siendo posible generar híbridos anfiploides fértiles entre diferentes miembros cultivados de dicha tribu y sus parientes silvestres. Entre los cereales híbridos debemos destacar tritordeum, un novedoso cereal con carácter funcional. Se trata de un cereal obtenido a través del cruce entre una cebada silvestre, *Hordeum chilense*, de genoma diploide ( $H^{ch}H^{ch}$ ), y trigos diploides y poliploides (Martín y Chapman, 1977). El uso de *H. chilense* en los programas de mejora se ha centrado también, además del desarrollo de anfiploides como tritordeum, en la introgresión hacia el trigo de nuevos rasgos de mayor interés. Entre los atributos transferidos destaca un alto contenido de carotenoides localizado en el cromosoma  $7H^{ch}$ . Los primeros híbridos fértiles, con características óptimas para convertirse en un posible cultivo, se obtuvieron con los cruces de *H. chilense* y *T. turgidum* (trigo duro, tetraploide, de dotación genómica AABB), produciéndose así los denominados tritordeum hexaploides ( $2n=6x=42$ ,  $H^{ch}H^{ch}AABB$ ), que mostraban una baja frecuencia de aneuploides, una amplia variación en la tasa de crecimiento y un grado óptimo de fertilidad (Martín y Sánchez-Monge, 1982).

La mayoría de las estimaciones del contenido carotenoide realizadas en tritordeum no proporcionan información de la composición individualizada del perfil de pigmentos, debido a las metodologías analíticas tradicionalmente empleadas en cereales. Mediante las estimaciones como YPC se han descrito en líneas de tritordeum unos niveles en carotenoides del orden de cinco a seis veces superior (en el rango de 11-13 µg/g) con respecto a trigo harinero (2 µg/g) y de dos a tres veces superior con respecto a trigo duro (5-6 µg/g) (Álvarez *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 1999), siendo comparable a los niveles que caracterizan al trigo Einkorn. En un estudio más completo, en



**FIGURA 2.** Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos directos de pigmentos carotenoides obtenidos de granos de tritordeum y trigo duro. Identidad de los picos: 1. all-*trans*-Zeaxanteno; 2. all-*trans*-Luteína; 3. 9-*cis*-Luteína; 4. 13-*cis*-Luteína; 5. Luteína-monolinoleato; 6. Luteína-monopalmitato; 7.  $\alpha$ -caroteno; 8.  $\beta$ -caroteno; 9. Luteína dilinoleato; 10. Luteína linoleatopalmitato; 11. Luteína dipalmitato.

el que se evaluó un total de 35 líneas primarias de tritordeum junto con sus respectivos parentales, 27 accesiones de *H. chilense* y 19 cultivares de trigo duro, los niveles medios de carotenos ( $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno, YPC) para el anfiploide seguían siendo del orden de dos veces superior al parental de trigo duro pero tres veces inferior a la media de *H. chilense* (Álvarez, Martín y Martín, 1999). Dentro de las líneas avanzadas de tritordeum, HT621 se encuentra registrada como línea élite de germoplasma destacando por su alto contenido en pigmentos carotenoides ( $19 \mu\text{g}$  equivalentes de  $\beta$ -caroteno/g, YPC) (Ballesteros *et al.*, 2005).

Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio (Atienza *et al.*, 2007; Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012) han contribuido sustancialmente a la caracterización y cuantificación de pigmentos carotenoides individuales en tritordeum por vez primera. Al igual que para la mayoría de los cereales, luteína es también el pigmento mayoritario (>85%) destacando una alta esterificación (monoésteres y diésteres) de la misma, acompañada también de cantidades menores de  $\beta$ -caroteno (figura 2). Como media, el contenido total de carotenoides en tritordeum ( $6.5 \mu\text{g/g}$  de peso fresco) fue significativamente superior, aproximadamente ocho veces mayor, cuando se comparó con el de trigo duro ( $0.7 \mu\text{g/g}$  de peso fresco).

Actualmente, tritordeum está siendo sometido a un intenso programa de mejora desarrollado en el Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) en Córdoba, para optimizar su uso como un nuevo cereal y su incorporación a la formulación de alimentos funcionales. Sus zonas de cultivo se concentran en España (Andalucía, Castilla y Cataluña), sur de Italia y sur de Portugal. En 2008 fue registrada, con el nombre Aucán, la primera línea de tritordeum en el European Community Plant Variety

Registration (CPVO), y otras líneas están avanzadas en sus últimas fases de desarrollo y evaluación. Como resultado de estos esfuerzos, a principios de 2013, la empresa española Agrasys ([www.agrasys.es](http://www.agrasys.es)) ha comenzado la comercialización de harinas de tritordeum bajo la marca Vivagran®.

## ANÁLISIS DE CAROTENOIDES EN CEREALES

El análisis de carotenoides en cereales, al igual que en la mayoría de las muestras biológicas, con independencia de su origen, se compone de tres etapas básicas: preparación de la muestra, extracción y separación o aislamiento de los pigmentos, y posterior cuantificación de los mismos. Debido a las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas, pueden existir problemas en cualquiera de los pasos analíticos, como degradación de los pigmentos por oxidación, extracción incompleta o isomerización *cis-trans*. Todo ello obliga a tomar una serie de precauciones en la rutina del laboratorio. Estos aspectos han sido ampliamente tratados por diversos autores (Britton, 1985; Tee y Lim, 1991; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Oliver y Palou, 2000; Rodríguez-Amaya, 2001; Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002) y en el capítulo 2 .

Un problema generalizado en la estimación cuantitativa de carotenoides en cereales es la incompleta extracción de los pigmentos, como por ejemplo a partir de granos de trigo duro o productos derivados como sémolas y pastas (Burkhardt y Böhm, 2007), lo que genera estimaciones erróneas, que ponen de manifiesto la necesidad de optimizar los protocolos empleados para cada matriz (Hentschel *et al.*, 2002).

Debido a que el color de los productos derivados del trigo

duro es un criterio de calidad importante, la determinación de pigmentos en esta matriz, y en cualquiera de sus presentaciones, ha sido la más estudiada en cereales. La metodología normalmente empleada en la bibliografía se puede agrupar en dos tipos principales. Por un lado los métodos destructivos, que implican la extracción química y determinación espectrofotométrica (métodos oficiales o métodos alternativos) y, por otro, los métodos no destructivos, basados en su mayoría en mediciones colorimétricas mediante reflectancia, NIRS, CIE ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) (Berardo *et al.*, 2004, 2009; Humphries, Graham y Mares, 2004). Como prerrequisito del análisis, en algunos casos es necesario el tratamiento de la muestra antes de realizar la extracción, con el objetivo de facilitar la liberación de pigmentos desde la matriz, al tiempo que se aumenta la homogeneidad de la muestra. Generalmente en cereales este proceso implica la molienda, mediante la cual se reduce la muestra a una harina. Esta operación puede ser por vía seca o húmeda, en cuyo caso molienda y extracción se hacen simultáneamente. En este último caso el extracto obtenido debe ser filtrado o centrifugado y posteriormente el residuo es sometido a otras extracciones hasta el agotamiento del color.

Entre los métodos oficiales de determinación de pigmentos aplicables a cereales existen dos muy conocidos para la extracción y valoración del llamado *Yellow Pigment Content* (YPC) los cuales se encuentran registrados para trigo duro (sémolas y harinas), método 152 de la ICC (International Association for Cereal Science and Technology) y el método 14-50 de la AACCC (American Association of Cereal Chemists). Ambos métodos se basan en la extracción de los pigmentos mediante 1-butanol saturado en agua seguido de cuantificación espectrofotométrica, expresando la concentración de pigmentos mediante equivalentes de  $\beta$ -caroteno. En los últimos

años las deficiencias en ambos métodos se han hecho cada vez más patentes, llevando a los analistas a utilizarlos con fines comparativos y complementarios otros más fiables (Fратиanni *et al.*, 2005; Beleggia *et al.*, 2010), así como a desarrollar modificaciones o adaptaciones en los mismos. Mediciones a otras longitudes de onda, estimación del cálculo de concentración con base en la luteína como pigmento principal (Abdel-Aal *et al.*, 2007; Burkhardt y Böhm, 2007), junto con la reducción del material necesario para el análisis (micro-escala) (Santra, Rao y Tamhankar, 2003; Beleggia *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013) se encuentran entre las modificaciones más frecuentes.

La elección del disolvente es un aspecto de suma importancia para la extracción de antioxidantes en alimentos (Taungbodhitham *et al.*, 1998). Zhou y Yu (2004a) observaron un efecto muy acusado del disolvente empleado al estimar la actividad antioxidante de fracciones de salvado de trigo, obteniendo los mejores resultados con la mezcla acetona y agua (50:50). Esto ha llevado a algunos autores a comparar distintos disolventes como alternativa al propuesto en los métodos oficiales (Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007). Los disolventes alternativos más habituales son acetona, etanol, metanol, tetrahidrofurano, mezclas de éstos e incluso mezclas con agua (acetona-agua, 80:20). Un procedimiento muy generalizado en el análisis de carotenoides es la eliminación de materia grasa en los extractos obtenidos, siendo la saponificación alcalina el método más comúnmente empleado. En muchos casos, la etapa de saponificación se traduce en una simplificación del análisis cromatográfico al eliminar sustancias interferentes (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Sin embargo, también conlleva una pérdida de información estructural relevante ya que elimina los ésteres de xantofilas con ácidos grasos, además de la fracción clorofílica en caso de estar presente. Uno de los métodos más utilizados

es la saponificación con el uso de disoluciones metanólicas de NaOH o KOH, normalmente entre el 10-30% (p/v) a temperatura ambiente, (Konopka, Czaplicki y Rotkiewicz, 2006; Kean *et al.*, 2007; Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008). Egesel *et al.* (2003) emplearon un porcentaje de 80% a 85°C, y Xu *et al.* (2010) y Hu y Xu (2011) lo usaron para el análisis de carotenoides en granos de maíz reduciendo así el tratamiento a 10 minutos, aunque estas condiciones tan agresivas pueden, sin lugar a dudas, generar pérdidas significativas de pigmentos por degradación oxidativa, derivando en una inevitable infravaloración del contenido de carotenoides. Rivera y Canela (2012) han investigado recientemente la influencia del procesado y acondicionado de las muestras y del disolvente de extracción en el análisis de carotenoides en maíz.

En general, el extracto que se obtiene después de extraer y saponificar (según el caso), consta de una mezcla de pigmentos de distinta polaridad, tanto carotenos como xantofilas. La evolución de las técnicas de separación de pigmentos ha experimentado una profunda transición desde el empleo de sistemas de reparto de fases hasta las técnicas cromatográficas (clásicas y modernas), promovido especialmente por el desarrollo continuo de diferentes fases estacionarias (Rizolo y Polesello, 1992; Oliver y Palou, 2000). Hoy en día, el análisis de pigmentos carotenoides en cereales se realiza principalmente mediante HPLC, facilitando la composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides individuales de una muestra, en contraposición de la información que puede obtenerse por los métodos colorimétricos o los espectrofotométricos oficiales. Las técnicas cromatográficas clásicas, ampliamente utilizadas en el pasado, como la cromatografía en columna abierta (OCC) o en capa fina (TLC) (Quackenbush *et al.*, 1961; Blessin, 1962; Lepage y Sims, 1968) han sido completamente sustituidas por

HPLC para la determinación de carotenoides en cereales. No obstante, la técnica de TLC permanece en uso en la actualidad de forma complementaria, ya que es esencial para pruebas identificativas y necesaria para la obtención de estándares.

Con respecto a la aplicación de métodos de HPLC para el análisis de carotenoides en cereales, la técnica más habitual suele ser la fase reversa usando como fases estacionarias octadecilsilano (C<sub>18</sub>) o triacontilsilano (C<sub>30</sub>). Esta última aumenta la interacción entre la fase sólida y el analito (revisado por Sander, Sharpless y Pursch, 2000). Esto ha supuesto un avance en el poder de resolución cromatográfico que facilita la identificación de isómeros geométricos (O'Neil y Schwartz, 1992). La fase C<sub>30</sub> ha sido utilizada ampliamente para la separación de pigmentos en cereales como maíz (Moros *et al.*, 2002; Egesel *et al.*, 2003; Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008; Xu *et al.*, 2010; Hu y Xu, 2011), cebada (Siebenhandl *et al.*, 2007), trigo (Konopka, Czaplicki y Rotkiewicz, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Digesù *et al.*, 2009; Werner y Böhm, 2011) y arroz (Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008; Kim *et al.*, 2010). Sin embargo, Kean *et al.* (2007) emplearon una columna polimérica C<sub>18</sub> para el aislamiento de carotenoides en granos de sorgo consiguiéndolo en 30 minutos, aunque obtuvieron en cambio una resolución parcial de los isómeros *cis*. Leenhardt *et al.* (2006) utilizaron la misma columna para establecer una correlación entre las determinaciones de pigmentos espectrofotométricas y la obtenida por HPLC en trigos harineros; la misma comparación más exhaustiva fue realizada por Luterotti *et al.* (2013) con harinas y sémolas de maíz. Di Silvestro *et al.* (2012) se suman al empleo de columna C<sub>18</sub> para la valoración de pigmentos en un estudio amplio con diversas variedades de trigo. Recientemente, se han desarrollado métodos rápidos y sensibles para la medida de carotenoides en trigo duro y maíz transgénico mediante el empleo de la

técnica UPLC (Van Hung y Hatcher, 2011; Rivera *et al.*, 2013).

En relación con la fase móvil, la mezcla de disolventes polares como metanol, acetonitrilo, acetona, metil *tert*-butil éter y agua se encuentran entre los más utilizados (Hentschel *et al.*, 2002; Moros *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza *et al.*, 2007; Belefant-Miller y Grace, 2010; Lachman, Hejtmánková y Kotíková, 2013). Como alternativa a la fase reversa, la cromatografía en fase normal de sílice también ha sido tradicionalmente aplicada en cereales (Weber, 1987; Panfili, Fratianni y Distaam, 2004). Los gradientes de elución durante la separación también son preferidos aunque los sistemas de elución isocrático se emplean en algunas ocasiones (Serpen *et al.*, 2008). La efectividad de la separación depende en gran medida del tamaño de partícula; siendo las más empleadas de 3 y 5 µm de diámetro; éste constituye un campo en desarrollo con la aparición de la técnica UPLC y la utilización de partículas inferiores a 1.7 µm, así como las novedosas fases de núcleo rígido de 2.6 µm que posibilitan obtener resoluciones y tiempos de análisis similares a los de UPLC en sistemas cromatográficos convencionales. La detección de los pigmentos se lleva a cabo principalmente con detectores espectrofotométricos de ultravioleta-visible. Los de longitud de onda variable y los detectores de diodos en línea (DAD) son los más empleados debido a la posibilidad de obtener el espectro de absorción completo (revisado por Huber y George, 1993; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Para la cuantificación de los pigmentos mediante HPLC se pueden emplear tanto estándares internos como externos bien de origen comercial o aislados a partir de fuentes naturales. La combinación acoplada de HPLC con detectores de espectrometría de masas (HPLC-MS) ha supuesto una mejora sustancial en la identificación de los pigmentos, aportando una mayor especificidad y resolución de mezclas complejas

(Van Breemen, 1997). La técnica en tándem de HPLC-DAD-MS se ha empleado con éxito para el análisis de carotenoides en cereales, utilizando como técnicas de ionización el electrospray (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Zhou, Su y Yu, 2004; Moore *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza, *et al.*, 2007). Recientemente se han utilizado estas técnicas para la caracterización por vez primera de los regioisómeros de monoésteres y diésteres de luteína in tritordeum (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). La fracción de monoésteres la conforman los regioisómeros luteína-3'-*O*-linoleato, luteína-3-*O*-linoleato, luteína-3'-*O*-palmitato y luteína-3-*O*-palmitato, mientras que la fracción de diésteres está integrada por dos homoésteres, luteína dilinoleato y luteína dipalmitato, y por los dos regioisómeros de un heretodiéster, luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato.

La literatura reciente cuenta con revisiones actualizadas sobre las herramientas analíticas y espectrométricas de aplicación en la determinación de pigmentos carotenoides en diversas fuentes (Rivera y Canela-Garayoa, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012; Arvayo-Enríquez *et al.*, 2013; Rivera, Christou y Canela-Garayoa, 2013; Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

## TECNOLOGÍA DE CEREALES Y SU INFLUENCIA SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN GRANOS Y PRODUCTOS DERIVADOS

Las condiciones de conservación y almacenamiento, así como las distintas técnicas de procesado, implican por lo general cambios en los componentes de los alimentos, por lo que su estudio es crucial en el campo de la tecnología de alimentos,

por ser determinantes de muchos atributos de calidad sensorial y nutricional (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Nicoli, Anese y Parpinel, 1999; Rodríguez-Amaya, 2003; Kalt, 2005). En relación con estos aspectos se deben diferenciar el efecto del propio procesado del alimento, las variables medioambientales, tales como presión parcial de oxígeno, temperatura, luz y humedad bajo las que se desarrolla el tratamiento, y las interacciones con otras moléculas antioxidantes y pro-oxidantes presentes (Lindley, 1998; Nicoli, Anese y Parpinel, 1999). En el caso de los carotenoides presentes en los cereales, el almacenamiento de los granos y productos derivados se traduce generalmente en una disminución del contenido de pigmentos, y es directamente proporcional a la duración del proceso y al incremento e intensidad de otras variables, como la temperatura o el concurso de procesos de degradación (Cristóbal, 1965; Weber, 1987). Resulta llamativo que la bibliografía concerniente a este aspecto sea especialmente escasa, ya que los cereales se caracterizan por experimentar periodos de almacenamiento prolongados como parte de su tratamiento tecnológico industrial. Por otro lado resulta complicado definir una pauta generalizada en el comportamiento o afectación de los pigmentos para procesos como descascarillado, molienda, secado, horneado, fermentación, etc., ya que en la bibliografía se encuentran resultados muy dispares. En general estos procesos afectarán la estructura interna de la matriz del cereal o producto derivado, con implicaciones importantes en relación con la accesibilidad y posterior biodisponibilidad de los carotenoides (Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008; Kean *et al.*, 2011; Maiani *et al.*, 2009).

La velocidad a la que acontecen estos cambios ha sido materia de estudio generalizada en tecnología de alimentos. La bibliografía sobre cinética de carotenoides en alimentos es tan numerosa como dispar, por lo tanto es una temática en la que existen resultados a menudo contradictorios (Mínguez-

Mosquera *et al.*, 1997). La abundancia de tales trabajos refleja la importancia de los pigmentos carotenoides no sólo desde el punto de vista nutricional, sino también desde el tecnológico para la industria alimentaria, pues es de interés no sólo cuantificar las pérdidas también analizar las condiciones que proporcionen mayor estabilidad y retención de los mismos. El color es considerado uno de los principales criterios de aceptación de los productos por los consumidores. En la industria harino-panadera y en el sector de pastas y sémolas este criterio también es importante, en especial, para los productos derivados de trigo duro.

Las investigaciones al respecto intentan por lo tanto reproducir las condiciones de procesado y almacenamiento de los alimentos, incluidos los cereales. Con ello se pretende comparar entre los distintos tratamientos industriales y monitorear la incidencia individual o conjunta de factores como actividad del agua, temperatura, luz, oxígeno, pH y otras sustancias pro-oxidantes o antioxidantes (Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1994; Tsimidou, 1997; Selim, Tsimidou y Biliaderis, 2000; Fish y Davis, 2003; Ouchi *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2012). De esta forma se puede estimar la vida útil de los alimentos y la de sus componentes bioactivos. La mayoría de los estudios se han realizado en alimentos vegetales como zanahorias (Wagner y Warthesen, 1995; Koca, Burdurlu y Karadeniz, 2007; Lemmens *et al.*, 2010), tomate (Sharma y Le Maguer, 1996; Tonon, Baroni y Hubinger, 2007); pimiento y derivados (Carbonell *et al.*, 1986), patata o papa (Bechoff *et al.*, 2010), y zumos o jugos de cítricos (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Zepka *et al.*, 2009) y es habitual que los autores describan una reacción de degradación que cursa según una cinética de orden 0 o 1. Sin embargo, la bibliografía es bastante limitada para el caso particular de los cereales, debido probablemente al bajo nivel de pigmentos que éstos presentan, y existen muy

pocos estudios en los que se realice una valoración cinética detallada (Guzmán-Tello y Cheftel, 1990; Hidalgo y Brandolini, 2008a; Mellado-Ortega, 2013). No obstante, aunque no se cuantifiquen dichas alteraciones, en la mayoría de los trabajos con cereales, los autores coinciden en indicar que los cambios acontecen en general más rápido al inicio de los procesos de almacenamiento y conforme progresan se amortigua la velocidad de las pérdidas que se registran (Quackenbush, 1963; Burt *et al.*, 2010).

## ESTABILIDAD DE LOS CAROTENOIDES DURANTE EL ALMACENAMIENTO POSCOSECHA DE GRANOS Y HARINAS

Los procesos de almacenamiento conllevan pérdidas de carotenoides promovidas en su mayoría por procesos de oxidación, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática. El oxígeno presente en el medio está considerado como el factor con mayor influencia en relación a la estabilidad de los carotenoides (Britton y Khachik, 2009). Otras modificaciones de la molécula carotenoide asociadas a estos procesos son las isomerizaciones geométricas (*Z/E* o *cis-trans*) promovidas por la temperatura o la luz, y que conllevan alteraciones de la actividad biológica de los pigmentos más que pérdidas netas. Los mecanismos de ambos procesos han sido ampliamente estudiados (El-Agamey y McGarvey, 2008; Liaaen-Jensen y Lutnaes, 2008). Mientras que en los almacenamientos de granos de cereal la oxidación de los pigmentos viene mediada prácticamente por el oxígeno, en los de productos derivados como las harinas, entre otros, la alteración de la matriz conlleva no sólo procesos oxidativos directos sino también mediados por enzimas al facilitar el contacto entre éstas y los carotenoides (Doblado-Maldonado *et al.*, 2012).

Como ya se comentó, los resultados obtenidos en estos experimentos dependen básicamente de las condiciones empleadas, las variables más evaluadas son la duración del tratamiento y la temperatura. En la bibliografía se encuentran ejemplos en los que se observan claramente los efectos de estas dos variables, lo que permite predecir su repercusión en la estabilidad de los carotenoides presentes (Arya y Parihar, 1981; Farrington, Warwick y Shearer, 1981; Pinzino, Nanni y Zandomenighi, 1999; Calucci *et al.*, 2004; Nghia *et al.*, 2006; Hidalgo y Brandolini, 2008a).

En ocasiones, los diseños experimentales cubren, además del propio almacenamiento, una práctica de procesado habitual en tecnología de cereales (como el secado, la molienda y el descascarillado). Esto amplía el estudio, pero por otro lado dificulta en cierta medida la interpretación de los resultados que se obtienen. Belefant-Miller y Grace (2010) evalúan el comportamiento de carotenoides durante el almacenamiento prolongado de arroz previamente descascarillado. Una de las prácticas habituales en cereales antes de su almacenamiento es el secado de los granos. La reducción de la humedad evita el deterioro por mohos, ácaros, etc., así como una posible germinación prematura del grano (Chelowski, 1994; Jood y Kapoor, 1994). Algunos autores como Burt *et al.* (2010) no obtienen una reducción significativa del contenido en pigmentos cuando comparan el secado a alta temperatura (90 °C) con el correspondiente a temperatura ambiente manteniendo el resto de las condiciones de almacenamiento de los granos de maíz. Por el contrario, otros estudios sí encuentran diferencias importantes en dicho contenido atribuidas no sólo a la temperatura aplicada durante el secado de los granos sino también a la duración del mismo (Quackenbush, 1963). Al margen de esta controversia, las condiciones óptimas para la conservación de los cereales,

y en particular para preservar los carotenoides presentes en ellos, se alcanzan siempre empleando un método de retirada exhaustiva de agua (deshidratación) y almacenamiento a temperaturas bajas.

Los estudios sobre almacenamientos de granos y derivados permiten además evaluar aspectos relevantes del metabolismo postcarotenogénico, como la esterificación con ácidos grasos que media su acumulación y estabilidad en estos alimentos (Kaneko, Nagamine y Yamada, 1995; Kaneko y Oyanagi, 1995). El aumento de la esterificación de la luteína conforme progresa el almacenamiento de granos, inducido o modulado por la temperatura, es un aspecto que ha sido caracterizado por algunos autores (Ahmad *et al.*, 2013; Mellado-Ortega, Atienza y Hornero-Méndez, 2015). Esto proporciona información sobre las condiciones idóneas para almacenar los cereales para preservar así su contribución en estos compuestos. Además se ha podido evaluar la especificidad de los sistemas enzimáticos implicados en la esterificación al comparar el almacenamiento de granos y harinas de tritordeum y trigo duro. Como consecuencia se han encontrado importantes diferencias no sólo atribuibles a la naturaleza de la esterificación para cada caso sino también a la regiospecificidad enzimática sobre la molécula de luteína y ácido graso implicados en tales reacciones (Mellado-Ortega, 2013). Independientemente del material vegetal, grano o harina, se ha estudiado la estabilidad del pigmento esterificado frente al libre, constatando que las velocidades de degradación siempre son mayores para estos últimos.

Esto proporciona una información muy valiosa que podría emplearse en los programas de mejora de cultivos para constituir el patrón de esterificación de xantofilas del vegetal, un rasgo fenotípico de interés para la selección de

variedades (Fernández-Orozco, Gallardo-Guerrero y Hornero-Méndez, 2013). En este sentido, los estudios de mejora de cereales dirigidos al aumento del contenido de carotenoides deberían basarse en la selección de variedades con mayor concentración de xantofilas esterificadas para incrementar la capacidad de acumulación de los mismos y su estabilidad en las semillas.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de tratamientos térmicos previos al periodo de almacenamiento de harinas para evaluar la generación de radicales libres y su impacto en los antioxidantes (Andersen *et al.*, 2011), así como la posible inactivación de enzimas que intervienen en su degradación (Rodríguez-Amaya, 1997).

## EFFECTO DEL PROCESADO DE CEREALES SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES

Por lo ya expuesto, no cabe duda de que las distintas técnicas de procesado modulan y afectan al contenido de carotenoides que finalmente está presente en los productos derivados de los cereales debido, entre otros factores, a la distribución desigual de los pigmentos en las distintas partes del grano (Konopka, Kozirok y Rotkiewicz, 2004; Zhou, Laux y Yu, 2004). Esto ha llevado a la modificación y el desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento con el objetivo de preservar o potenciar el contenido de carotenoides y otros compuestos de relevancia nutricional. Las técnicas emergentes de procesado se suman así a la mejora convencional y la manipulación genética para la obtención de cultivos de granos biofortificados (Hemery *et al.*, 2007; Fardet, 2010). Los cereales en general se procesan de dos maneras. Por una parte, mediante fraccionamiento en seco seguido de cocinado (a diferentes condiciones de temperatura,

contenido de agua y presión), con lo que se obtienen productos como pasta, galletas y cereales de desayuno, entre otros. Por otra parte, mediante fermentación, dando lugar a bebidas alcohólicas. Los productos más populares como el pan y la bollería combinan ambos tratamientos.

El procesado básico de fraccionamiento y la molienda del cereal han permitido el análisis de carotenoides al establecer comparaciones entre las distintas capas del grano de cereal y fracciones comerciales de interés (Ndolo y Beta, 2013). Los análisis de productos integrales y de aquellos desprovistos del germen (Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008), harina sin salvado y fracciones del mismo (Žilic *et al.*, 2012), granos integrales y descascarillados (Kean *et al.*, 2011), granos, harinas y sémolas (Fares *et al.*, 2008; Luterotti y Kljak, 2010) suelen encontrarse entre las comparaciones más frecuentes. Uno de los primeros trabajos realizados al respecto es el de Blessin, Brecher y Dimler (1963) en granos de maíz. Estos autores analizaron el efecto sobre el contenido en pigmentos del fraccionamiento manual e industrial de las distintas capas del grano. Recientemente, Sellappan *et al.* (2009) han descrito las pérdidas de  $\beta$ -caroteno, hierro y zinc en granos de arroz transgénicos sometidos a pulido, estimándose éstas en más de 70%. El pulido es una práctica industrial habitual de este cereal que conlleva la eliminación casi completa de la capa de aleurona y del embrión (Juliano, 1994). La clasificación de genotipos de cereales, mediante la caracterización de su contenido en pigmentos atribuido a fracciones específicas del grano puede ser un buen ejemplo del uso de estas técnicas para la mejora de cultivos. Análisis descriptivos como los de Siebenhandl *et al.* (2007) contribuyen al respecto, evaluando fracciones con distintos tamaños de partícula de salvado y harinas, lo que facilita la clasificación y selección de diversos genotipos de trigos y cebadas. El tamaño de partícula

generado en estos procesos tiene una gran influencia no sólo desde el punto de vista técnico sino también nutricional. Así, la reducción del tamaño de partícula puede facilitar la liberación de vitaminas y otros compuestos desde las capas más externas del grano (Kahlon *et al.*, 1986; Zhou, Laux y Yu, 2004; Fratianni *et al.*, 2005). Zhou, Laux y Yu (2004) comprobaron que la micronización de la capa de aleurona se tradujo en una mayor capacidad antioxidante comparada con la no micronizada, el salvado y el grano, debido quizá a una mayor disponibilidad de antioxidantes.

Los diversos tratamientos térmicos que se aplican a los cereales con el objetivo de ampliar la vida útil de los productos también se han reproducido a escala de laboratorio para determinar el efecto en el contenido de carotenoides. El tostado de los cereales parece tener bastante repercusión y desencadena una reducción significativa en el contenido de pigmentos. Así lo indicaron De Oliveira y Rodríguez-Amaya (2007) en un trabajo en el que analizaron una serie de productos derivados del maíz, crudos y procesados, estimando unas pérdidas para zeaxantina aproximadamente de 53% tras el tostado de harina de dicho cereal. Resultados similares se han descrito como consecuencia de la cocción del arroz (Lamberts y Delcour, 2008). Scott y Eldridge (2005) realizaron una comparación de diversos tratamientos térmicos, y analizaron el perfil carotenóide en maíz fresco, congelado y enlatado, y encontraron que en este caso el procesamiento térmico de maíz para enlatarlo no produce una disminución relevante del contenido de carotenoides. La congelación y los tratamientos de escaldado que se aplican antes de congelar los granos de cereales, y vegetales en general, pueden producir un aumento en la bioaccesibilidad de los carotenoides (Selman, 1994). El calentamiento por microondas de salvado de arroz también produce efectos similares, y no supone

una reducción del nivel de pigmentos, por lo que se propone como una buena alternativa para favorecer la conservación y estabilización de esta fracción del grano (Abdul-Hamid *et al.*, 2007). La extrusión es un tratamiento más complejo. Se trata de un proceso multi-etapas ampliamente empleado en la industria para generar productos como los cereales de desayuno. Las condiciones suaves aplicadas durante la extrusión (contenido alto de humedad, tiempo de residencia bajo y baja temperatura) tienen un claro efecto positivo sobre la retención de vitaminas y carotenoides, y la disminución de la peroxidación lipídica entre otros (Cheftel, 1986; Singh, Gamlath y Wakeling, 2007). Guzmán-Tello y Cheftel (1990) estudiaron los cambios en la concentración de  $\beta$ -caroteno bajo condiciones más severas en la extrusión de harina de trigo, estimando las pérdidas en un rango de 38-73% para un intervalo de temperatura aplicada de 125-200°C. Otros procesados como el malteado de la cebada destacan por generar resultados bastantes dispares cuando se evalúa el efecto de dicho procesado sobre el nivel de pigmentos. Así, Goupy *et al.* (1999) en un estudio de distintas variedades de cebada registran tanto pérdidas (aproximadamente de 76%) como ganancias en el contenido de carotenoides.

Los análisis realizados durante los distintos pasos de procesamiento de las sémolas y generación de pastas indican que es durante la etapa de amasado cuando se registran las mayores pérdidas en pigmentos carotenoides, mientras que el posterior periodo de secado y maduración resulta ser el menos agresivo (Panfili, Fratianni e Irano, 2005; Hidalgo, Brandolini y Pompei, 2010; Fratianni *et al.*, 2012). Análogamente, la obtención de pan, bollos y galletas también lleva asociadas pérdidas considerables de carotenoides durante el amasado (Leenhardt *et al.*, 2006b). Algunos autores, no obstante, describen otras etapas en las que las mermas en pigmentos

pueden cobrar también protagonismo, destacando la etapa del horneado. En un estudio sobre la evolución de pigmentos durante la fabricación de pan a partir de trigo harinero y einkorn, Hidalgo, Brandolini y Pompei (2010) registran pérdidas medias de 47% para la corteza de pan frente a 21% para la miga. Al comparar ambos tipos de trigo observaron pérdidas menores en einkorn, caracterizado por presentar mayor contenido de pigmentos. La degradación durante el amasado está gobernada por una oxidación enzimática de los pigmentos, lo que ha llevado a diversos autores a relacionar ambos aspectos (actividades enzimáticas de degradación y pérdidas en carotenoides) en los programas de mejora para la selección de genotipos de cereales óptimos y adaptados a las aplicaciones panaderas (Trono, Pastore y Di-Fonzo, 1999; Borrelli *et al.*, 2003; Leenhardt *et al.*, 2006, 2006a; Fu *et al.*, 2013).

En el caso de tritordeum, las propiedades de este nuevo cereal lo hacen apto para aplicaciones panaderas similares a las del trigo harinero y, por el contrario, menos adecuado para la fabricación de sémolas. Recientemente las harinas de tritordeum han empezado a comercializarse, aventurando múltiples aplicaciones para ellas como fabricación de pan, pan de molde, galletas u otros productos cerealistas ([www.agrasys.es](http://www.agrasys.es)). En este sentido, aunque el proceso de elaboración de pan y otros derivados supone pérdidas del contenido de carotenoides, como para cualquier cereal, el pan de tritordeum presenta unos niveles superiores de luteína (seis veces más) que el que tienen los panes de trigos convencionales (según análisis realizado en nuestro laboratorio para Agrasys).

## APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA DE CAROTENOIDES EN CEREALES

La biotecnología como técnica de mejora vegetal aplicada al aumento del contenido de carotenoides en cereales se ha utilizado sobre todo con tres especies: maíz, trigo y sorgo. La relevancia de estos cereales y su trascendencia en la nutrición de poblaciones desfavorecidas quedan patentes en programas de biofortificación como el de Harvestplus, perteneciente al Consultive Group on International Agricultural Research (CGIAR). Este programa está centrado en el aumento de hierro, zinc y provitamina A de cultivos básicos (<http://www.harvestplus.org/>).

El avance en la exploración de los genomas de los principales cereales como el trigo, el cual ha sido recientemente secuenciado (Eversole *et al.*, 2014), ha podido llevarse a cabo gracias a la existencia de modelos genómicos como el arroz y el sorgo (Paterson *et al.*, 2009; Mace y Jordan, 2011). Gran parte de la investigación se ha basado en primer lugar en estudiar la viabilidad del rasgo susceptible a ser mejorado de forma convencional, es decir, en este caso, la variabilidad para el contenido de carotenoides en una población dada, y en segundo lugar la heredabilidad del mismo que ha sido apuntada como alta (Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006). Los genomas de maíz, sorgo y trigo han demostrado presentar una diversidad genética importante para este carácter, como refleja la existencia de germoplasmas élite de dichas especies (Chander *et al.*, 2008; Ibrahim y Juvik, 2009). Hasta la actualidad el estudio se ha centrado en la detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL), es decir, localizaciones en cromosomas cuya variación alélica está asociada con la variación de un carácter cuantitativo, como el contenido carotenoides, ya que varía de forma continua.

Existen numerosos trabajos que describen la identificación de dichos *loci* y su relación con la variación fenotípica en el contenido de carotenoides del endospermo de los cereales (Wong *et al.*, 2004; Pozniak *et al.*, 2007; Chander *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2008; Salas-Fernández *et al.*, 2008). Las investigaciones a este nivel van más allá de la justificación del contenido global de carotenoides, identificándose QTL específicos para determinados carotenoides como luteína y  $\beta$ -caroteno. Salas-Fernández *et al.* (2008) detectan en sorgo cinco QTL sobre los cromosomas 1, 2, y 10 para  $\beta$ -caroteno. Howitt *et al.* (2009) identifican tres QTL para el contenido de luteína sobre los cromosomas 3B, 5B y 7A de trigo duro. Más recientemente, Blanco *et al.* (2011) obtienen en el mismo cereal QTL tanto para  $\beta$ - como  $\alpha$ -caroteno en los cromosomas 2A, 3B y 7A. En trigo los QTL más determinantes para el contenido en pigmentos han sido repetidas veces mapeados sobre los cromosomas 7A y 7B, tanto en trigo duro como harinero. Los genes que codifican para PSY1 (fitoeno sintasa, EC 2.5.1.32) generalmente cosegregan con esos QTL. Las variaciones alélicas de esos genes son numerosas y la aparición continua de nuevos alelos resulta muy probable. Esto demuestra un alto nivel de polimorfismo genético así como mucha genómica por explorar (Ravel *et al.*, 2013).

Una de las grandes estrategias en mejora vegetal es la búsqueda de nuevas fuentes de variación en especies relacionadas como *Lophopyrum ponticum* (Zhang *et al.*, 2005) y, *H. chilense* (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2011; Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012) en el caso de cereales. Los pequeños granos de *H. chilense* se caracterizan por tener un nivel de carotenoides alto, y presentar al menos dos *loci* para el contenido de pigmentos localizados en los cromosomas 2H<sup>ch</sup> y 7H<sup>ch</sup> (Álvarez, Martín y Martín, 1998, 1999; Atienza *et al.*, 2004, 2008). El conocimiento de la localización cromosómica de

estos genes fue primero estudiado por Álvarez, Martín y Martín (1998) usando líneas de adición de *H. chilense* en trigo. Estos autores localizaron genes responsables del nivel de pigmentos (medido como YPC) en *H. chilense* sobre el cromosoma 7 y mapearon este rasgo sobre el brazo  $\alpha$  de dicho cromosoma. Sin embargo, la posibilidad de la interacción entre genes de *H. chilense* y los del trigo duro en tritordeum, propició la búsqueda de nuevos *loci* en el genoma de esa especie. Posteriormente, mediante la construcción del primer mapa genético de *H. chilense*, (Hernández *et al.*, 2001), se identificó un nuevo QTL sobre el cromosoma 2 denominado *carot 1*, (Atienza *et al.*, 2004). Actualmente la generación de mapas de mayor cobertura para dicha especie con estos fines están ya disponibles (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2012) lo que genera una mayor probabilidad de encontrar regiones genómicas de interés en *H. chilense*.

Estos datos constituyen los primeros pasos hacia el desarrollo de un programa de MAS (*Marker Assisted Selection*, selección asistida por marcadores moleculares asociados al rasgo de interés) para el contenido de carotenoides en tritordeum, lo cual es interesante para la identificación y posterior transferencia de genes determinantes de un mayor contenido en carotenoides desde tritordeum a líneas de trigo sometidas a programas de mejora. De este modo, el anfiploide tritordeum también se convertiría en una especie útil para la mejora de cereales actuando como especie puente entre la cebada y el trigo (Álvarez, Martín y Martín, 1999; Martín *et al.*, 1999; Atienza *et al.*, 2005, 2007, 2007a).

Las líneas de tritordeum, independientemente del nivel de ploidía, muestran contenidos de carotenoides bastantes más altos que sus parentales de trigo (Atienza *et al.*, 2007). Debido a eso una de las líneas de investigación ha sido el estudio de la variación

genética de este rasgo en tritordeum y su relación con el nivel de pigmentos de ambas especies parentales, *H. chilense* y trigo duro. De estos estudios se desprende que aunque el genoma  $H^{ch}$  es claramente responsable de dicho nivel de pigmentos en tritordeum, pueden existir interacciones entre los sistemas genéticos de ambas especies parentales que no deben obviarse (Álvarez, Martín y Martín, 1999). Recientemente se realizó el primer análisis exhaustivo del perfil carotenoides de *H. chilense*, y se encontró que más de la mitad de la luteína presente estaba esterificada, siendo el patrón de esterificación similar al del anfiploide. Esto verifica lo comentado antes, de manera que el patrón de esterificación de tritordeum debe derivarse del fondo genético de esta cebada silvestre (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2015).

La utilidad de la ingeniería metabólica para mejorar la nutrición humana alcanza sus mejores propósitos en el campo de los alimentos básicos (*staple foods*), los cuales tienen un efecto importante en la nutrición de poblaciones con bajos recursos. La generación de nuevos cultivos con la etiqueta *Golden* como *Golden Potato* o *Golden Canola* son cada vez más numerosos sumándose al bien conocido *Golden Rice* (Beyer, 2010; Bai *et al.*, 2011). Es justamente el éxito de éste último caso el que ha impulsado los programas de manipulación de otras especies. La intensa investigación desde los primeros intentos realizados con dicho cultivo por Burkhardt *et al.* (1997) hasta los más recientes con la generación del *Golden Rice 2* (Paine *et al.*, 2005) ha proporcionado ideas estimulantes para tal fin. La expresión del gen *y1* de maíz en el endospermo

de trigos harineros hexaploides constituye un ejemplo (Cong *et al.*, 2009). El maíz también cuenta con algunos ensayos al respecto. La utilización mejorada del promotor  $\gamma$ -zein, (Marzábal *et al.*, 1998), altamente específico para la expresión en tejido endospermico (super  $\gamma$ -zein), se tradujo en un aumento de carotenoides totales de hasta 34 veces con una acumulación preferencial en el mismo de  $\beta$ -caroteno (Aluru *et al.*, 2008). Una estrategia más compleja fue la ideada por Zhu *et al.* (2008) mediante la generación de toda una batería de plantas transgénicas de maíz que resultaron de las múltiples combinaciones posibles derivadas de una transformación multigénica. Más recientemente, el aumento simultáneo en el contenido de tres vitaminas (vitaminas A, B y C) que implica la manipulación simultánea de tres rutas metabólicas distintas (Naqvi *et al.*, 2009), coloca al maíz como un cultivo prometedor para potenciar carotenoides provitamina A, ya que muestra menos restricciones que otros, como arroz o trigo (Wurtzel, Cuttriss y Vallabhaneni, 2012). Las investigaciones más recientes con *Golden Rice* se centran ahora en el estudio de la estabilidad y transferencia de los transgenes para la obtención de cultivares de arroz con un mayor rendimiento mediante introgresión y otras técnicas de mejora (Datta *et al.*, 2006, 2007). Otros granos minoritarios, como sorgo y mijo, pero también de gran importancia en poblaciones de bajos recursos, como la africana, están adaptándose cada vez más a estas técnicas y haciéndose un hueco en la biofortificación mediada por manipulación genética (O'Kennedy, Grootboom y Shewry, 2006; [www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx](http://www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx)).

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio se desarrolla en el marco de proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-14850\ALI), la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (P08-AGR-3477), y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Red IBERCAROT, ref. 112RT0445). Elena Mellado-Ortega ha disfrutado de una beca predoctoral del programa JAE del CSIC, cofinanciada por ESF.

## REFERENCIAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists), 2000. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Saint Paul: AACC.
- Abdel-Aal, E.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J. 2007. *Journal of Cereal Science* 55: 787-794.
- Abdul-Hamid, A., Sulaiman, R.R.R., Osman, A., Saari, N. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 627-637.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7825-7834.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2297-2306.
- Agrasys. <http://www.agrasys.es/es/index.html> [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Ahmad, F.T., Asenstorfer, R.E., Soriano, I.R., Mares, D.J. 2013. *Journal of Cereal Science* 58: 408-413.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K., Rodermeil, S. 2008. *Journal of Experimental Botany* 59: 3551-3562.
- Álvarez, J.B., Ballesteros, J., Arriaga, H.O., Martín, L.M. 1995. *Journal of Cereal Science* 23: 291-299.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M., Martín, A. 1998. *Plant Breeding* 117: 287-289.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M., Martín, A. 1999. *Plant Breeding* 118: 187-189.
- Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. 2014. *Trends in Analytical Chemistry* 56: 49-73.
- Andersen, M.L., Erichsen, H.R., Skibsted, L.H., Graversen, H.B., Rodrigues-Filho, U.P. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 494-498.
- Arvayo-Enríquez, H., Moncada-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., Rodríguez-Ramírez, R. 2013. *Analytical Methods* 5: 2916-2924.
- Arya, S.S., Parihar, D.B. 1981. *Food Nahrung* 25: 121-126.
- Atienza, S.G., Ramírez, C.M., Hernández, P., Martín, A. 2004. *Plant Breeding* 123: 303-304.
- Atienza, S.G. Avila, C.M., Ramírez, M.C., Martín, A. 2005. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 85-89.
- Atienza, S., Ballesteros, J., Martín, A., Hornero-Méndez, D. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4244-4251.
- Atienza, S.G., Martín, A.C., Ramírez, M.C., Martín, A., Ballesteros, J. 2007a. *Plant Breeding* 126: 5-8.
- Atienza, S.G., Martín, A., Pecchioni, N., Platani, C., Cattivelli, L. 2008. *Euphytica* 159: 325-331.
- Bai, C., Twyman, R.M., Farré, G., Sanahuja, G., Christou, P., Capell, T., Zhu, C. 2011. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 205-221.

## REFERENCIAS

- Ballesteros, J.B., Ramírez, M.C., Martínez, C., Atienza, S.G., Martín, A. 2005. *Crop Science* 45: 2662-2663.
- Bechoff, A., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M., Tomlins, K.I., Boulanger, R., Dufour, D., Westby, A. 2010. *Food Chemistry* 121: 348-357.
- Belefant-Miller, H., Grace, S.C. 2010. *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 358-363.
- Beleggia, R., Platani, C., Nigro, F., Cattivelli, L. 2010. *Journal of Cereal Science* 52: 106-110.
- Berardo, N., Brenna, O.V., Amato, A., Valoti, P., Pisacane, V., Motto, M. 2004. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 393-398.
- Berardo, N., Manzzinelli, G., Valoti, P., Lagaña, P., Redaelli, R. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2378-2384.
- Beyer, P. 2010. *New Biotechnology* 27: 478-481.
- Blanco, A., Colasuonno, P., Gadaleta, A., Mangini, G., Schiavulli, A., Simeone, R., Digesù, A.M., De Vita, P., Mastrangelo, A.M., Cattivelli L. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 255-264.
- Blessin, C.W., VanEtten, H., Wiebe, R. 1958. *Cereal Chemistry* 35: 359-365.
- Blessin, C.W. 1962. Carotenoids of corn sorghum: I. *Cereal Chemistry* 39: 236-242.
- Blessin, C.W., Brecher, J.D., Dimler, R. J. 1963. *Cereal Chemistry* 40: 582-590.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Fares, C., Platani, C., Di Fonzo, N. 2003. *Cereal Chemistry* 80: 225-231.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C., Troccoli, A. 2008. *Journal of Cereal Science* 48: 494-502.
- Britton, G. 1985. *Method Enzymology* 111: 113-149.
- Britton, G., Hornero-Méndez, D. 1997. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*,
- Britton, G., Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol. 5: Nutrition and Health*. Basilea: Birkhäuser.
- Burkhardt, P.K., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, A., Armstrong, G.A., Schledz, M., Lintig, J.V., Potrykus, I. 1997. *The Plant Journal* 11: 1071-1078.
- Burkhardt, S., Böhm, V. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8295-8301.
- Burt, A., Grainger, C., Young, J., Shelp, B., Lee, E. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8286-8292.
- Calucci, L., Capocchi, A., Galleschi, L., Ghiringhelli, S., Pinzino, C., Saviozzi, F., Zandomenoghi, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4274-4281.

## REFERENCIAS

- Carbonell, J.V., Piñaga, F., Yusá, V., Peña, J.L. 1986. *Journal of Food Engineering* 5: 179-193.
- Chander, S., Guo, Y.Q., Yang, X.H., Zhang, J., Lu, X. Q., Yan, J. B., Song, T.M., Rocheford, T.R., Li, J.S. 2008. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 223-233.
- Cheftel, J.C. 1986. *Food Chemistry* 20: 263-283.
- Chelowski, J. 1994. *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Developments in food Science*. Ámsterdam: Elsevier.
- Choi, Y., Jeong, H., Lee, J. 2007. *Food Chemistry* 103: 130-138.
- Clarke, F.R., Clarke, J.M., McCaig, T.N., Knox, R.E., Depauw, R.M. 2006. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 133-141.
- Cong, L., Wang, C., Chen, L., Liu, H., Yang, G., He, G. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8652-8660.
- Cristóbal, J.A.R. 1965. *Anales del Instituto de Investigaciones Veterinarias* 15: 85-92.
- Datta, K., Rai, M., Parkhi, V., Oliva, N., Tan, J., Datta, S.K. 2006. *Current Science* 91: 935-939.
- Datta, S.K., Datta, K., Parkhi, V., Rai, M., Baisakh, N., Sahoo, G., Rehana, S., Bandyopadhyay, A., Alamgir, M., Ali, M.S., Abrigo, E., Oliva, N., Torrizo, L. 2007. *Euphytica* 154: 271-278.
- De Oliveira, G., Rodriguez-Amaya, D. 2007. *Journal of Food Science* 72: S79-S85.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M.J. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4209-4216.
- Di Silvestro, R., Marotti, L., Bosi, S., Bregola, V., Segura-Carretero, A., Sedej, I., Mandic, A., Sakac, M., Benedettelli, S., Dinelli, G. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2800-2810.
- Digesù, A.M., Platani, C., Cattivelli, L., Mangini, G., Blanco, A. 2009. *Journal of Cereal Science* 50: 210-218.
- Doblado-Maldonado, A.F., Pike, O.A., Sweley J.C., Rose, D.J. 2012. *Journal of Cereal Science* 56: 119-126.
- Egesel, C.O., Wong, J.C., Lambert, R.J., Rocheford, T.R. 2003. *Crop Science* 43: 818-823.
- El-Agamey, A., McGarvey, D.J. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol 4: Natural Fuctions*. Basilea: Birkhäuser.
- Eversole, K., Feuillet, C., Mayer, K.F.X., Rogers, J. 2014. *Science* 18: 285-287.
- Fardet, A. 2010. *Nutrition Research Reviews* 23: 65-134.
- Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C. 2008. *Journal of Cereal Science* 48: 258-276.

## REFERENCIAS

- Fares, C., Codianni, P., Nigro, F., Platani, C., Scazzina, F., Pellegrini, N. 2008. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2435-2444.
- Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., Christou, P. 2010. *Plant Science* 179: 28-48.
- Farrington, F.F., Warwick, M.J., Shearer, G. 1981. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 948-950.
- Fernández-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L., Hornero-Méndez, D. 2013. *Food Chemistry* 141: 2864–2872
- Fish, W.W., Davis, A.R. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3582-3585.
- Fratianni, A., Irano, M., Panfili, G., Acquistucci, R. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2373-2378.
- Fratianni, A., Di Criscio, T., Mignogna, R., Panfili, G. 2012. *Food Chemistry* 131: 590-595.
- Frei, M., Becker, K. 2005. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2380-2384.
- Fu, B.X., Schlichting, L., Pozniak, C.J., Singh, A.K. 2013. *Journal of Cereal Science* 57: 560-566.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M.J. 1999. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1625-1634.
- Graham, R.D., Rosser, J.M. 2000. *Food & Nutrition Bulletin* 21: 404-409.
- Grand Challenges in Global Health. [www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx](http://www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx) [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Guzmán-Tello, R., Cheftel, J.C. 1990. *International Journal of Food Science & Technology* 25: 420-434.
- Harvestplus. Breeding Crops for Better Nutrition. <http://www.harvestplus.org/> [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., Abecassis, J. 2007. *Journal of Cereal Science* 46: 327-347.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bohm, V., Bitsch, R. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6663-6668.
- Hernández, P., Dorado, G., Prieto, P., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Laurie, D.A., Snape, J.W., Martín, A. 2001. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1259-1264.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., Piscozzi, R. 2006. *Journal of Cereal Science* 44: 182-193.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. 2008. *Food Chemistry* 107: 444-448.

## REFERENCIAS

- Hidalgo, A., Brandolini, A. 2008a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11300-11305.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Ratti, S. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6342-6348.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. 2010. *Food Chemistry* 121: 746-751.
- Howitt, C.A., Pogson, B.J. 2006. *Plant, Cell & Environment* 29: 435-445.
- Howitt, C.A., Cavanagh, C. R., Bowerman, A. F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J. L., ogson, B. J. 2009. *Functional & Integrative Genomics* 9: 363-376.
- Hu, Q.P., Xu, J.G. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2026-2033.
- Huber, L., George, S.A. 1993. En J. Cazes (ed.). *Diode array detection in HPLC, Chromatographic Science Series*, Nueva York, Basilea, Hong Kong, Marcel Dekker,
- Humphries, J.M., Graham, R.D., Mares, D.J. 2004. *Journal of Cereal Science* 40: 151-159.
- Ibrahim, K., Juvik, J. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4636-4644.
- ICC (International Association for Cereal Science and Technology), 1990. Method 152. Determination of the yellow pigment content of durum wheat semolina and flour.
- Jood, S., Kapoor, A.C. 1994. *Plant Foods for Human Nutrition* 46: 237-243.
- Juliano, B.O. 1994. En B.O. Juliano (ed.). *Rice: Chemistry and Technology*, Saint Paul: AACC.
- Kahlon, T.S., Chow, F.I., Hoefler, J.L., Betschart, A.A. 1986. *Cereal Chemistry* 63: 490-493.
- Kalt, W. 2005. *Journal of Food Science* 70: R11-R19.
- Kandlakunta, B., Rajendran, A., Thingnganing, L. 2008. *Food Chemistry* 106: 85-89.
- Kaneko, S., Oyanagi, A. 1995. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 2312-2313.
- Kaneko, S., Nagamine, T., Yamada, T. 1995. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 1-4.
- Kean, E.G., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2619-2626.
- Kean, E.G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9918-9926.
- Kean, E.G., Bordenave, N., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 450-459.

## REFERENCIAS

- Kim, J.K., Lee, S.Y., Chu, S.M., Lim, S.H., Suh, S., Lee, Y., Cho, H.S., Ha, S. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12804-12809.
- Koca, N., Burdurlu, H.S., Karadeniz, F. 2007. *Journal of Food Engineering* 78: 449-455.
- Konopka, I., Kozirok, W., Rotkiewicz, D. 2004. *Food Research International* 37: 429-438.
- Konopka, I., Czaplicki, S., Rotkiewicz, D. 2006. *Food Chemistry* 95: 290-300.
- Kurilich, A.C., Juvik, J.A. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1948-1955.
- Lachman, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z. 2013. *Journal of Cereal Science* 57: 207-214.
- Lamberts, L., Delcour, J.A. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11914-11919.
- Lavelli, V., Hidalgo, A., Pompei, C., Brandolini, A. 2009. *Journal of Cereal Science* 49: 319-321.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. 2006. *European Journal of Agronomy* 25: 170-176.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. 2006a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1710-1715.
- Lemmens, L., De Vleeschouwer, K., Moelants, K.R.N., Colle, I.J.P., Loey, A.M.V., Hendrickx, M.E. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6816-6824.
- Lepage, M., Sims, R.P.A. 1968. *Cereal Chemistry* 45: 600-604.
- Li, W., Beta, T. 2012. *Food Chemistry* 133: 782-786.
- Liaaen-Jensen, S., Lutnaes, B.F. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol 4: Natural Functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Lier, J.B., Lacroix, L.J. 1974. *Cereal Chemistry* 51:188-194.
- Lindley, M.G. 1998. *Trends in Food Science & Technology* 9: 336-340.
- Liu, R.H. 2007. *Journal of Cereal Science* 46: 207-219.
- Luterotti, S., Kljak, K. 2010. *Acta Chimica Slovenica* 57: 781-787.
- Luterotti, S., Marković, K., Franko, M., Bicanic, D., Madžgalj, A., Kljak, K. 2013. *Food Chemistry* 140: 390-387.
- Lv, J., Lu, Y., Niu, Y., Whent, M., Ramadan, M.F., Costa, J., Yu, L. 2013. *Food chemistry* 138: 454-462.
- Mace, E.S., Jordan, D.R. 2011. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 169-191.

## REFERENCIAS

- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. 2009. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: S194-S218.
- Mamatha, B., Sangeetha, R., Baskaran, V. 2011. *International Journal of Food Science and Technologies* 46: 315-323.
- Martín, A., Chapman, V. 1977. *Cereal Research Communications* 5: 365-368.
- Martín, A., Sánchez-Monge Laguna, E. 1982. *Euphytica* 31: 261-267.
- Martín, A., Álvarez, J.A., Martín, L.M., Barro, F., Ballesteros, J. 1999. *Journal of Cereal Science* 30: 85-95.
- Marzábal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D., Torrent, M. 1998. *The Plant Journal* 16: 41-52.
- McKeivith, B. 2004. *Nutrition Bulletin* 29: 111-142.
- Mellado-Ortega, E. 2013. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D. 2012. *Food Chemistry* 135: 1344-1352.
- Mellado-Ortega, E., Atienza, S.G. y Hornero-Méndez, D. 2015. *Journal of Cereal Science* 62: 134-142.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D. 2015. *Journal of Cereal Science* 62:15-21.
- Menkir, A., Maziya-Dixon, B. 2004. *Maydica* 49: 313-318.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Jarén-Galán, M., Gandul-Rojas, B., Hornero-Méndez, D., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L. 1997. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. 1994. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1551-1554.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Hornero-Méndez, D., Pérez-Gálvez, A. 2002. En W.J. Hurst. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press.
- Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., Yu, L. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6649-6657.
- Moros, E.E., Darnoko, D., Cheryan, M., Perkins, E.G., Jerrell, J. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5787-5790.
- Nakornriab, M., Sriseadka, T., Wongpornchai, S. 2008. *Journal of Food Lipids* 15: 488-503.
- Naqvi, S., Zhu, C., Farre, G., Ramessar, K., Bassie, L., Breitenbach, J., Conesa, D.P., Ros, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 7762-7767.

## REFERENCIAS

- Ndolo, V.U., Beta, T. 2003. *Food Chemistry* 139: 663-671.
- Nghia, P.T., Liem, D.T., Hai, T.V., Hoa, T.T. C. 2006. *Omonrice* 14: 18-27.
- Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M. 1999. *Trends in Food Science & Technology* 10: 94-100.
- O'Kennedy, M.M., Grootbooma, A., Shewry, P.R. 2006. *Journal of Cereal Science* 44: 224-235.
- O'Neil, C.A., Schwartz, S.J. 1992. *Journal of chromatography A* 624: 235-252.
- Okarter, N., Liu, C., Sorrells, M., Liu, R. 2010. *Food Chemistry* 119: 249-257.
- Oliver, J., Palou, A. 2000. *Journal of Chromatography A* 881: 543-555.
- Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S., Mukai, K. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9967-9978.
- Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggner, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A., Drake, R. 2005. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Panfili, G., Fratianni, A., Distaam, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6373-6377.
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. 2005. *Tecnica Molitoria* 5: 493-498.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A. K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Ollilar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S. 2009. *Nature* 457: 551-556.
- Patil, R.M., Oak, M.D., Tamhankar, S.A., Sourdille, P., Rao, V.S. 2008. *Molecular Breeding* 21: 485-496.
- Pinzino, C., Nanni, B., Zandomenighi, M. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1333-1339.
- Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R., Clarke, J.M. 2007. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 525-537.
- Quackenbush, F.W. 1963. *Cereal Chemistry* 40: 266-269.
- Quackenbush, F., Firch, J., Rouborn, W., Mcquistan, M., Petzold, E., Kargl, T. E. 1961. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9: 132-135.
- Ravel, C., Dardevet, M., Leenhardt, F., Bordes, J., Joseph, J.L., Perretant, M.R., Exbrayat, F., Poncet, C., Balfourier, F., Chanliaud, E., Charmet, G. 2013. *Molecular Breeding* 31: 87-99.

## REFERENCIAS

- Rivera, S., Canela, R. 2012. *Molecules* 17: 11255-11268.
- Rivera, S.M., Canela-Garayoa, R. 2012. *Journal of Chromatography A* 1224: 1-10.
- Rivera, S.M., Vilaró, F., Zhu, C., Bai, C., Farré, G., Christou, P., Canela-Garayoa. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5279-5285.
- Rivera, S.M., Christou, P., Canela-Garayoa, R. 2013. *Mass Spectrometry Reviews* 33: 353-372.
- Rizolo, A., Polesello, S. 1992. *Journal of Chromatography A* 624: 103-152.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1997. *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Arlington: Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI).
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2003. *Forum of Nutrition* 56: 35-37.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Gutierrez, N., Ávila, C.M., Martín, A., Atienza, S.G. 2011. *Plant Genetic Resources* 9: 313-316.
- Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S.G. 2012. *BMC Plant Biology* 12: 200-210.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Gutiérrez, N., Ávila, C.M., Machado, A., Huttner, E., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Castillo, A., Kilian, A., Martín, A., Atienza, S.G. 2012. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 713-722.
- Salas-Fernandez, M.G., Hamblin, M.T., Li, L., Rooney, W.L., Tuinstra, M.R., Kresovich, S. 2008. *Crop Science* 48: 1732-1743.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M. 2000. *Journal of Chromatography A* 880: 189-202.
- Santra, M., Rao, V.S., Tamhankar, S.A. 2003. *Cereal Chemistry* 80: 130-131.
- Santra, M., Santra, D.K., Rao, V.S., Taware, S.P., Tamhankar, S.A. 2005. *Euphytica* 144: 215-221.
- Saxena, A., Maity, T., Raju, P.S., Bawa, A. S. 2012. *Food and Bioprocess Technology* 5: 672-679.
- Scott, C., Eldridge, A. 2005. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 551-559.
- Selim, K., Tsimidou, M., Biliaderis, C.G. 2000. *Food Chemistry* 71: 199-206.
- Sellappan, K., Datta, K., Parkhi, V., Datta, S. 2009. *Plant Science* 177: 557-562.
- Selman, J.D. 1994. *Food Chemistry* 49: 137-147.
- Serpen, A., Gökmen, V., Karagöz, A., Köksel, H. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7285-7292.

## REFERENCIAS

- Sharma, S.K., Le Maguer, M. 1996. *Food Research International* 29: 309-315.
- Siebenhandl, S., Grausgruber, H., Pellegrini, N., Del Río, D., Fogliano, V., Pernice, R., Berghofer, E. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8541-8547.
- Singh, S., Gamlath, S., Wakeling, L. 2007. *International Journal of Food Science & Technology* 42: 916-929.
- Suryanarayana Rao, K., Rukmini, C., Mohan, V. S. 1968. *Indian Journal of Agricultural Science* 38: 368-372.
- Tan, J., Baisakh, N., Oliva, N., Parkhi, V., Rai, M., Torrizo, L., Datta, K., Datta, S.K. 2005. *International Journal of Food Science & Technologies* 40: 563-569.
- Taungbodhitham, A.K., Jones, G.P., Wahlquist, M.L., Briggs, D.R. 1998. *Food Chemistry* 63: 577-584.
- Tee, E., Lim, C. 1991. *Food Chemistry* 41: 147-193.
- Tonon, R.V., Baroni, A.F., Hubinger, M.D. 2007 *Journal of Food Engineering* 82: 509-517.
- Trono, D., Pastore, D., Di-Fonzo, N. 1999. *Journal of Cereal Science* 29: 99-102.
- Tsimidou, M. 1997. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2890-2898.
- Van Breemen, R.B. 1997. *Pure and Applied Chemistry* 69: 2061-2066.
- Van Breemen, R.B., Dong, L., Pajkovic, N.D. 2012. *International Journal of Mass Spectrometry* 312: 163-172.
- Van Hung, P., Hatcher, D.W. 2011. *Food Chemistry* 125: 1510-1516.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Wagner, L.A., Warthesen, J.J. 1995. *Journal of Food Science* 60: 1048-1053.
- Weber, E.J. 1987. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 8: 1129-1134.
- Werner, S., Böhm, V. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1163-1170.
- Wong, J.C., Lambert, R.J., Wurtzel, E.T., Rocheford, T.R. 2004. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 349-359.
- Wurtzel, E.T., Cuttriss, A., Vallabhaneni, R. 2012. *Frontiers in Plant Science* 3(29): 1-12.
- Xu, J., Hu, Q., Wang, X., Luo, J., Liu, Y., Tian, C. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5751-5756.

## REFERENCIAS

- Zepka, L.Q., Borsarelli, C.D., Azevedo, M.A., Da Silva, P., Mercadante, A.Z. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7841-7845.
- Zhang, W., Lukaszewski, A.J., Kolmer, J., Soria, M.A., Goyal, S., Dubcovsky, J. 2005. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 573-582.
- Zhou, K., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1112-1117.
- Zhou, K., Yu, L. 2004a. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 37: 717-721.
- Zhou, K., Laux, J.J., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1118-1123.
- Zhou, K., Su, L., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6108-6114.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., Capell, T. 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 18232-18237.
- Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G., Janković, M., Gökmen, V. 2012. *Journal of Cereal Science* 56: 562-568.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado en el marco de proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-14850\ALI), Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014- 53195R), la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía 41 (P08-AGR-3477), y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Red IBERCAROT, ref. 112RT0445). Elena Mellado-Ortega ha disfrutado de una beca predoctoral del programa JAE del CSIC, cofinanciada por ESF.

# CAROTENOIDES HIDROFÍLICOS DEL AZAFRÁN

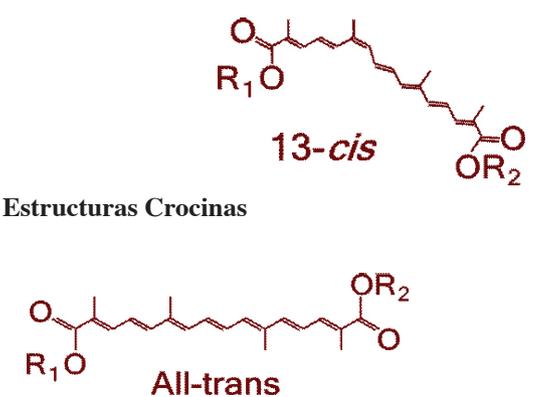
María del Valle García-Rodríguez, María José Bagur,  
M. Rosario Salinas y Gonzalo L. Alonso



## ESTRUCTURA Y NOMBRE

El carotenoide mayoritario del azafrán fue aislado por primera vez por Aschoff en 1818, lo llamó crocina, derivado de la palabra "crocus", que significa azafrán en alemán. Decker (1914) demostró su naturaleza glucosídica y Karrer y Salomon (1928 y 1928a) establecieron su estructura y fórmula molecular. El nombre según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es Bis[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-({[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il]oxi)metil]tetrahydro-2H-piran-2-il] (2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetrametil-2,4,6,8,10,12,14-hexadecaheptaenedioato. Es un derivado glucosídico del carotenoide dicarboxílico crocetina que ha recibido distintos nombres en la bibliografía científica: alpha-crocin, gardenia yellow, crocin 1, saffron, crocetin digentiobiose ester, crocetin bis(gentiobiosyl) ester (Pubchem, 2015); también se ha denominado digentiobiosyl 8,8'-diapo-carotene-8,8'-dioate (IUPAC, 1974) e incluso con otros nombres. Esto

Tabla 1. Nomenclatura de los ésteres glucosídicos de crocetina. Características espectrométricas

Estructuras Crocinas																Compartimiento en cromatografía y espectrometría		
				Ichi y col. 1995	Tarantilis y col. 1995	Pfister y col. 1996	Straubinger y col. 1998	Van Calsteren y col. 1997	Knapp y col. 2002	Carmona y col. 2005	Carmona y col. 2006				TR (min)	Patrón de fragmentación ES+	UV-visible (max)	
número glucosas (R1+R2)	Distribución glucosas (R1/R2)	Isómeros	Nombrados como	Gj	Cs	Gj	Cs	Cs	Gj	Cs	Gj	Cs	Cs	Gj	TR (min)	Patrón de fragmentación ES+	UV-visible (max)	
5	trig/gen	<i>trans</i>	<i>trans</i> -5-tG										X	X	8.2	592(100), 675(35), 837(21), 1161(40)	258, 444, 467	
5		<i>cis</i>	<i>cis</i> -5-tG										X	X	10.0	592(100), 675(12), 1161(25)	263, 349, 444, 468	
5	nea/gen	<i>trans</i>	<i>trans</i> -5-nG		X		X						X	X	9.7	592(62), 797(100), 1161(30)	264, 422sh, 467sh, 440	
5		<i>cis</i>	<i>cis</i> -5-nG		X								X	X	12.2	592(6), 635(100), 1161(15)	263, 327, 412, 434	
4	nea/glu	<i>trans</i>	<i>trans</i> -4-ng										X	X	10.8	635(100), 817(21), 999(28)	252, 422sh, 440	
4		<i>cis</i>	<i>cis</i> -4-ng										X	X	12.9	635(100), 797(18), 999(52)	246, 326, 424, 437sh	
4	gen/gen	<i>trans</i>	<i>trans</i> -4-GG		X	X		X	X	X	X	X	X	X	10.3	511(22), 999(100)	262, 442, 465	
4		<i>cis</i>	<i>cis</i> -4-GG		X	X				X	X	X	X	X	12.6	511(32), 999(100)	264, 327, 434, 457	
3	gen/glu	<i>trans</i>	<i>trans</i> -3-Gg	X	X			X	X	X		X	X	X	11.0	329(17), 675(14), 837(100)	262, 442, 465	
3		<i>cis</i>	<i>cis</i> -3-Gg		X					X		X	X	X	13.4	543(24), 675(15), 837(100)	259, 327, 434, 457	

número glucosas (R1+R2)	Distribución glucosas (R1/R2)	Isómeros	Nombrados como	Gj	Cs	Gj	Cs	Cs	Gj	Cs	Gj	Cs	Cs	Gj	TR (min)	Patrón de fragmentación ES+	UV-visible (max)
2	gen/-	<i>trans</i>	<i>trans</i> -2-G	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	13.7	513(25), 675(100)	260, 434, 457
2		<i>cis</i>	<i>cis</i> -2-G	X				X					X	X	15.9	513(100)	260, 324, 432, 452
2	glu/glu	<i>trans</i>	<i>trans</i> -2-gg	X	X			X		X		X	X		11.8	675(100)	262, 440, 464
2		<i>cis</i>	<i>cis</i> -2-gg			X		X					X	X	15.7	675(100)	260, 326, 430, 452
1	glu	<i>trans</i>	<i>trans</i> -1-g	X	X			X	X				X	X	15.0	675(100)	261, 433, 458
1		<i>cis</i>	<i>cis</i> -1-g	X													

Fuente: Carmona *et al.* (2006).

aunado a que se han detectado otros glucósidos derivados del carotenoide crocetina en sus formas *todo-trans* y *13cis* en azafrán y gardenia (Tarantilis, Tsoupras y Polissiou, 1995; Pfister *et al.*, 1996) ha provocado que no quede claro para el lector cuáles son los compuestos objeto de estudio en muchos trabajos científicos. Con el fin de aclarar esta confusión generalizada en el ámbito científico Carmona *et al.* (2006) aportaron una forma simplificada de nombrar los ésteres glucosídicos del carotenoide crocetina. En la tabla 1 se expone esta forma de nombrar cada uno de los ésteres glucosídicos de crocetina detectados hasta la fecha en azafrán y en gardenia. En la bibliografía, cuando se habla del conjunto de estos compuestos, se les llama crocinas, aunque es más correcto denominarlos ésteres glucosídicos de crocetina.

## ÉSTERES GLUCOSÍDICOS DE CROCETINA Y CALIDAD DEL AZAFRÁN

El azafrán son los estigmas desecados de la flor de *Crocus sativus* L. y es una especia muy valorada por ser la única en aportar color, sabor y aroma a aquellas comidas o bebidas a las que se añade. Debido a sus atributos organolépticos únicos y a la dificultad de su cultivo, recolección y manipulación, tiene un alto valor y está considerada como la especia más cara del mundo. Por este motivo y debido a su color, se le conoce con el nombre de "oro rojo".

Se considera que un azafrán tiene mayor calidad cuanto mayor es la concentración de las sustancias responsables de conferir color, sabor y aroma. Además, la calidad del producto también se define por la ausencia de otras sustancias, como colorantes alimentarios o no y por el menor contenido posible de ciertos elementos como restos florales, tierra, insectos, etc. Entre todos los parámetros que definen la calidad del azafrán, en este

capítulo trataremos únicamente los ésteres glucosilados de crocetina, que son los pigmentos responsables del color que tiene y que proporciona.

Desde antiguo y hasta casi nuestros días, las distintas calidades del azafrán se establecían de manera subjetiva por su aroma, tamaño y por la intensidad y firmeza del color (Carmona *et al.*, 2006). Con el paso del tiempo se han desarrollado métodos analíticos que permiten realizar una clasificación del azafrán bajo criterios objetivos y estandarizados. Algunos países cuentan con su propia legislación en materia de calidad del azafrán, pero su aplicación es de ámbito nacional. Sin embargo, existe una norma de la Organización Internacional de Normalización para el azafrán (ISO3632 partes 1 y 2, 2011), donde se detallan las especificaciones y la metodología de análisis para la clasificación de azafrán en tres categorías diferentes. Esta norma es la más exhaustiva con respecto a los parámetros exigidos, por lo que se emplea para certificar el azafrán en casi todas las transacciones comerciales internacionales. En la mayoría de los países es una norma voluntaria y, por lo tanto, los comercializadores no están obligados a cumplirla, pero existe un interés a nivel mundial para que su uso se extienda y evitar la presencia de azafranes adulterados o de muy baja calidad en el mercado. Esta norma clasifica el azafrán en tres categorías según una serie de parámetros físicos y químicos: características microscópicas, presencia de restos florales y materia extraña, humedad y contenido en compuestos volátiles, contenido en cenizas,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  257 nm,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  330 nm y  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  440 nm (poder colorante) y otros parámetros químicos de menor importancia. Tradicionalmente los tres últimos parámetros han hecho referencia al contenido en picrocrocina, safranal y ésteres glucosídicos de crocetina, compuestos asociados con el sabor, el aroma y el color respectivamente. La norma

ISO3632 (2011) propone la determinación de estos tres parámetros a partir de las absorbancias a 257, 330 y 440 nm del extracto acuoso (1:2000 masa/volumen) del azafrán previamente molido y tamizado. En el caso de los ésteres de crocetina el método es adecuado para la determinación del conjunto de estos carotenoides, pero no permite una cuantificación pormenorizada de los presentes en la muestra. Respecto a la determinación de picrocrocina y safranal son muchos los trabajos que han demostrado que este método no es adecuado (Tarantilis, Polissiou y Manfait, 1994; Alonso *et al.*, 1996; García-Rodríguez *et al.*, 2014). Hasta el momento, en la práctica la calidad comercial de un azafrán no adulterado queda determinada por su poder colorante, atributo por el cual se realizan la mayoría de las transacciones comerciales, las demás características están subordinadas al color.

En los últimos años ha aumentado también el interés por garantizar y defender la calidad del azafrán producido históricamente en determinadas regiones. Como resultado, existen seis Denominaciones de Origen Protegidas, DOP, en Europa: “Krokos Kozanis” en Grecia (DOCE, 1999), “Azafrán de La Mancha” en España (DOCE, 2001), “Zafferano dell’Aquila” (DOCE, 2005), “Zafferano di San Gimignano” (DOCE, 2005) y “Zafferano di Sardegna” (DOCE, 2009) en Italia y “Munder Safran” en Suiza.

La calidad final de la especia, y por lo tanto el contenido de ésteres de crocetina, se ve influida por aspectos relacionados con el cultivo, recolección, manipulación y conservación de la especia. La recogida de la flor debe realizarse con la flor cerrada, así el estigma está protegido por los tépalos durante el transporte y manejo de la flor; además, los ésteres de crocetina son fotosensibles y de esta manera permanecerán protegidas de la luz. La “monda” es el proceso mediante el cual se separa

el estigma del resto de la flor, esta separación debe realizarse por el lugar adecuado, eliminando la mayor parte posible de estilo pero evitando que se separen los tres filamentos que forman el estigma, puesto que el azafrán resultante tendría menor contenido de ésteres de crocetina y menor poder colorante al existir un exceso de estilo no teñido por las crocinas. La deshidratación se considera el proceso con mayor influencia en la calidad final del azafrán. Al igual que los anteriores, se lleva a cabo de forma distinta en los diferentes países productores; en países como Irán, India o Marruecos la deshidratación se produce generalmente a temperatura ambiente, en Grecia a temperatura media, y en Italia y España el estigma es sometido a temperaturas elevadas mediante flujos de aire caliente o colocándolo sobre una fuente de calor sobre un cedazo harinero con tela de seda. Comercialmente se sabe que la aplicación de altas temperaturas durante la deshidratación está directamente relacionada con la mayor estabilidad del poder colorante y, en consecuencia, de los ésteres de crocetina, y con un mejor sabor y aroma. Respecto al envasado, ya que los ésteres de crocetina son sensibles a la luz, el azafrán debería empaquetarse en envases que no fueran transparentes para evitar la pérdida de poder colorante. En cuanto a las condiciones de conservación, se considera que esta especia debe almacenarse a baja temperatura, baja humedad relativa ambiental y baja actividad del agua. Los trabajos de algunos autores sugieren que el azafrán no debería almacenarse más de un año, y debería consumirse en el periodo entre cosecha y cosecha, que es cuando más satisfacción da al consumidor (Raina *et al.*, 1996).

## DETERMINACIÓN DE LOS ÉSTERES GLUCOSÍDICOS DE CROCETINA

### Extracción y análisis

Desde que se despertó el interés por conocer objetivamente la calidad de los productos alimentarios y en concreto por el azafrán, comenzaron a desarrollarse numerosos métodos de extracción y análisis para separar, identificar y cuantificar los ésteres de crocetina. Estos métodos aparecen principalmente para poder clasificarlo en diferentes categorías.

La extracción de los principales compuestos del azafrán se ve influida por factores como el tiempo, la temperatura, el extractante, la técnica empleada y si la muestra se encuentra en hebra o molida. Una gran variedad de disolventes polares y no polares, así como sus mezclas, se han utilizado para la extracción de los carotenoides del azafrán. Generalmente, en términos analíticos, la extracción se lleva a cabo según la norma ISO3632 (2011), mediante agitación magnética de una suspensión acuosa de azafrán molido y tamizado, durante una hora y protegido de la luz (Corradi y Micheli, 1979). Algunos estudios han demostrado que la presencia de etanol o metanol como extractante aumenta los valores de poder colorante (Orfanou y Tsimidou, 1995). Se han obtenido los mejores resultados cuando la extracción con etanol:agua (50:50) se realiza a 25 °C durante una hora en agitación y protegido de la luz (Lozano *et al.*, 1999). Kyriakoudi *et al.* (2012) propusieron una extracción de crocinas asistida por ultrasonidos con el objetivo de reducir tiempo y costos; en este trabajo se seleccionaron las mejores condiciones y se compararon de forma equivocada con la extracción según la norma ISO3632 (2011).

El método desarrollado por Corradi y Micheli (1979) se basa

en medidas de absorbancia a 440 nm por espectrofotometría UV-visible de un extracto acuoso de azafrán, pues alrededor de esta longitud de onda los ésteres glucosídicos de crocetina presentan un máximo de absorción (tabla 1). Con este análisis se puede determinar el total de estos carotenoides y el poder colorante (440 nm) que está relacionado con su contenido, pero no es posible la separación, identificación y cuantificación de cada uno de los distintos ésteres glucosídicos de crocetina. Para ello, se desarrollaron métodos basados en cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-visible (HPLC-UV-visible) (Pfander y Wittwer, 1975; Speranza *et al.*, 1984), en cromatografía de capa fina (TLC) (Sujata, Ravishankar y Venkataraman, 1992) y en HPLC con detectores de diodos alineados y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS) (Tarantilis, 1995; Carmona *et al.*, 2006) que permitieron la separación e identificación de los distintos ésteres de crocetina presentes en el azafrán. Su cuantificación ha sido bastante compleja debido a la no disponibilidad de estándares comerciales (Sánchez *et al.*, 2008) y al fenómeno de autoagregación molecular que ocurre en sus diluciones acuosas concentradas. En el último año, estos inconvenientes han sido solventados y actualmente la cuantificación de los ésteres de crocetina se lleva a cabo con la existencia de patrones comerciales de alta pureza en su forma *trans*, *trans*-4-GG y *trans*-3-Gg éster de crocetina (García-Rodríguez *et al.*, 2014). La utilización de métodos adecuados para la determinación de poder colorante tiene gran interés en la industria alimentaria, pero la identificación y cuantificación de los ésteres de crocetina de una forma individualizada en el azafrán actualmente tiene gran interés para la industria farmacéutica, ya que se han demostrado numerosas aplicaciones biomédicas. Hay varias patentes y publicaciones que aíslan los ésteres de crocetina a partir de azafrán o *Gardenia jasminoides* (Escribano *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004; Hadizadeh, Mohajeri y Seifi, 2010).

El contenido de los ésteres glucosídicos de crocetina en la especia varía según la calidad, pero los azafranones que tiene mayor concentración de estos compuestos llegan a alcanzar porcentajes muy elevados, entre 25 y 35% en masa de azafrán deshidratado (García-Rodríguez *et al.*, 2014). Esta alta concentración de carotenoides y, por lo tanto, de una posible alta capacidad antioxidante, hace que esta especia haya sido usada a lo largo de la historia por sus propiedades bioactivas como un fármaco. Este aspecto se aborda más adelante.

## Agregación molecular

La idea de una posible agregación molecular de los ésteres glucosídicos de crocetina surge a partir del hecho de que un pool de ésteres de crocetina aislados, con una pureza aproximada de 94%, presentaba el mismo poder colorante que una muestra de azafrán, sabiendo que una muestra de azafrán tiene un contenido de crocinas del 25-28% (Serrano-Díaz *et al.*, 2011). Esto podría deberse a la agregación entre ésteres de crocetina o a la interacción de otros compuestos presentes en el azafrán con los ésteres de crocetina. Este tipo de interacción se denomina copigmentación (Boulton, 2001), fenómeno que fue estudiado por primera vez en los tejidos de las plantas (Asen, Stewart y Norris, 1972), y también muy estudiado en vinos (Escribano-Bailón y Santos-Buelga, 2012; Lorenzo *et al.*, 2005). Los carotenoides, incluidos los ésteres de crocetina, tienen una zona plana apolar y alta densidad de electrones  $\pi$  en el centro de su molécula, por la cual puede asociarse con otros compuestos por interacciones  $\pi$ - $\pi$  como ocurre con los antocianos de plantas y vinos.

Naess *et al.* (2006) demostraron mediante UV-visible que la crocina 1 (*trans*-4-GG éster de crocetina) en dilución acuosa, con una concentración superior a 800 mg/L, formaba

agregados moleculares y que con el tiempo éstos aumentaban de tamaño. Identificaron dos formas de agregados, los tipo H en los que cuatro moléculas de *trans*-4-GG éster de crocetina se unen por la parte apolar de la molécula en forma de H y los agregados tipo J, en los que las moléculas de *trans*-4-GG éster de crocetina se unen de la cabeza a la cola. Según estos autores un agregado en forma de H, cuatro moléculas, tiene la misma absorptividad (coeficiente de extinción) molar a 440 nm que una única molécula, por este motivo el poder colorante de un pool de crocinas aisladas no es superior al de una muestra de azafrán. Este fenómeno también se trató de explicar mediante la posible interacción de otros compuestos presentes en el azafrán con los ésteres de crocetina. Serrano *et al.* (2011) estudiaron el efecto hipercrómico de otros compuestos solubles en agua presentes en el azafrán, tales como picrocrocina y kaempferol-3-O-glucósido, sobre su poder colorante, observando que estas moléculas provocaban ligeros aumentos de poder colorante, pudiendo haber una interacción  $\pi$ - $\pi$ , pero el incremento no fue suficiente para explicar que el pool tenga el mismo poder colorante que una muestra de azafrán.

## ESTABILIDAD Y TERMODEGRADACIÓN

A partir de una apropiada recolección y monda y, sobre todo, de un adecuado proceso de deshidratación, se puede obtener un azafrán de alta calidad. Sin embargo esta calidad inicial se deteriora progresivamente durante su almacenamiento. Se han llevado a cabo numerosos estudios cinéticos, para determinar las mejores condiciones de conservación de esta especia, concluyendo que el almacenamiento deber llevarse a cabo en oscuridad, atmósfera inerte, baja actividad del agua (<0.43) y temperatura inferior a 25 °C (Morimoto *et al.*, 1994; Tsimidou y Billaderis, 1997). El parámetro que más influye en la estabilidad

de los ésteres glucosídicos de crocetina es la humedad, contrariamente a lo que ocurre con otros carotenoides de otras especias, como los del pimentón (Alonso *et al.*, 1993).

La pérdida de poder colorante sigue una cinética de primer orden y su estabilidad aumenta en entorno ácido y en presencia de aditivos conservantes y antioxidantes como el ácido ascórbico en combinación con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Alonso *et al.*, 1993; Tsimidou y Tsatsaroni, 1993; Orfanou y Tsimidou, 1995). La mayoría de estos estudios han determinado la degradación de los ésteres de crocetina basándose en los cambios en el poder colorante determinado según norma ISO3632 (2011), por lo que estos valores reflejan el resultado total de la degradación de los ésteres de crocetina, pero no indican nada sobre los cambios que sufre cada uno de ellos.

Carmona *et al.* (2005) estudiaron la evolución individual de los principales ésteres de crocetina en muestras de azafrán deshidratado mediante un procedimiento de envejecimiento acelerado, demostrando que la proporción de *trans*-4-GG se incrementaba después de un tratamiento térmico (dos horas a 50 °C y cuatro horas a 70 °C) comparado con una muestra de azafrán inicial. Estos resultados indican que se podría aumentar el poder colorante de un azafrán ya deshidratado al someterlo a un segundo tratamiento térmico. Así, tradicionalmente los cocineros calientan la especia antes de utilizarla con el objeto de obtener más color. Lo que no se ha estudiado todavía es la estabilidad en el tiempo de este color adicional generado (Carmona *et al.*, 2005).

Sánchez *et al.* (2008) llevaron a cabo un estudio sobre la cinética de degradación de cada uno de los ésteres de crocetina en extractos acuosos de azafrán, cuando se

sometían a tratamiento térmico en oscuridad, obteniéndose una cinética de primer orden para la degradación de los ésteres de crocetina. Maggi *et al.* (2009) encontraron que la adición de propilparabén (200 mg/l) estabilizaba los extractos acuosos de azafrán en la realización de series automatizadas de análisis.

También se han llevado a cabo estudios cinéticos sobre la degradación de ésteres de crocetina encapsulados en diferentes matrices (pululano y polivinilpirrolidona), pero aunque los resultados no fueron concluyentes, se observó que la encapsulación mejoraba en gran medida la estabilidad de estos carotenoides ante la oxidación (Selim, Tsimidou y Biliaderis, 2000).

El efecto de la temperatura sobre los ésteres de crocetina se ha presentado antes como negativo, sin embargo algunos estudios han demostrado resultados beneficiosos en algunos casos. Se ha estudiado la influencia del proceso de deshidratación en el contenido de estos ésteres, concluyendo que no son tan sensibles a la temperatura como se podía esperar de un carotenoide, y que su presencia es mayor cuanto más elevada es la temperatura durante el proceso de deshidratación (Carmona, Zalacaín y Alonso, 2006, Gregory, Menary y Davies, 2005).

También se ha estudiado la generación de aromas del azafrán a partir del calentamiento de ésteres de crocetina. El safranal (2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxialdehído) es el principal responsable del aroma del azafrán, es una sustancia que no se ha detectado en los estigmas recién separados de la flor, sino que aparece posteriormente durante la manipulación, deshidratación y almacenamiento (Cadwallader, 2002). La hipótesis más generalizada sobre la generación de los principales compuestos del azafrán propone que una

ruptura enzimática oxidativa del carotenoide zeaxantina y su posterior glucosilación proporciona ésteres de crocetina y picrocrocina (Khun y Winterstein, 1934; Frusciante *et al.*, 2014). La picrocrocina es la sustancia responsable de sabor amargo del azafrán, y cuando se produce su hidrólisis y posterior eliminación de agua se obtiene safranal. Carmona, Zalacaín y Alonso (2006) propusieron una nueva teoría para la formación de safranal; para ello estudiaron la generación de compuestos volátiles a partir de un pool de *trans* y *cis* ésteres de crocetina sometido a degradación por tratamiento térmico. En estos estudios quedó de manifiesto la capacidad de generar safranal, confirmándose de esta manera un nuevo mecanismo para la formación de aromas de la especia.

## ASPECTOS NUTRICIONALES DEL AZAFRÁN

El Código Alimentario Español (CAE) define al azafrán como "la especia constituida por los estigmas desecados del *Crocus sativus*, L., con las tolerancias máximas de estilos y restos florales que se especifiquen para las diversas calidades de la reglamentación correspondiente. No sobrepasará las cifras máximas siguientes: humedad y materias volátiles, 15%; sílice, 2%; fibra bruta, 6%; extracto etéreo, entre 34 y 145 por 1000".

La composición química del azafrán ha sido estudiada en detalle por distintos autores. Su análisis químico ha mostrado la presencia de más de 150 componentes en los estigmas de azafrán (Samarghandian, Azimi-Nezhad y Samini, 2014). Además de sus tres tipos de compuestos principales, ésteres de crocetina, picrocrocina y safranal, en el azafrán hay presencia de otros carotenoides, carbohidratos, fibra cruda, proteínas, grasas, antocianos, flavonoides, vitaminas

(riboflavina y tiamina), minerales y muchos otros elementos que confieren propiedades nutricionales y beneficiosos para la salud (Serrano-Díaz *et al.*, 2013; Alavizahed y Hosseinzadeh, 2014). Ya comentamos cómo se valora la calidad del azafrán, pero ninguno de los parámetros nutricionales se utiliza en la determinación de su calidad comercial.

El uso más importante del azafrán es alimentario, siendo valorado como colorante, saborizante y aromatizante en la elaboración de algunos platos tradicionales. Aparte de su valor como alimento, el azafrán ha sido utilizado tradicionalmente como una planta medicinal por sus propiedades terapéuticas (Ulbricht *et al.*, 2011) que pueden deberse a la crocetina, a sus ésteres glucosídicos o al safranal.

## BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE ÉSTERES DE CROCETINA

La bioaccesibilidad de un compuesto químico de un alimento se puede definir como la cantidad o fracción del mismo que se libera de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y se convierte en disponible para la absorción (Saura-Calixto, Serrano y Goñi, 2007; Heaney, 2001). El concepto de biodisponibilidad se refiere a la proporción de un nutriente contenido en un alimento que es absorbido para su utilización y almacenamiento por el organismo (Granado *et al.*, 2006). Más información sobre estos conceptos se proporciona en el capítulo 26.

La farmacocinética de los carotenoides más extendidos en la naturaleza es conocida. Éstos, tras liberarse de su matriz alimentaria, se absorben por la mucosa intestinal, siendo incorporados a los quilomicrones y posteriormente secretados

al torrente sanguíneo (Erdman, Bierer y Gugger, 1993; Parker, 1996).

Los carotenoides mayoritarios del azafrán presentan la peculiaridad de su hidrosolubilidad debido a que son ésteres glucosídicos. Aunque muchos estudios demuestran sus diversas actividades biológicas en humanos, la forma de administración, la absorción y el metabolismo de estos carotenoides está aún por resolverse (Chryssanthi *et al.*, 2011).

La farmacocinética de la crocetina ha sido evaluada en modelos animales (Zheng *et al.*, 2005; He *et al.*, 2014) y en plasma humano (Umigai *et al.*, 2011). Asimismo, hay métodos para desarrollar y validar de forma rápida y sensible la crocetina en el suero humano como el propuesto por Mohamadpour *et al.* (2013). A diferencia de otros carotenoides, la crocetina se absorbe mucho más rápidamente detectándose en el plasma a la hora de ser administrada, alcanzando un máximo alrededor de las 4 h. Los estudios farmacocinéticos realizados en otros carotenoides C40, como caroteno, luteína y licopeno, ponen de manifiesto que tras la administración oral necesitan más tiempo para alcanzar las concentraciones máximas (Umigai *et al.*, 2011). Estas diferencias se podrían explicar porque la crocetina es más hidrofílica y de menor tamaño que los otros carotenoides. Según Asai *et al.* (2005), en un estudio hecho en animales, la mayor velocidad de absorción de la crocetina se debe a que el transporte es a través de la vena porta al torrente sanguíneo.

Hay evidencias de que las especies reactivas de oxígeno generadas por el ejercicio muscular son una de las causas de la fatiga física (Alessio, 1993; Tanskanen, Atalay y Uusitalo, 2010). Mizuma *et al.* (2009) estudiaron el efecto antifatiga de la crocetina y comprobaron que se mejora el rendimiento por la

ingesta de ésta cuatro horas antes de realizar una tarea física que induce fatiga.

Kanakis *et al.* (2007) estudiaron en humanos la interacción de la crocetina con la albúmina de suero y demostraron que la interacción proteína-ligando es una unión débil, y por esta razón la crocetina tiende a distribuirse fácilmente en los tejidos del cuerpo. Se evidenció además que la farmacocinética de la crocetina era proporcional a la dosis (Umigai *et al.*, 2011). Estos estudios ponen de manifiesto que tras el pico de crocetina, las concentraciones plasmáticas muestran un descenso lento hasta su eliminación, llegando al límite de detección de crocetina a las 24 h para todas las dosis ensayadas.

La rápida absorción de crocetina podría relacionarse con sus actividades farmacológicas. Por ello se precisan nuevos estudios para comprender el comportamiento fisiológico de estos compuestos después de la ingestión oral, así como su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Además, el estudio de su metabolismo y biodisponibilidad es fundamental para determinar el perfil farmacológico y toxicológico de estos compuestos. Para los estudios de biodisponibilidad se han usado la especia completa, extractos que contienen algunos compuestos o bien compuestos obtenidos por síntesis química. Aunque existen estudios sobre la farmacocinética de crocinas administradas por vía oral, no hay estudios que determinan la farmacocinética del azafrán especia. Se observa en la mayoría de las publicaciones que estudian la bioactividad del azafrán una falta de caracterización de la muestra de partida, por lo que se desconoce el contenido de sus metabolitos principales. También se aprecian carencias en los métodos de preparación de las distintas formas de administración del azafrán, así como en la obtención de los principios activos, cuestión de gran importancia pues, muy probablemente, afecta la absorción

de sus metabolitos. En este sentido puede decirse que serán necesarios más estudios que determinen la farmacocinética del azafrán y de los ésteres glucosídicos de crocetina partiendo de una buena caracterización.

## BIOACTIVIDAD DE LA CROCETINA Y SUS ÉSTERES GLUCOSÍDICOS

Tradicionalmente el azafrán, sus extractos y tinturas, se han empleado en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades sin efectos secundarios tóxicos. Algunas de sus aplicaciones han sido como antiespasmódico, eupéptico, sedante, carminativo, diaforético, expectorante, estomacal, estimulante, afrodisiaco, emenagogo y abortivo. Muy extendido fue su uso en el tratamiento de enfermedades genitales y en la regulación y alivio de la menstruación. Su acción abortiva era bien conocida en la Edad Media, aplicándose además por las matronas en partos por su acción sedante y antiespasmódica (Carmona, Zalacaín y Alonso, 2006). También se ha empleado para tratar afecciones oculares, curar heridas, fracturas y dolores articulares y otras muchas aplicaciones, que hicieron que Plinio El Viejo lo describiera como una especie de panacea en su obra *Naturae Historiarum XXXVII libro* (Alonso *et al.*, 1998). Una reciente revisión de Hosseinzadeh *et al.* (2013) describe los usos farmacológicos del azafrán recogidos en el *Canon de Avicena* relacionándolos con los numerosos estudios científicos recientes, lo que refleja un gran interés en las posibles aplicaciones biomédicas de esta especia.

Desde hace varias décadas se estudia el posible papel beneficioso del azafrán o de sus ésteres glucosídicos de crocetina en diversas enfermedades crónicas. Los resultados obtenidos, concordantes con los antiguamente conocidos,

han permitido avanzar en la investigación e iniciar los estudios de intervención con carotenoides componentes de la dieta identificados como responsables de los efectos beneficiosos (Olmedilla y Granada, 2000). Pellegrini *et al.* (2006) analizaron el poder antioxidante *in vitro* de especias, frutos secos, dulces, cereales, legumbres, y confirmaron que del grupo de especias analizadas, el azafrán mostraba la más alta capacidad antioxidante para todos los métodos aplicados con mucha diferencia con respecto al resto; este hecho puede ser fácilmente atribuible al alto contenido que tiene de carotenoides. También, por el mismo motivo, se pueden justificar sus propiedades beneficiosas en relación con el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas (Escribano *et al.*, 1996; Hausenblas *et al.*, 2013; Alavizadeh y Hosseinzadeh, 2014).

En la última década numerosos estudios científicos resaltan las propiedades biomédicas y farmacológicas del azafrán o de alguno de sus metabolitos (Licón *et al.*, 2010; Ulbricht *et al.*, 2011; Bolhassani, Khavari y Bathaie, 2014). Se han demostrado los efectos beneficiosos de los ésteres glucosídicos de crocetina sobre sistemas como el gastrointestinal, cardiovascular, endocrino, genital, inmune y nervioso, siendo este último el más estudiado (Alavizadeh y Hosseinzadeh, 2014). Si bien muchos de estos estudios fundamentan estos efectos en el carácter antioxidante de los carotenoides del azafrán, los mecanismos de acción no están suficientemente estudiados.

Es de especial interés para nuestro grupo de investigación la bioactividad de los ésteres de crocetina en particular, y del azafrán en general, sobre el sistema nervioso central. Por este motivo a continuación dedicaremos un apartado a la revisión de esta actividad.

## Actividad sobre el sistema nervioso central

Se atribuyen al azafrán y sus metabolitos efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central, con acción biológica sobre la memoria y el aprendizaje, enfermedades neurodegenerativas, depresión y ansiedad, entre otros muchos efectos. Así, revisiones recientes como la de Alavizadeh y Hosseinzadeh (2014), nos acercan a la comprensión de las características biológicas de los ésteres glucosídicos de crocetina. Citaremos los estudios de Abe *et al.* (1999); Sugiura *et al.* (1994, 1995); Hosseinzadeh, Sadeghnia y Rahimi, (2008); Zheng *et al.* (2007); Ahmad *et al.* (2005) y Ghazavi *et al.* (2009) como ejemplos de la profusión de literatura que avala estos hechos. Entre los numerosos efectos demostrados sobre el sistema nervioso central destacamos los siguientes:

*Efecto sobre la memoria y el aprendizaje:* Los desórdenes neurodegenerativos a menudo van asociados a alteraciones de la memoria y aprendizaje. Abe *et al.* (1998) atribuyeron a los ésteres de crocetina acción antagonista a la potenciación inducida por el etanol en las neuronas del hipocampo. Además, sugirieron un posible mecanismo de acción sobre los receptores del N-metil-D-aspartato. Otras publicaciones llevadas a cabo por Abe y Saito (2000) y Siguria *et al.* (1995) ponen también de manifiesto la acción de extractos de azafrán que contenían crocetina y sus ésteres, sobre la mejoría en la memoria y habilidades de aprendizaje. Estudios realizados *in vivo* demuestran que también tienen acción positiva en déficits de aprendizaje y están implicados en los mecanismos subyacentes de reconocimiento y memoria espacial (Pitsikas *et al.*, 2007). Ghadrdoost *et al.* (2011) estudiaron los efectos protectores de un extracto de azafrán y sus ésteres glucosídicos de crocetina y concluyeron que podrían prevenir el deterioro del aprendizaje y la memoria, así como el daño

por estrés oxidativo en el hipocampo inducido por el estrés crónico.

*Efecto sobre la enfermedad de Alzheimer:* El Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes asociadas a la edad y conlleva un importante deterioro de la función cognitiva. Se caracteriza por la formación de placas cerebrales cargadas con el polipéptido  $\beta$ -amiloide así como de prominentes ovillos neurofibrilares de la proteína tau. Estudios *in vitro* han demostrado que un extracto de azafrán es capaz de inhibir la fibrillogénesis de amiloide  $\beta$ -péptido. Otros mecanismos también implicados en la acción anti-Alzheimer del azafrán son el efecto inhibitor en la actividad de la acetilcolinesterasa. También hay hallazgos clínicos que han puesto de relieve la eficacia de leve a moderada en la enfermedad de Alzheimer. Aunque son necesarios más ensayos clínicos en humanos, algunos estudios han puesto de manifiesto el carácter neuroprotector del azafrán y sus componentes (Alavizadeh y Hosseinzadeh, 2014; Akhondzadeh *et al.*, 2010, 2010a).

*Efecto sobre la esclerosis múltiple:* Ghazavi *et al.* (2009) indicaron que el azafrán fue capaz de disminuir los síntomas de la esclerosis múltiple. Tras administrar un extracto de la especia se observó una disminución de los síntomas clínicos y de la infiltración de leucocitos en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental. Asimismo, Deslauriers *et al.* (2011) señalaron que los ésteres glucosídicos de crocetina podrían prevenir la desmielinización y la neurodegeneración. Estos resultados han sugerido que el azafrán puede ser potencialmente útil para el tratamiento de la esclerosis múltiple por la inhibición del estrés oxidativo y la infiltración de leucocitos al sistema nervioso central.

*Enfermedad de Parkinson:* Se ha demostrado que la crocetina podría ser útil en la disminución del riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson además de tener potencialidad terapéutica. En un estudio realizado por Ahmad *et al.* (2005) en ratas hemiparkinsonianas se comprobó que protegía los niveles de ácido tiobarbitúrico, sustancia reactiva en la sustancia negra. Purushothuman *et al.* (2013) estudiaron el efecto sobre las células dopaminérgicas en un modelo de ratones con Parkinson inducido, concluyendo que el pretratamiento con azafrán salva muchas de estas células.

*Efecto sobre la isquemia cerebral:* Son muchos los artículos que avalan que la crocetina podría actuar como antioxidante y tener efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, presentando efecto cardioprotector. Un reciente estudio de Wang *et al.* (2014), en el que se administraban 50 mg/kg/día a una población de ratas, demostró que la crocetina reduce el daño cardíaco, el estrés oxidativo y la inflamación. Asimismo, se apreció decrecimiento en los niveles de tamaño del infarto. Estas acciones ya se habían puesto de manifiesto en estudios anteriores como los de Hosseinzadeh y Sadeghnia (2005), que afirmaban reducción del daño oxidativo en isquemia cerebral, o los de Zheng *et al.* (2005) que observaron reducción del daño oxidativo en los microvasos cerebrales. En 2011 Yang *et al.* demostraron que la crocetina, administrada a animales de experimentación tras shock hemorrágico, aumentaba significativamente la supervivencia y reducía la apoptosis.

*Efecto antidepresivo y ansiolítico:* El azafrán y sus metabolitos han demostrado ser efectivos en diferentes modelos de trastornos psiquiátricos, incluidos la depresión y la ansiedad. Diversos estudios realizados respaldan la posible utilidad terapéutica de que la administración diaria de 30 mg de azafrán da resultados beneficiosos en el tratamiento de la

depresión (Akhondzadeh *et al.*, 2004, 2005; Noorbala *et al.*, 2005). Gout *et al.*, (2010) han estudiado su efecto saciante y Agha-Hosseini *et al.* (2008) su acción en el tratamiento de los trastornos emocionales vinculados al síndrome premenstrual. Debido a que, como se ha comentado antes, en estos estudios no se hace una caracterización exhaustiva de la composición del azafrán suministrado, no es posible afirmar que sean los ésteres de crocetina los responsables de esta acción, ya que también podrían producir este efecto el safranal u otros compuestos.

*Efecto sobre la diabetes neuropática:* Una de las complicaciones más severas de la diabetes mellitus, debida a los altos niveles de azúcar en sangre, es el daño neuronal causado por una disminución del flujo sanguíneo. Aproximadamente la mitad de los diabéticos desarrollan daño neurológico. El azafrán ha mostrado efectos protectores, presumiblemente debido a sus propiedades antioxidantes (Xi *et al.*, 2007; Mousavi *et al.*, 2009; Sheng, 2014).

*Degeneración macular asociada a la edad:* Algunos estudios realizados con azafrán nos proporcionan pistas importantes sobre acciones neuroprotectoras en la degeneración macular asociada a la edad (Bisti, Maccarone y Falsini, 2014; Piccardi *et al.*, 2012; Falsini *et al.*, 2010). Los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* ponen de manifiesto que la administración de crocetina tiene efectos protectores frente al daño de la retina, inhibiendo la degeneración del fotorreceptor y la disfunción retinal, sugiriendo que el mecanismo se basa en la inhibición del aumento de las caspasas 3 y 9 tras el daño retinal (Yamauchi *et al.*, 2011).

## Actividad sobre otros órganos

Numerosos estudios parecen indicar que la ingesta dietética de algunos carotenoides podría reducir el riesgo de desarrollar algunos cánceres, lo que sugiere que podrían ejercer acciones beneficiosas en varios tejidos. También se le atribuyen al azafrán acciones en esta línea. Además, se han estudiado efectos sobre distintos órganos y sistemas:

*Efecto antitumoral:* Estudios recientes realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* indican que el consumo de azafrán, particularmente las crocinas y la crocetina, puede tener un efecto anticancerígeno (Samarghandian, Azimi-Nezhad y Samini, 2014). Es de resaltar que la mayoría de las investigaciones están dirigidas al estudio de la bioactividad de los metabolitos aislados del azafrán, siendo menor en número los trabajos que buscan propiedades anticancerígenas del azafrán en su forma natural. El mecanismo de acción al día de hoy no está claro, pero su actividad podría estar relacionada con la acción antioxidante de los ésteres de crocetina, que podría afectar a la regulación del crecimiento celular, modular la expresión génica y la respuesta inmune (Sarmarghandian *et al.*, 2011). Diferentes estudios señalan su acción como activador de la apoptosis celular en células cancerígenas, no afectando a las normales (Escribano *et al.*, 1996; Sarmarghandian, Tavakkol Afshari y Davoodi, 2013; Bathaie, *et al.*, 2013; D'Alessandro *et al.*, 2013). En los distintos estudios con células cancerosas se observa gran variabilidad de resultados. Según Abdullaev (2002), estas diferencias pueden deberse a la existencia de distintos tipos de receptores celulares, al tipo de transporte intracelular, a diferencias en la cantidad de compuesto utilizado, a los distintos métodos de extracción o de determinación de las citotoxicidades.

En relación con el cáncer de piel, se encontró que la administración oral de azafrán en ratones inhibe la formación de papilomas en la piel y, simultáneamente, disminuye su tamaño (Das, Das y Saha, 2010). Hay estudios tanto *in vitro* como *in vivo* con células tumorales de páncreas que indican que la crocetina y sus ésteres podrían tener una potente acción antitumoral por la vía de la inhibición de la apoptosis (Baski, 2010; Dhar *et al.*, 2009). Sobre cáncer de próstata se ensayaron extracto de azafrán, ésteres de crocetina y crocetina, observándose efectos de disminución del tamaño del tumor; destaca que la crocetina produjo reducciones de la masa del tumor entre 75 y 85% (Festuccia *et al.*, 2014). En líneas de células de cáncer colorectal (HCT-116, SW-480 y HT-29) los ésteres de crocetina inhiben el crecimiento de células malignas, sin afectar el crecimiento de las normales (García-Olmo *et al.*, 1999).

*Efecto sobre el sistema cardiovascular.* Diversos estudios ponen de manifiesto el efecto potencial de las crocinas en el tratamiento de enfermedades del sistema cardiovascular. En la aterosclerosis, la más común de las arterioesclerosis, se demostró que la crocetina, incrementa la difusión de oxígeno en el plasma sanguíneo, compensando la disminución causada por un elevado nivel de colesterol, por lo que ha mostrado tener efecto contra la arteriosclerosis y como reductor de los

niveles de colesterol en sangre (Gainer y Chisolm, 1974; Gainer y Jones, 1975; Miller *et al.*, 1982). También se ha estudiado el aumento de la oxigenación de diversos tejidos por Gainer y Nugent (1976); DiLuccio y Gainer (1980); Seyde *et al.* (1986); Holloway y Gainer (1988); Gainer *et al.* (1993). Los resultados de un estudio *in vivo* llevado a cabo por Sheng *et al.* en 2006, sugieren un efecto hipolipemiante de los ésteres de crocetina. Los resultados indican que, aunque los ésteres de crocetina no podían bloquear directamente la absorción de colesterol, sí podrían inhibir selectivamente la actividad de la lipasa pancreática como un inhibidor competitivo. Se han evidenciado efectos en la asimilación de los lípidos (Hänsel, 1977) y disminución de la obesidad en ratas (Noorbala *et al.*, 2005), así como mejora en el perfil lipídico por la acción de extractos de azafrán y ésteres de crocetina (Samarghandian, Azimi-Nezhad y Samini, 2014 b; Mashmoul *et al.*, 2014).

*Efecto sobre la función hepática.* Se describen efectos hepatoprotectores en estudios *in vivo* donde los ésteres de crocetina atenúan la activación de las caspasas y la reducción de la relación bax/Bcl-2 lo que reduce la hepatotoxicidad (Lari *et al.*, 2013). También hay estudios que atribuyen al azafrán actividad como antiinflamatorio, anticonvulsivante, antihistamínico, antiasmático, genoprotector, antitusivo, protector de la mucosa gástrica, inhibidor de la dependencia de morfina y disfunción sexual.

## REFERENCIAS

- Abe, K., Sugiura, M., Shoyama, Y., Saito, H. 1998. *Brain Research* 787: 132-138.
- Abe, K., Sugiura, M., Yamaguchi, S., Shoyama, Y., Saito, H. 1999. *Brain Research* 851: 287-289.
- Abe, K. y Saito, H. 2000. *Phytotherapy Research* 14: 149-152.
- Abdullaev, F.I. 2002. *Experimental Biology & Medicine* 227: 20-25.
- Agha-Hosseini, M., Kashani, L., Aleyaseen, A., Ghoreishi, A., Rahmanpour, H., Zarrinara, A.R., Akhondzadeh, S. 2008. *International Journal of Obstetrics Gynecology* 115: 515-519.
- Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., Saleem, S., Yousuf, S., Hoda, M.N., Islam, F. 2005. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 81: 805-813.
- Akhondzadeh, S., Fallah-Pour, H., Afkham, K., Jamshidi, A.H., Khalighi-Cigaroudi, F. 2004. *Complementary and Alternative Medicine* 4: 12-17.
- Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Noorbala, A.A., Amini, H., Fallah-Pour, H., Jamshidi, A.H., Khani, M. 2005. *Phytotherapy Research* 19: 148-151.
- Akhondzadeh S., Basti, A., Moshiri, E., Noorbala, A.A., Jamshidi, A.H., Abbasi, S.H., Akhondzadeh, S. 2006. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 31: 439-442.
- Akhondzadeh, S., Sabet, M., Harirchian, M.H., Togha, M., Cheraghmakani, H., Razeghi, S., Hejazi, S.S., Yousefi, M.H., Alimardani, R., Jamshidi, A., Rezazadeh, S.A., Yousefi, A., Zare, F., Moradi, A., Vossoughi, A. 2010. *Psychopharmacology* 207: 637-643.
- Akhondzadeh, S., Sabet, M.S., Harirchian, M.H., Togha, M., Cheraghmakani, H., Razeghi, S., Hejazi, S.Sh., Yousefi, M.H., Alimardani, R., Jamshidi, A., Zare, F., Moradi, A. 2010a. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 35: 581-588.
- Alavizadeh, S.H. y Hosseinzadeh, H. 2014. *Food and Chemical Toxicology* 64: 65-80.
- Alessio, H.M. 1993. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 25: 218-224.
- Alonso, G.L., Varón, R., Salinas, M.R., Navarro, F. 1993. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 132: 116-120.
- Alonso G.L., Salinas M.R., Esteban-Infantes F.J., Sánchez-Fernández, M.A. 1996. *Journal of Agricultural and Food and Chemistry* 44: 185-188.
- Asffoch, S. 1818. *Berl. Jb. Pharmacy* 19: 142-157.
- Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M., Nagao, A. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7302-7306.
- Asen, S., Stewart, R.N. y Norris, K.H. 1972. *Phytochemistry* 11: 1139-1144.

## REFERENCIAS

- Bathaie, S.Z., Hoshyar, R., Miri, H., Sadeghizadeh, M. 2013. *Biochemistry and Cell Biology* 91: 397-403.
- Bisti, S., Maccarone, R. y Falsini, B. 2014. *Visual Neuroscience* 31: 355-361.
- Bolhassani, A., Khavari, A. y Bathaie, S.Z. 2014. *Biochimica et Biophysica Acta* 1845: 20-30.
- Boulton, R. 2001. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67-87.
- CAE. 1967. Decreto 2484/1967, 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. BOE núm. 248, 17.10.1967.
- Carmona, M., Zalacaín, A., Pardo, J.E., Lopez, E., Alvarruiz, A., Alonso, G.L. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3974-3979.
- Carmona, M., Zalacaín, A., Sánchez, A.M., Novella, J.L., Alonso, G.L. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 973-979.
- Carmona, M., Zalacaín, A. y Alonso, G.L. 2006. *The Chemical Composition of Saffron: Color, Taste and Aroma*. Albacete: Editorial Bomarzo.
- Cadwallader, K.R. 2002. "Flavor Chemistry of Saffron". en P. Winterhalter, y R. Rouseff (eds.), *Carotenoid Derived Aroma Compounds*. Washington DC: American Chemical Society Symposium Series. pp. 220-239.
- Corradi, C. y Micheli, G. 1979. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 118: 553-562.
- Chryssanthi D.G., Lamari F.N., Georgakopoulos, C.D., Cordopatis, P. 2011. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 563-568.
- D'Alessandro A.M., Mancini A., Lizzi A.R., De Simone, A., Marrocella, C.E., Gravina, G.L., Tatone, C., Festuccia, C. 2013. *Nutrition Cancer* 65: 930-942.
- Das I., Das S. y Saha, T. 2010. *Acta Histochemica* 112: 317-327.
- Decker, F. 1914. "Beiträge zur Kenntnis des Crocetins". *Archiv der Pharmazie* 252: 139-160.
- Deslauriers, A.M., Afkhami-Goli, A., Paul, A.M., Bhat, R.K., Acharjee, S., Ellestad, K.K., Noorbakhsh, F., Michalak, M., Power, C. 2011. *Journal of Immunology* 187: 4788-4799.
- Dhar, A., Mehta, S., Dhar, G., Dhar, K., Banerjee, S., Van Veldhuizen, P., Campbell, D.R., Banerjee, S.K. 2009. *Molecular Cancer Therapeutics* 8: 315-323.
- DiLuccio, R.C. y Gainer, J.L. 1980. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 51: 18-20.
- DOCE. *Diario Oficial de la Comunidad Europea*. 1999. European Commission núm. 378/99. 20 de febrero de 1999, p. 13. (L 46 de 20.2.1999). Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31999R0378&qid=1416915929744&from=EN> [consultado el 25 de noviembre de 2014].

## REFERENCIAS

- DOCE. 2001. European Commission núm 464/2001. 8 de marzo de 2001, p. 29. (L 66 de 8.3.2001). Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001R0464&qid=1416921457261&from=EN> [consultado el 25 de noviembre de 2014].
- DOCE. 2005. Reglamento (CE) núm. 205/2005. Comisión de 04/02/2005. Publicado en el *Diario Oficial de la Comunidad Europea* del 05/02/2005, L33, p. 6.
- DOCE. 2009. Reglamento (CE) núm. 98/2009. Comisión de 02/02/2009. Publicado en el *Diario Oficial de la Comunidad Europea* del 03/02/2009, L33, p. 8.
- Escribano J., Alonso G.L., Coca-Prados M., Fernández, J.A. 1996. *Cancer Letters* 100: 23-30.
- Escribano, J., Alonso, G.L., Salinas, M.R., Fernández, J.A. 1997. Método de aislamiento de sustancias colorantes y saborizantes de azafrán especia: crocinas y picrocrocina. Patente ES 2 130 066 A1.
- Escribano-Bailón, M.T. y Santos-Buelga, C. 2012. *Current Organic Chemistry* 16: 715-723.
- Erdman, J.W. Jr, Bierer, T.L. y Gugger, E.T. 1993. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691: 76-85.
- Falsini, B., Piccardi M., Minnella A., Savastano C., Capoluongo E., Fadda A., Balestrazzi E., Maccarone R., Bisti, S. 2010. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 6118-6124.
- Festuccia, C., Mancini, A., Gravina, G.L., Scarsella, L., Llorens, S., Alonso, G.L., Tatone, C., Di Cesare, E., Jannini, E.A., Lenzi, A., D'Alessandro, A.M., Carmona, M. 2014. *BioMed Research International* art. núm.:135048.
- Gainer J.L. y Chisolm, G.M. 1974. *Atherosclerosis* 19: 135-138.
- Gainer, J.L. y Jones, J.R. 1975. *Experientia* 31: 548-549.
- Gainer, J.V. Jr. y Nugent, R. 1976. *Journal of Neurosurgery* 45: 535-538.
- Gainer, J.L. 2008. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17: 917-924.
- García-Olmo, D.C., Riese, H.H., Escribano, J., Ontañón, J., Fernández, J.A., Atiénza, M., García-Olmo, D. 1999. *Nutrition Cancer* 35: 120-126.
- García-Rodríguez, M.V., Serrano-Díaz, J., Tarantilis, P.A., López-Córcoles, H., Carmona, M., Alonso, G.L. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 8068-8074.
- Ghadrdoost, B., Vafaei, A.A., Rashidy-Pour, A., Hajisoltani, R., Bandegi, A.R., Motamedi, F., Haghghi, S., Sameni, H.R., Pahlvan, S. 2011. *European Journal of Pharmacology* 667: 222-229.
- Ghazavi, A., Mosayebi, G., Salehi, H., Abtahi, H. 2009. *Pakistan Journal of Biological Science* 12: 690-695.

## REFERENCIAS

- Granado, F., Olmedilla, B., Herrero, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco, I., Blázquez, S. 2006. *Experimental Biology & Medicine* 231: 1733-1738.
- Gregory, M.J., Menary, R.C. y Davies, N.W. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5969-5975.
- Hadizadeh, F., Mohajeri, S.A. y Seifi, M. 2010. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 691-698.
- Hausenblas, H.A., Saha, D., Dubyak, P.J., Anton, S.D. 2013. *Journal of Integrative Medicine* 11: 377-383.
- He, K., Si, P., Wang, H., Tahir, U., Chen, K., Xiao, J., Duan, X., Huang, R., Xiang, G. 2014. *Molecular Medicine Reports* 9: 521-6.
- Heaney, RP. 2001. *Journal of Nutrition* 131: 1344-1348.
- Himero, H. y Sano, K. 1987. *Agricultural and Biological Chemistry* 9: 2395-2400.
- Holloway, G.M. y Gainer, J.L. 1988. *Journal of Applied Physiology* 65: 683-686.
- Hosseinzadeh, H. y Sadeghnia, H.R. 2005. *Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences* 8: 394-399.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R. y Rahimi, A. 2008. *Planta Medica* 74: 1441-1445.
- Hosseinzadeh, H., Abootorabi, A. y Sadeghnia, H.R. 2008. *DNA and Cell Biology* 27: 657-664.
- Hosseinzadeh, H. y Jahanian, Z. 2010. *Phytotherapy Research* 24: 726-730.
- Hosseinzadeh, H. y Nassiri-Asl, M. 2013. *Phytotherapy Research* 27: 475-483.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghi Shakib, S., Khadem Sameni, A., Taghiabadi, E. 2013. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12: 93-99.
- ISO3632 Saffron (*Crocus sativus* L.). 2011. Part 1 (Specification) and Part 2 (Test methods). International Organisation for Standardization. Ginebra.
- IUPAC, 1974. Nomenclature of Carotenoids (rules approved 1974). Issued by the IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Londres: Buters Worths.
- Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G. 2007. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 24: 537-546.
- Karrer, P. y Salomon, H. 1928. *Helvetica Chimica Acta* 11: 513-525.
- Karrer, P. y Salomon, H. 1928. *Helvetica Chimica Acta* 11: 711-713.
- Khun, R., y Winterstein, A. 1934. *Berichte Deutschen Chemischen Gesellschaft* 67: 344-347.
- Kyriakoudi, A., Chrysanthou, A., Mantzouridou, F., Tsimidou, M.Z. 2012. *Analytica Chimica Acta* 755: 77-85.

## REFERENCIAS

- Licón, C., Carmona, M., Llorens, S., Berruga, M.I., Alonso G.L. 2010. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4. Special Issue 2. pp 64-73.
- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas M.R. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7609-7616.
- Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J., Iborra J.L. 1999. *Journal of Chromatography A* 830: 477-483.
- Manach, C. y Donovan J.L. 2004. *Free Radical Research* 38: 771-785.
- Miller, T.L., Willett, S.L., Moss, M.E., Miller, J., Belinka, B.A. Jr. 1982. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71: 173-177.
- Mizuma, H., Tanaka, M., Nozaki, S., Mizuno, K., Tahara, T., Ataka, S., Sugino, T., Shirai, T., Kajimoto, Y., Kuratsune, H., Kajimoto, O., Watanabe Y. 2009. *Nutrition Research* 29: 145-150.
- Mohajeri, D., Mousavi, G., Mesgari, M., Doustar, Y., Khayat Nouri, M. 2007. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2: 189-193.
- Mohamadpour, A.H., Ayati, Z., Parizadeh, M.R., Rajbai, O., Hosseinzadeh, H. 2013. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16: 39-46.
- Morimoto, S., Umezaki, Y., Shoyama, Y., Saito, H., Nishi, K., Irino, N. 1994. *Planta Medica* 60: 438-440.
- Mousavi, S.H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., Jafari-Anarkooli, I. 2009. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1909-1913.
- Mousavi, S.H., Tayarani, N.Z. y Parsaee, H. 2010. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30: 185-191.
- Naess, S.N., Elgsaeter, A., Foss, B.J., Li, B., Sliwka, H.-R., Partali, V., Melø, T.B., Naqvi, K.R. 2006. *Helvetica Chimica Acta* 89: 45-53.
- Noorbala, A.A., Akhondzadeh, S., Tahmacebi-Pour, N., Jamshidi, A.H. 2005. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 281-284.
- Olmedilla, B. y Granada, F. 2000. *European Journal of Clinical Nutrition*. 54: S11-S15.
- Orfanou, O. y Tsimidou, M. 1995. *Developments in Food Science* 37: 881-894.
- Parker, R.S. 1996. *Federation of American Societies Experimental Biology* 10: 542-51.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Río, D., Bianchi, M., Brighenti, F. 2006. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 1030-1038.
- Pfander, H. y Wittwer, F. 1975. *Helvetica Chimica Acta* 58: 1608-1620.
- Piccardi, M., Marangoni, D., Minnella, A.M., Savastano, M.C., Valentini, P., Ambrosio, L., Capoluongo, E., Maccarone, R., Bisti, S., Falsini, B. 2012. *Evidence-based Complementary Alternative Medicine* 2012: article ID: 429124.

## REFERENCIAS

- Pfister, S., Meyer, P., Steck, A., Pfander, H. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2612-2615.
- Pitsikas, N., Zisopoulou, S., Tarantilis, P.A., Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Sakellaridis, N. 2007. *Behavioural Brain Research* 183: 141-146.
- Pubchem, 2015. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281233> [consultado el 7 de enero de 2015].
- Purushothuman, S., Nandasena, C., Peoples, C.L., El Massri, N., Johnstone, D.M., Mitrofanis, J., Stone, J. 2013. *Journal of Parkinson's Disease* 3: 77-83.
- Raina, B.L., Agarwal, S.G., Bhatia, A.K., Gaur, G.S. 1996. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 27-32.
- Samarghandian, S., Tavakkol Afshari, J. y Davoodi, S. 2011. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164: 238-247.
- Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, S.K., Afshari, R., Davoodi, S. 2013. *Biomed Research International* 2013: article ID 417928.
- Samarghandian, S. y Borji, A. 2014. *Pharmacognosy Research* 6: 99-107.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M. y Samini, F. 2014. *Biomed Research International*. 2014: article ID 920857.
- Sánchez, A.M., Carmona, M., Ordoudi, S.A., Tsimidou, M.Z., Alonso, G.L. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1627-1637.
- Selim, K., Tsimidou, M. y Biliaderis, C.G. 2000. *Food Chemistry* 71: 199-206.
- Seyde, W.C., McKernan, D.J., Laudeman, T., Gainer, J.L., Longnecker D.E. 1986. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 6: 703-707.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Maggi, L., Carmona, M., Alonso, G.L. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 873-879.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., Alonso G.L. 2013. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 101-108.
- Sheng, L., Qian, Z., Zheng, S., Xi, L. 2006. *European Journal of Pharmacology* 543: 116-122.
- Sheng, L., Qian, Z., Shi, Y., Yang, L., Xi, L., Zhao, B., Xu, X., Ji, H. 2008. *British Journal of Pharmacology* 154: 1016-24.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. y Goñi, I. 2007. *Food Chemistry* 101: 492-501.
- Speranza, G., Dada, G., Manitto, P., Monti, D., Grammatica, P. 1984. *Gazzetta Chimica Italiana* 114: 189-192.
- Sugiura, M., Shoyama, Y., Saito, H., Abe, K. 1994. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271: 703-707.

## REFERENCIAS

- Sugiura, M., Shoyama, Y., Saito, H., Abe, K. 1995. *Japanese Journal of Pharmacology* 67: 395-397.
- Sujata, V., Ravishankar, G.A. y Venkataraman, L.V. 1992. *Journal of Chromatography* 624: 497-502.
- Tanskanen, M., Atalay, M. y Uusitalo, A. 2010. *Journal of Sports in Science and Medicine* 28: 309-317.
- Tarantilis, P.A., Polissiou, M. y Manfait, M. 1994. *Journal of Chromatography A* 664: 55-61.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G. y Polissiou, M. 1995. *Journal of Chromatography A* 699: 107-118.
- Tsimidou, M. y Biliaderis, C.G. 1997. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2890-2898.
- Tsimidou, M. y Tsatsaroni, E. 1993. *Journal of Food Science* 58: 1073-1075.
- Xi, L., Qian, Z., Du, P., Fu, J. 2007. *Phytomedicine* 14: 633-636.
- Ulbricht, C., Conquer, J., Costa, D., Hollands, W., Iannuzzi, C., Isaac, R., Jordan, J.K., Ledesma, N., Ostroff, C., Serrano, J.M., Shaffer, M.D., Varghese M. 2011. *Journal of Dietary Supplements* 8: 58-114.
- Umigai, N., Murakami, K., Ulit, M.V., Antonio, L.S., Shirotori, M., Morikawa, H., Nakano, T. 2011. *Phytomedicine* 18: 575-578.
- Verma, S.K. y Bordia, A. 1998. *Indian Journal of Medical Science* 52: 205-207.
- Wang, Y., Sun, J., Liu, C., Fang, C. 2014. *European Journal of Pharmacology* 741: 290-296.
- Yamauchi, M., Tsuruma, K., Imai, S., Nakanishi, T., Umigai, N., Shimazawa, M., Hara, H. 2011. *European Journal of Pharmacology* 650: 110-119.
- Zhang, H., Zeng, Y., Yan, F., Chen, F., Zhang, X., Liu, M., Liu, W. 2004. *Chromatographia* 59: 691-696.
- Zheng, S., Qian, Z., Tang, F., Sheng L. 2005. *Biochemical Pharmacology* 70: 1192-1199.
- Zheng, Y.Q., Liu, J.X., Wang, J.N., Xu L. 2007. *Brain Research* 1138: 86-94.

# CAROTENOIDES EN PIENSOS PARA ACUICULTURA Y CALIDAD DE PECES DE CULTIVO

Lidia Esther Robaina Robaina, Josefa García Romero, Rafael Ginés Ruiz, Marisol Izquierdo López



## PRODUCCIÓN DE ACUICULTURA EN UN CONTEXTO GLOBAL

La acuicultura se ha convertido en una industria con amplio espectro de actividades; más allá de aquella directamente relacionada con la producción de alimento acuático de calidad para consumo humano, otras nuevas orientaciones productivas, como el desarrollo de productos biotecnológicos y farmacológicos, la generación de biocombustibles, la repoblación de organismos acuáticos y la acuariología han incrementado su relevancia.

En el contexto de la producción de alimento de origen animal, la acuicultura es la industria de mayor crecimiento a escala global con una media de 8% de crecimiento anual frente al 7.1% para aves y 3.5% para cerdos (FAO, 2011, 2013). La acuicultura representa más de la mitad del creciente suministro mundial de alimento de origen acuático; hecho que se ve favorecido por el estancamiento de la producción pesquera

(Campbell y Pauly, 2013). En los últimos años, además, el crecimiento de la acuicultura es incluso mayor en valor económico que en cantidades relativas producidas, con el salmón y la trucha (14%) en segunda posición por detrás de los crustáceos (15%) (FAO, 2013).

El consumo global per cápita anual de productos acuáticos, algas excluidas, entre los años 2009-2011 muestra tendencias decrecientes (de 9.1 a 8.8) y crecientes (de 8.2 a 8.6) para productos procedentes de la pesca y la acuicultura, respectivamente (FAO, 2011, 2013). Así, las estimaciones para la producción mundial total de acuicultura (animales y algas) en 2013 es de 96.6 millones de toneladas, frente a los 91.3 millones de pesquerías de los cuales sólo 70.6 millones se destinan a consumo humano directo. En la actualidad, y según FAO (2014), se puede decir que la acuicultura provee más alimento para la humanidad que las capturas por pesca.

## Piensos y producción en acuicultura

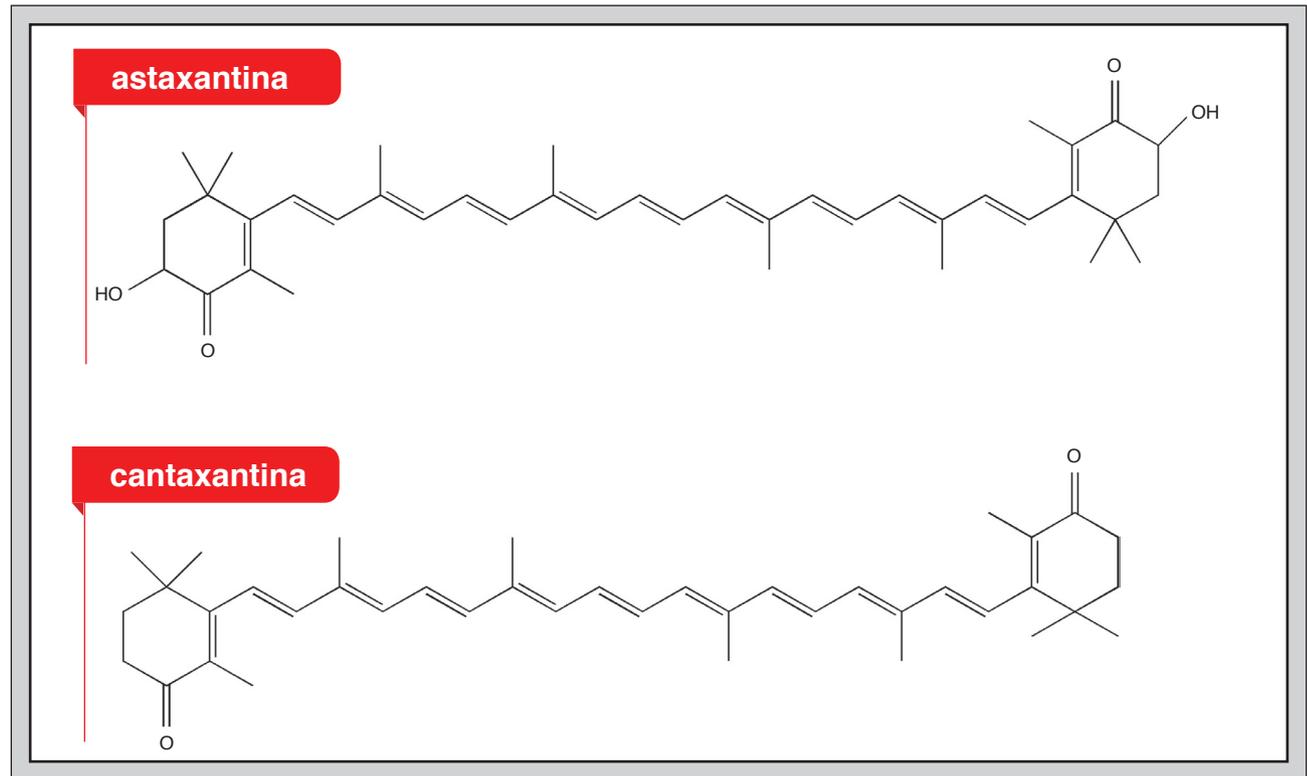
La proyección creciente de la acuicultura, orientada a satisfacer la demanda de pescado y otros productos acuáticos, ha venido aparejada con un fuerte incremento de la producción de los piensos necesarios para ello. Actualmente, sin embargo, de los casi mil millones de toneladas de piensos secos que se producen para la ganadería en el mundo, menos de 5% corresponden a piensos para acuicultura (FIAAP, 2013); de ahí que la competencia por las materias primas y aditivos en un contexto global haya favorecido la implementación de una acuicultura competitiva que requiere investigación e innovación constantes.

El pienso representa uno de los gastos de producción más elevados en granjas de acuicultura y llega a suponer

hasta 50% del total en el caso de peces marinos criados en sistemas de producción intensivos. Una parte importante del precio de los piensos para acuicultura está relacionada con los micronutrientes y aditivos necesarios para cubrir las necesidades nutricionales y fisiológicas de los animales. Si bien una adecuada nutrición evita signos de deficiencia, manteniendo el correcto desarrollo y salud de los peces, resulta cada vez más evidente que las *dietas fortificadas* con nutrientes específicos (aminoácidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales, prebióticos, antioxidantes), pueden contribuir a mejorar no sólo el crecimiento, sino la salud y resistencia de los animales.

En la formulación de dietas para peces, evaluar el potencial antioxidante de ingredientes y aditivos dietéticos resulta crucial, dado que presentan alto riesgo de peroxidaciones relacionadas con su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados, tanto en tejidos como en dietas. En una revisión reciente sobre formulaciones económico-sostenible-saludables para peces, Kiron (2012), comenta sobre la importancia de los carotenoides, principalmente astaxantina (figura 1) en su diferentes formas, como antioxidantes en el pienso. Se nota sin embargo la escasez de trabajos en esta línea, en donde la mayor parte del esfuerzo se ha volcado en la mejora del color de los animales y sus implicaciones sobre la capacidad de decisión del consumidor.

Los pigmentos carotenoides se encuentran entre los compuestos antioxidantes mayoritarios en los piensos para ganadería, de ahí la elevada contribución de los mismos al crecimiento exponencial del mercado global de carotenoides observado en los últimos años. Los datos de valor de mercado en el 2013 fueron de 1161.78 millones de dólares con una proyección para el 2019 de 1428.12 millones de dólares,



**FIGURA 1.** Estructuras químicas de astaxantina y cantaxantina.

liderado por Europa seguido de Estados Unidos, donde el mercado de alimentación animal representa más de la mitad del consumo global, seguido del de suplementos alimenticios y muy de lejos por la alimentación humana y la cosmética. En el cómputo total de uso de carotenoides en la fabricación de piensos, la acuicultura representa aproximadamente 10% frente a 90% de la ganadería terrestre.

En la industria de acuicultura la cantaxantina (figura 5 del capítulo 6) y, sobre todo, la astaxantina han sido utilizadas durante años para la pigmentación de salmón, trucha y langostino, llegando a representar en el caso del salmón hasta 20% del costo total de los piensos (Torrissen *et al.*, 1995). El mercado

global de astaxantina, natural y sintética, ha sido estimado en 280 toneladas con un valor de 447 millones de dólares en 2014, con una proyección de 670 toneladas y 1.1 billones de dólares en 2020. En los últimos años, unido a la creciente preocupación de la población por la ingesta de alimentos seguros, se observa una mayor demanda de ingredientes naturales que contienen carotenoides, frente a los producidos mediante síntesis química; esta tendencia se extiende hacia la producción de ganado y por lo tanto de piensos para acuicultura. Por otro lado, el elevado precio de la astaxantina y cantaxantina unido a su bajo porcentaje de retención en los peces han contribuido a la investigación con otro tipo de pigmentos, principalmente de origen terrestre, en los últimos años.

## CAROTENOIDES EN PIENSOS PARA PECES

Los carotenoides se han utilizado de forma general en acuicultura para promover la coloración de la piel y el filete en los animales, dado que el color determina la aceptación del producto por el consumidor y en gran medida el valor de mercado del mismo. El color está determinado fundamentalmente por la concentración de pigmentos en los tejidos, el cual es consecuencia de la ingesta de los mismos (Pavlidis *et al.*, 2006).

Los peces, como otros vertebrados, no tienen la capacidad de sintetizar carotenoides *de novo*, por lo que bajo condiciones de cultivo éstos deben ser incorporados en las cantidades adecuadas en la dieta que se les suministre (Goodwin, 1984). Una vez que los carotenoides han sido absorbidos, pueden ser almacenados y modificados en los diferentes tejidos del animal, principalmente en el hígado, los músculos y la piel (Schiedt *et al.*, 1986). La inclusión de carotenoides en el pienso se hace mediante la adición de fuentes naturales o sintéticas de estos pigmentos, y son la astaxantina y la cantaxantina los más utilizados en el último caso (Foss *et al.*, 1987; Storebbakken y No, 1992; Bjerkeng *et al.*, 1997). También se utilizan diferentes ingredientes naturales, como carcasas y otros subproductos de crustáceos e invertebrados marinos (Kalinowski *et al.*, 2005, 2007; García Romero *et al.*, 2010, 2014a), y algas o levaduras rojas.

La eficacia en la deposición y pigmentación no sólo depende de la especie, sino de la forma química en que éstos aparezcan (Torrissen, 1985; Schiedt *et al.*, 1986; Osterlie, Bjerkeng y Liaaen-Jensen, 1999), de la capacidad metabólica del animal para transformar unos pigmentos en otros en los diferentes tejidos y de posibles interacciones entre ellos cuando aparecen en elevadas cantidades en el alimento

(Torrissen *et al.*, 1990; Ha *et al.*, 1993). Por otro lado, los lípidos contenidos en la dieta así como la digestibilidad de los mismos, también afectan a la absorción y deposición de los carotenoides (Torrissen *et al.*, 1990). Recientemente, se trabaja además en el importante papel antioxidante de los carotenoides sobre los radicales libres que se generan en los tejidos y que están relacionados con la oxidación de los lípidos (Bell *et al.*, 2000). El perfil de los lípidos de la dieta afecta de forma clara al estado oxidativo del filete, lo que se ve reforzado y reflejado por el contenido en vitamina E y otros antioxidantes en el mismo (Undeland, Hall y Lingnert, 1999).

La investigación en fuentes alternativas de pigmentos naturales, como carotenoides presentes en levaduras, pimientos, tomates, microalgas y semillas como el annatto (*Bixa orellana*) ha crecido en los últimos años. La evaluación de los mismos, además de en sus implicaciones en el color, se ha ampliado a sus múltiples efectos fisiológicos beneficiosos para los animales, sobre todo aquellos relacionados con la calidad, estabilidad y vida útil de los filetes (Barbosa, Morais y Choubert, 1999; Bell *et al.*, 2000; Hancz *et al.*, 2003; Storebakken *et al.*, 2004; Büyükçapar, Yanar y Yanar, 2007; Kalinowski *et al.*, 2007; Hynes *et al.*, 2009; Teimouri, Keramat Amirkolaie y Yeganeh, 2013; García Romero *et al.*, 2014; Safari y Atash, 2015). Asimismo, otro tipo de efectos beneficiosos de los carotenoides del pienso, como aquellos relacionados con la salud, sistema inmunológico y supervivencia de los peces, se han reportado en diferentes especies (Liebler, 1993; Amar *et al.*, 2001; Waagbo *et al.*, 2003).

## CAROTENOIDES Y CALIDAD DEL PESCADO DE CRIANZA

La calidad del pescado se relaciona con conceptos diferentes dependiendo del propio procesado al que se somete o del conocimiento del consumidor. Las características organolépticas, valor nutricional o composición bioquímica y vida útil del filete son parámetros que definen su calidad y condicionan la percepción de la misma por el consumidor. Todas estas características dependen, además de la frescura y procesado previos, de la composición del filete de pescado, la cual a su vez está condicionada por otros aspectos cualitativos entre los cuales destaca la composición de la dieta (Li *et al.*, 2007; Grigorakis, 2007). Los pigmentos en la dieta, especialmente los carotenoides, afectan de manera importante características o atributos sensoriales de la calidad de un pescado. Entre ellos, el color tanto en piel como en filete, así como la composición bioquímica y la susceptibilidad a la oxidación a lo largo del tiempo (vida útil) han sido los más estudiados por sus efectos directos en la apariencia, estabilidad y precio final de mercado.

### Carotenoides y color

Entre los indicadores que definen a las características organolépticas del pescado, el color de la piel o del filete ocupa un lugar importante, ya que determina de manera significativa la aceptación o rechazo del producto por el consumidor, aun teniendo éste una composición bioquímica óptima e incluso una correcta textura y calidad sanitaria. El color de un producto está definido por parámetros como la intensidad, el tono y la luminosidad (CIE, 1976) véase también el capítulo 6.

Según las especies de peces, se pueden diferenciar las que de manera preferente depositan los pigmentos en el filete (salmón, trucha), de aquellas otras que lo hacen en la piel (bocinegro, carpa, pargo japonés). Esto se relaciona con el metabolismo y la deposición diferenciada de los carotenoides dietéticos en los diferentes tejidos. La mayoría de estas especies de peces pierden su color natural característico al ser criados en instalaciones de cultivo, tanto en jaulas como en tanques, por lo que para su adecuada comercialización es necesaria la formulación de dietas específicas enriquecidas con los carotenoides adecuados.

### Coloración de la piel

La coloración en la piel de un pez es el resultado de la actividad y densidad de los cromatóforos, células situadas en un plano paralelo a la piel. En función del color del pigmento depositado en su interior, los cromatóforos se clasifican en melanóforos (marrón o negro), eritróforos (rojo), xantóforos (amarillos), leucóforos (blanco) (que absorben la luz) e iridóforos (que reflejan la luz), que contienen pigmentos sin color (Fujii, 2000).

En estudios realizados en especies de peces que depositan los pigmentos en la piel, como el bocinegro (*Pagrus pagrus*) (figura 2), se ha encontrado que las células pigmentarias predominantes son xantóforos y eritróforos; observándose además que en ausencia de carotenoides en la dieta suministrada aparece un gran número de melanóforos en detrimento de los característicos xantóforos y eritróforos, alejándose el color del animal del rojizo característico, típico de la especie en su medio natural (Chatzifotis *et al.*, 2005). Por lo tanto, el colorido de muchas especies de peces se debe a la absorción y deposición de los carotenoides en los eritróforos o xantóforos, que deben ser suministrados

**FIGURA 2.** Determinación del color de la piel en bocinegro (*Pagrus pagrus*) mediante colorímetro.



para ello en dietas adecuadas, ya que los peces no pueden sintetizarlos a partir de otros nutrientes precursores (Fujii, 2000). En los últimos años, un gran número de estudios científicos de nutrición en acuicultura se han orientado a la formulación de dietas específicas, que contengan los pigmentos adecuados para devolver y mantener la coloración natural de diferentes especies de peces, tanto para consumo humano como ornamentales. La eficacia pigmentaria de los diferentes carotenoides es específica y está determinada por su estructura, color específico, digestibilidad y metabolismo, modulándose en último término por la presencia de otros constituyentes contenidos en el alimento, como el tipo y

cantidad de lípidos y de vitaminas liposolubles como la vitamina E.

En estudios iniciales se utilizaron fuentes de carotenoides en su mayoría de origen sintético; la cantaxantina y la astaxantina fueron los más utilizados en todas las especies. Resultados en diferentes especies de pargos rojos como el bocinegro y el *Australian snapper* (*Pagrus auratus*) o el rodaballo (*Paralichthys olivaceus*), a niveles de inclusión desde 25 a 200 mg de carotenoides por kilo dieta, han demostrado la idoneidad de la astaxantina en la mayoría de las especies para recuperar el color característico de las mismas bajo condiciones de cultivo (Lorenz, 1998; Chatzifotis *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2005; Tejera *et al.*, 2007; Doolan *et al.*, 2008). Otros carotenoides sintéticos como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno (100 ppm) en el bocinegro, y zeaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno en dorada japonesa también han sido probados sin obtener en este caso los resultados deseados (Chatzifotis *et al.*, 2005).

En especies de peces ornamentales el uso de carotenoides en la dieta es primordial al ser el color la característica más importante para la comercialización de estas especies en el mundo de la acuariofilia. Algunos trabajos sobre el uso de carotenoides sintéticos como el apo-éster (60 mg carotenoide/kg dieta) se han realizado con buenos resultados en boina rojo (*Carassius auratus*) (Grether, Kasahara y Kolluru, 2004). Otros estudios como el de Wang, Chien y Pan (2006) en tetra roja (*Hyphessobrycon callistus*) han utilizado astaxantina y  $\beta$ -caroteno sintético (10-20mg carotenoide/kg dieta), así como mezcla de ambos para colorear la piel de esta especie ornamental. En este último trabajo se encontró una conversión de  $\beta$ -caroteno hacia astaxantina, demostrando ser ésta una de las especies en las que ha sido demostrada la capacidad de bioconvertir pigmentos más sencillos en otros mucho

más complejos a través de rutas metabólicas específicas. Esta capacidad metabólica también se ha descrito en otras especies de peces como la dorada, *Sparus aurata* (Gomes *et al.*, 2002), el pez gato, *Ictalurus punctatus* (Li *et al.*, 2007) y el bocinegro (Tatiana *et al.*, 2007; García-Romero *et al.*, 2010). Esto constituye una herramienta biológica importante en el manejo nutricional para la coloración, ya que permite la inclusión dietética de pigmentos más económicos, que podrán ser posteriormente convertidos y depositados en aquellos otros mucho más caros característicos de la especie objetivo.

Si bien estas fuentes de pigmentos de origen sintético se han utilizado y han resultado eficientes para mantener la coloración de la piel del animal, la tendencia actual es restringir o abandonar su uso debido principalmente a problemas relacionados con su alto costo, estabilidad durante el procesado y sobre todo con la seguridad toxicológica. Los carotenoides sintetizados químicamente son especialmente sensibles a los procesos de oxidación, en menor medida que los carotenoides provenientes de fuentes naturales, más estables en su interacción con otros compuestos. En la actualidad la investigación se orienta a la detección de nuevas fuentes naturales de pigmentos carotenoides susceptibles de uso en los piensos para peces, tales como diferentes materias primas brutas (vegetales, levaduras, algas o krill), y los extractos y derivados industriales provenientes del procesado de éstos y otros productos alternativos como invertebrados marinos (cangrejos, langostinos y erizos). El alga verde *Haematococcus pluvialis* contiene  $\beta$ -caroteno (2.2%), astaxantina (no esterificada < 1%, monoéster 12.4%, diéster 28.8%), cantaxantina (44.3%) y luteína (11.4%). Este alga ha sido utilizada como fuente natural del carotenoide astaxantina con buenos resultados en la coloración de la piel en muchas especies de peces (Tejera *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2014). El extracto de pimentón, obtenido

a partir de extracto de pimiento rojo constituye también una fuente ideal de carotenoides para diferentes especies. Harinas vegetales como la de alfalfa también se han evaluado como fuente de pigmentos carotenoides, en este caso para colorear especies como boina roja en acuarios. En esta especie, Yanar *et al.* (2008) utilizaron dietas que incluían harina de alfalfa en proporciones de 0% a 40%, con niveles crecientes de carotenoides (0 a 160 mg/kg dieta). Estas dietas resultaron en mejoras en el color de la piel de hasta 25%. Los pigmentos generados a partir de levaduras como la *Phaffia rhodozyma*, bacterias marinas como la *Agrobacterium aurantiacum*, *Rhodospseudomonas palustris* y *Chlorococcum* sp, el alga *Chlorella zofingiensis*, *C. vulgaris* y *Spirulina platensis* son también excelentes fuentes naturales de carotenoides para la coloración de la piel en peces (Sun *et al.*, 2012).

Las harinas de crustáceos y sus coproductos presentan igualmente un alto potencial de uso como fuentes de carotenoides, especialmente la astaxantina contenida en el exoesqueleto. Estas harinas si bien tienen el problema de presentar un alto contenido en humedad, cenizas y quitina, tienen también un alto valor nutritivo que constituye un importante aporte de proteínas de alta calidad y de ácidos grasos omega 3 en las dietas. El krill está compuesto por pequeños crustáceos marinos que poseen un extraordinario valor nutritivo y alta concentración en astaxantina esterificada (100-150 mg/kg), y se utilizan en muchos trabajos donde ha sido demostrada su idoneidad para la coloración de la piel en especies como el bacalao común *Gadus morhua* (Karlsen, Suontama y Olsen, 2006) y bocinegro (Chebbaki, 2001; Schuchardt, *et al.*, 2008). Asimismo, los derivados del procesado de crustáceos poseen un extraordinario potencial nutricional, ya que mantienen un alto contenido de componentes de alto valor biológico, como minerales, lípidos,

aminoácidos esenciales, polisacáridos, vitaminas y pigmentos). La utilización de estos desechos como recursos dietéticos alternativos nace en parte de la necesidad de gestionar de forma adecuada y útil estos residuos, los cuales hasta ahora constituyen un serio problema de contaminación ambiental (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008). Estos subproductos suelen variar bastante en su concentración de carotenoides y por lo general contienen entre 37 y 147 mg/kg, de los que 98% es en su mayoría astaxantina esterificada (Shahidi y Synowiecki, 1999). La astaxantina proveniente en 40% de harina de carcasa de langostino (38mg de carotenoides/Kg) ha demostrado, en dietas para bocinegro, una coloración próxima a la natural en el animal (Kalinowski *et al.*, 2005, 2007). Se demostró posteriormente para esta misma especie que la inclusión en la dieta de 20% tanto de harina de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), como de mar (*Chaceon affinis* y *Paramola cuvieri*) mejora de forma significativa la coloración rojiza así como el contenido de pigmentos de la piel (García-Romero *et al.*, 2010, 2014a). Resultados posteriores en esta especie se han sido reportado con otras fuentes de subproductos marinos, como harina de erizo de mar (*Diadema africanum*). En este caso aumentó de forma significativa la concentración de pigmentos amarillos y no así de los rojos adecuados; la harina de erizo de mar es rica en el carotenoide equinenona (4-ceto- $\beta$ -caroteno), pigmento amarillo que proviene principalmente de las gónadas de este equinodermo (Miyuki, Amemiya y Matsuno, 1990).

### Coloración del filete de pescado

La pigmentación del músculo de ciertas especies como los Salmónidos es, después de la frescura del producto, uno de los factores más importantes en la orientación de compra del consumidor. Steine, Alfnes y Rørå (2005) demostraron cómo la coloración rojiza del filete de salmón (*Salmo salar*) condicionaba de forma positiva la opción de compra de los

consumidores frente a filetes no tan pigmentados, aun siendo más caros en el primer caso.

El color rojo-anaranjado característico del filete de los salmónidos proviene de la deposición de la astaxantina o la cantaxantina dietética. La astaxantina constituye la mayor proporción de pigmento del total de carotenoides encontrados en el filete de los salmónidos salvajes, y proviene mayormente del zooplancton del cual se alimentan en el medio natural. Aproximadamente 90% de la astaxantina en el filete se encuentra en forma no esterificada, mientras que sus formas esterificadas son predominantes en la piel (NRC, 1993). Se ha demostrado que en salmónidos, la astaxantina se absorbe mucho mejor a través del tracto digestivo que la cantaxantina, por lo que ofrece una mejor deposición de pigmentos en el filete (Choubert y Storebakken, 1989). Para la preservación de la coloración natural del filete se han evaluado, al igual que para la piel, diferentes fuentes de carotenoides tanto sintéticas (astaxantina y cantaxantina) (Storebakken *et al.*, 1987; Torrinsen, Hardy y Shearer, 1989; Storebakken y No, 1992), como de origen natural (harinas o aceites provenientes de crustáceos, algas y levaduras rojas). Actualmente se están investigando carotenoides provenientes de vegetales terrestres. Las harinas de crustáceos (exoesqueletos y descartes de langostino, de cangrejo y krill) mejoran notablemente la pigmentación en salmónidos (Spinelli y Mahnken, 1978; Coral-Hinostroza *et al.*, 1998) y también en platija (*Paralichthys lethostigma*) (González *et al.*, 2006). La pigmentación del filete de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en agua dulce mejoró significativamente tras la adición en dieta de aceite de krill antártico *Euphausia superba* (Arai *et al.*, 1987). Ciertas levaduras rojas como la *P. rhodozyma*, acumulan gran cantidad de astaxantina en sus células, por lo cual también se utilizan en muchas dietas comerciales destinadas a la pigmentación de

salmónidos de acuicultura, como el salmón atlántico (Bjerkeng *et al.*, 2007).

Los vegetales, por su parte, poseen un gran potencial como fuentes de carotenoides. Algunos experimentos han demostrado que los pigmentos provenientes de la harina y aceite de pimentón han dado buenos resultados en la coloración del músculo tanto de salmón como de trucha (Agius *et al.*, 2001; Yanar *et al.*, 2008), si bien con una eficacia menor que con pigmentos comerciales sintéticos. Los carotenoides de las microalgas, *Haematococcus pluvialis* y spirulina, también se han investigado con resultados satisfactorios en la coloración del filete (Teimouri, Keramat Amirkolaie y Yeganeh, 2013; Safari y Mehraban Sang Atash, 2015). Un estudio reciente muestra como la suplementación de harina de annato (200g/kg dieta) proveniente de la semillas de *Bixa orellana*, resultó ser una fuente efectiva de carotenoides naturales colorantes en filetes de trucha arcoíris tras un periodo de 126 días de alimentación (Safari y Mehraban Sang Atash, 2014).

La retención de los carotenoides en el filete es tanto mayor cuanto mayor sea la cantidad de pigmentos ingeridos, hasta un máximo nivel a partir del cual aumentos en la ingesta de pigmentos no produce mayor efecto (Torrissen, 1985). Sin embargo, la coloración del filete en los peces no depende únicamente del tipo y concentración dietética de pigmentos, sino también de factores biológicos, como la capacidad de absorción y transporte en sangre de estos pigmentos, que es característica de cada especie (Choubert *et al.*, 1995), el tamaño del pez, el estado de maduración sexual, la composición de la dieta, el nivel de ingesta y factores genéticos.

## Carotenoides y composición bioquímica

Son muy pocos los trabajos reportados sobre la inclusión de carotenoides en la dieta y los efectos en la composición bioquímica del filete de pescado. De hecho, la mayor parte de los trabajos en esta línea han sido realizados usando materias primas de diverso origen que incluyen estos pigmentos. La literatura muestra resultados contradictorios para estas fuentes de carotenoides dietéticos naturales, provenientes sobre todo de harina de diferentes especies de crustáceos, y los efectos encontrados parecen estar más relacionados con la composición de las propias harinas que de sus pigmentos. Así, algunos autores como Schuchardt *et al.* (2008) encuentran un incremento en el contenido de lípidos del filete tras la alimentación de bocinegros con dietas que contienen 20% de harina de krill, frente a otros como Chebbaki (2001) que muestran, por el contrario, una reducción de los mismos. Otras especies como el salmón atlántico (*Salmo salar*) y el fletán (*H. hipoglossus*) no ven alterada la composición de sus filetes tras ser alimentados con diferentes harinas de crustáceos y niveles (Olsen *et al.*, 2006; Suontama *et al.*, 2007). Yi *et al.* (2015), en un trabajo realizado con corvina amarilla (*Larimichthys croceus*), encontró que el contenido en lípidos totales del pez entero disminuyó significativamente tras ser alimentado durante nueve semanas con 20% de harina de carcasa de langostino como fuente de astaxantina natural en la dieta.

Con respecto a la composición en ácidos grasos, la inclusión de harinas de cangrejo tanto de mar (*Chaceon affinis* y *Paramola cuvieri*), como de río (*Procambarus clarkii*), incrementó el contenido total ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), altamente insaturados (HUFA), eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y, especialmente, araquidónico (ARA) el cual resultó significativamente mayor

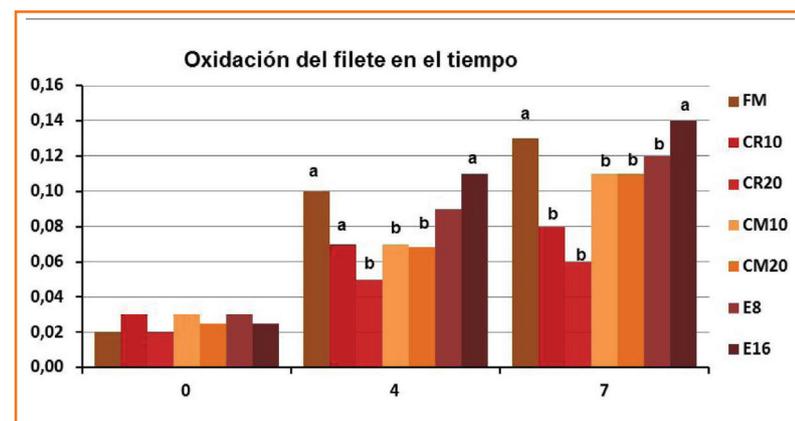
en todos los filetes alimentados con este tipo de fuente de carotenoides. Aunque se pudiera pensar en un efecto sinérgico de los carotenoides en la acumulación de ácidos grasos, lo cual no está demostrado, se encontró una correlación lineal entre el contenido de ARA de las harinas y el de los filetes (García-Romero *et al.*, 2014, 2014a). Otros autores también encuentran un aumento significativo de la relación w-3/w-6 en músculo de besugo, *Pagellus bogaraveo*, alimentado con 30% de inclusión de harina de crustáceos (10% de harina de krill y 20% de harina de caparazón de langostino), y de platija *Paralichthys lethostigma* y 5% de harina de cangrejo (González *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos evidenciaron una mejora de la calidad nutritiva del filete debido a un incremento significativo en el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados. Esto sugiere que la utilización de estas harinas en la dieta, incluso a baja concentración, puede mejorar la calidad final de producto no sólo en cuanto a coloración se refiere, sino también en la composición nutritiva del filete.

### Carotenoides y oxidación en tejidos

El consumo de pescado posee efectos benéficos para la salud humana, hecho que se debe en gran medida a la calidad de sus grasas poliinsaturadas omega 3 (PUFA). Éstas le confieren un carácter funcional al pescado. Estos ácidos grasos poliinsaturados tienen sin embargo la característica de ser muy susceptibles a la oxidación, perjudicando la estabilidad durante el procesado y almacenamiento de los filetes. El efecto antioxidante de los carotenoides tiene especial relevancia en los diferentes tejidos de los peces, como en la piel, ayudando a preservar el color en el filete, alargando su vida útil e incluso en el estatus oxidativo del animal como indicador de salud y bienestar.

La reducción de esta descomposición oxidativa en peces procedentes de acuicultura en los que el contenido total de grasas poliinsaturadas es normalmente alta ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos, muchos de ellos relacionados con el contenido de carotenoides en las dietas. Así, la adición dietética de astaxantina (25 y 50 mg/Kg) proveniente de la alga *H. pluvialis* no sólo confiere el color rojo característico de la piel del bocinegro, sino que además tuvo un papel beneficioso en la oxidación de la misma. Así, se observó un menor contenido en productos provenientes de la oxidación de los lípidos (Tejera *et al.*, 2007).

En especies de cultivo como los salmónidos que presentan un alto contenido de grasas insaturadas, el rol antioxidante de los carotenoides depositados en el filete juega un papel importante ya que evitaría la rancidez especialmente rápida



**FIGURA 3.** Oxidación temporal (0-7 días) de filetes de bocinegro alimentados con 7 dietas experimentales: (FM) control base harina de pescado; (CR) y (CM) harinas de cangrejo de río y de mar al 10% y 20% de sustitución de la proteína de pescado de FM; (E) harinas de erizo de mar al 8 %y 16% de sustitución de la proteína de pescado de FM.

en estas especies. Algunos trabajos como los de Christiasen *et al.* (1995), han demostrado este hecho al comprobar una mejora en el estado oxidativo del músculo del salmón tras ser alimentado con astaxantina sintética. Por otra parte, en especies de bajo contenido graso en filete (*lean fish*) y, por lo tanto, menos carotenoides al ser éstos sustancias liposolubles, se ha comprobado igualmente el efecto benéfico antioxidante de los carotenoides dietéticos. En trabajos recientes como en el realizado por Pham *et al.* (2014), se comprueba que la actividad antioxidante en músculo de la platija, *Paralichthys olivaceus*, se incrementa significativamente con dietas que contienen harinas de pimentón y de microalga *H. pluvialis* como fuente de carotenoides, a la concentración de 100mg/kg, mayoritariamente astaxantina. Otros autores como García-Romero *et al.* (2014, 2014a) han encontrado en

piensos para bocinegro que la sustitución parcial de la harina de pescado por harinas de cangrejo de mar (*Chaceon affinis* y *Paramola cuvieri*) y de río (*Procambarus clarkii*), ambas ricas en astaxantina, disminuyó la oxidación medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El estudio se llevó a cabo con filetes conservados en el refrigerador a lo largo de siete días (figura 3). Además del tiempo de suplementación, el tipo de pigmento juega un papel importante al presentar cada uno diferente capacidad antioxidante relativa. Así, en dietas que contienen la misma concentración de pigmentos, pero de diferentes orígenes, se ha observado que frente a la harina cangrejo rica en astaxantina, la harina de erizo rica en equinenona presenta menor efecto antioxidante en los filetes, lo cual pone en relieve el diferente potencial entre pigmentos (García-Romero *et al.* 2014a).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la financiación de parte de los resultados presentados en el presente capítulo a los proyectos: AGL2006-12888 Ministerio de Economía e Innovación del Gobierno de España (Harinas de algas y de cangrejo y subproductos de las mismas como ingredientes alternativos a la harina de pescado en dietas para bocinegro (*pagrus pagrus*): efectos digestivos y metabólicos y repercusiones en la calidad del producto acabado); PI2007-048 Gobierno Autónomo de Canarias a través de Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (Viabilidad del uso de crustáceos de aguas profundas de canarias en dietas para acuicultura) y UNLP10-3E-984 Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España a través de Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (Equipamiento para la producción a escala piloto de harinas y aceites de productos y subproductos del sector primario, principalmente de la pesca y la acuicultura).

## REFERENCIAS

- Agius, R.V., Watanabe, T., Satoh, S., Kiron, V., Imaizum, H., Yamazaki, T., Kawano, K. 1991. *Aquac. Res.* 32: 263-272.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2001. *Aquac. Res.* 32: 162-173.
- Arai, S., Mori, T., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S., Satake, M., Fujita, T. 1987. *Aquac.* 66: 255-264.
- Arvanitoyannis, I.S. y Kassaveti, A. 2008. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 726-745.
- Barbosa, M.J., Morais, R., Choubert, G., 1999. *Aquac.* 176: 331-341.
- Bell, G., McEvoy, J., Tocher, D.R. y Sargent, J.R., 2000. *J. Nutr.* 130: 1800-1808.
- Bjerkgeng, B., Folling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N. 1997. *Aquac.* 157: 63-82.
- Büyükçapar, H.M., Yanar, M., Yanar, Y., 2007. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31: 7-12.
- Campbell, B. y Pauly, D. 2013. *Marine Policy* 39: 94-100. Disponible en: [http://www.strategyr.com/Carotenoids\\_Market\\_Report.asp](http://www.strategyr.com/Carotenoids_Market_Report.asp)
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Doñate Jimeno, C., Vardanis, G., Sterioti, A., Divanach, P. 2005. *Aquac. Res.* 36: 1517-1525.
- Chebbaki, K., 2001. "Efecto de la nutrición sobre la coloración de la piel y la calidad del filete en bocinegro, *Pagrus pagrus*". Tesis. II Máster Internacional en Acuicultura de la Universidad de Las Palmas.
- Choubert, G. y Storebakken, T., 1989. *Aquac.* 81: 69-77.
- Choubert, G., Milicua, G., Gómez, R., Sancé, S., Petit, H., Négres-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J.P. 1995. *Aquac. Int.* 3, 1-12.
- Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O.J., Waag, R., 1995. *J. Fish Dis.* 18: 317-328.
- CIE, 1976. Official Recommendations on Uniform Colour Space, Colour Difference Equations and Metric Colour Terms. Suppl. Núm. 2 CIE Publication 15, Colorimetry. Comisión Internacional de l'Eclairage, París.
- Coral-Hinostroza G., Huberman H., De la Lanza G., Monroy-Ruiz J., 1998. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 7: 31-45.
- Doolan, B.J., Geoff L., A., Mark, A., Booth, P., Jones, L. 2008. *Aquac. Res.* 39: 1423-1433.
- FAO, Fisheries Department 2011. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Roma.
- FAO, Fisheries Department 2013. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Roma.

## REFERENCIAS

- FAO, Fisheries Department 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2013*. Roma.
- FIAAP, 1, 2013.
- Foss, P., Storebakken, T., Austreng, E. y Liaaen-Jensen, S. 1987. *Aquac.* 65: 293-305.
- Fujii, R. 2000. *Pigment Cell Res.* 13: 300-319.
- García-Romero, J., Kalinowski, T., Izquierdo, M.S., Robaina, L. 2010. *Aquac. Res.*, 41: 1759-1769.
- García-Romero, J., Ginés, R., Izquierdo, M., Robaina, L. 2014. *Aquac.* 420-421: 231-239
- García-Romero, J., Ginés, R., Izquierdo, M., Haroun, R., Badilla, R., Robaina, L. 2014a. *Aquac.* 422-423: 239-248.
- Gomes, E., Dias, J., Silva, P., Valente, J., Empis, J., Gouveia, L., Bowen, J., Young, A., 2002. 214: 287-293.
- González, S., Flick, G.J., O'Keefe, S.F., Ducan, S.E., Mclean, E., Craig, S.R., 2006. *J. of Aqua. Food Product Technology* 15: 69-79.
- Goodwin, T.W., 1984. *The Biochemistry of the Carotenoids*. second ed. Vol. II. Animals, Londres: Chapman & Hall.
- Grether, G.F. Kasahara, S., Kolluru, G.R., Cooper, E.L. 2004. *Proc. R. Soc. Lond.* 271: 45-49.
- Grigorakis, K. (2007). *Aquac.* 272: 55-75.
- Ha, B.S., Kang, D.S., Kim, J.H., Choi, O.S., Ryu, H.Y. 1993. *Bull.Korean Fish.* 38: 331-338.
- Hancz, C., Magyary, I., Molnar, T., Sato, S., Horn, P., Taniguchi, N., 2003. *Fish. Sci.* 69: 1158-1161.
- Hynes, N., Egeland, E.S., Koppe, W., Baardsen, G., Kiron, V., 2009. *Aquac. Nutr.* 15: 202-208.
- Kalinowski, T., Robaina, L., Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Izquierdo, M.S. 2005. *Aquac.* 244: 223-231.
- Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Schuchardt, D., Robaina, L.E., 2007. *Aquac.* 272: 451-457.
- Karlsen, Ø., Suontama J. y Olsen, R.E. 2006. *Aquac. Res.* 37: 1676-1684.
- Kiron, W., 2012. *Animal Feed Science and Technology* 173: 111-133.
- Li, M.H., Robonson, E.H., Oberle, D.F., Zimba, P.V. 2007. *J.World Aquaculture Society* 38: 557-563.
- Liebler, D.C., 1993. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691: 20-31.
- Lorenz, T.R. 1998. *Naturese Technical Bull* 52.
- Minh, A.P., Hee-Guk, B., Kyoung-Duck, K., Sang-Min L. 2014. *Aquac.* 431: 65-72.

## REFERENCIAS

- Miyuki, T., Amemiya, S., Matsuno, T. 1990. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry* 96: 801-810.
- NRC National Research Council. 1993. *Nutrient requirements of fish*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Olsen, R.E., Suontama, J., Langmyhr, E., Mundheim, H., Ringø, E., Melle, W., Malde, M.K., Hemre, A.I. 2006. *Aquac. Nutr.* 12: 280-290.
- Osterlie, M., Bjerkeng, B. y Liaaen-Jensen, S., 1999. En Mosquera, M.I.M., Galán, M.J., Méndez, D.H. (eds.), *Pigments in Food Technology. Proceedings 1 Int. Congr. Pigments in Food Technology*, Sevilla, 157-161.
- Pham, M., Hee-Guk, B., Kyoung-Duck, K., Sang-Min, L. 2014. *Aquac.* 431: 65-72.
- Pavlidis, M, Papandroulakis, N., Divanac, Minh A.P., Hee-Guk, B., Kyoung-Duck, K., Sang-Min, L. 2006. *Aquac.* 258: 211-219.
- Safari, O., Mehraban Sang Atash, M., 2014. Study on the different levels of annatto (*Bixa orellana*) seed meal in the diet on some biological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (Project no: 20805)*.
- Safari, O., y Mehraban Sang Atash, M., 2015. *Aquac.* 437: 275-281.
- Schiedt, K., Vecchi, M. y Glinz, E. 1986. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 9-12.
- Schuchardt, D., Vergara, J.M., Fernández Palacios, H., Kalinowski, C.T., Hernández Cruz, C.M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., 2008. *Aquac. Nutr.* 14: 1-9.
- Shahidi, F., Arachchi J.V.K., Jeon, Y.J. 1999. *Trends in Food Science & Technology* 10 : 37-51.
- Shahidi, F., Metusalach, A. y Brown, J.A., 1998. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 1-67.
- Spinelli, J. y Mahnken, C., 1978. *Aquac.* 13: 213 -223.
- Steine, G., Alfnes, F. y Rørå, M.B. 2005. *Marine Res. Econ.* 20: 211-219.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S., Mainz, U., 1987. *Aquac.* 65: 279-292.
- Storebakken, T. y No, H.K., 1992. *Aquac.* 100: 209-229.
- Storebakken, T., Sørensen, M., Bjerkeng, B., Hiu, S., 2004. *Aquac.* 236: 391-403.
- Suontama, J., Kiessling, A., Melle, W., Waagbø R., Olsen, R.E. 2007. *Aquac. Nutr.* 13: 50-58.
- Sun, X., Yu C., Yuantu Y., Zhihong M., Yongjun L., Tieliang L., Na, J., Wei, X., Lin, L. 2012. *Aquac.* 342-343: 62-68
- Teimouri, M., Keramat Amirkolaie, A., Yeganeh, S., 2013. *Aquac.* 396-399: 14-19.

## REFERENCIAS

- Tejera, N., Cejas, J.R., Rodríguez, C., Bjerkg, B., Jerez, S., Bolaños, A., Santamaría, F.J. y Lorenzo, A., 2007. *Aquac.* 270: 218-230.
- Torrissen, O.J., 1985. *Aquac.* 46: 133-142.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W. y Shearer, K., 1989. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 209-225.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D., Scott, T.M., Stone, F.E., 1990. *Aquac.* 88: 351-362.
- Torrissen, O.J., Christiansen, R., Struknæs, G., Estermann, R., 1995. *Aquac. Nutr.* 1: 77-84.
- Undeland, I., Hall, G. y Lingnert, H., 1999. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 524-532.
- Waagbo, R., Hamre, K., Bjerkas, E., Berge, R., Wathne, E., Lio, O., Torstensen, B., 2003. *J. Fish Dis* 26: 213-229.
- Wang, Y.J., Chien, Y.H., Pan, C.H. 2006. *Aquac.* 261: 641-648.
- Yanar, M., Erçen, Z., Hunt, A.Ö., Büyükçapar, H.M. 2008. *Aquac.* 284: 196-200.
- Yi, Xinwen, Jun Li, Wei Xu, Huihui Zhou, Amanda A. Smith, Wenbing Zhang, Kangsen Mai, 2015. *Aquac.* 441: 45-50.

# CAROTENOIDES Y GANADERÍA

Rocío Álvarez, María Jesús Alcalde



## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides biosintetizados por organismos fotosintéticos, algunas bacterias no fotosintéticas y algunos hongos. Los mamíferos no pueden sintetizarlos pero pueden incorporarlos a través de la dieta (Mínguez-Mosquera, 1997). Tanto los carotenoides como sus metabolitos están involucrados en numerosas funciones (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander 2008). Así, una de las principales funciones de algunos de ellos en los mamíferos es la de ser precursores de la vitamina A o retinol (Schweigert, 1998), que es un nutriente esencial para el crecimiento y la diferenciación celular, la reproducción, el mantenimiento del sistema inmune y la visión (Ortega, Mena y Andrés, 2005). El retinol no puede ser sintetizado *de novo* en el reino animal por lo que, además de incorporarlo a través de la dieta, se puede obtener a partir de carotenoides con actividad de provitamina A. Los carotenoides con actividad de provitamina A más importantes en la dieta son  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina (Lietz *et al.*, 2012).

Por otra parte, existe un creciente interés de los consumidores por alimentos saludables y nutritivos con funciones adicionales que fomenten la salud (Olmedilla-Alonso, Jiménez-Colmenero y Sánchez-Muniz, 2013). En este sentido, los consumidores prestan cada vez más atención tanto a la “imagen verde” como a las propiedades saludables de los productos de animales alimentados con pasto (Dian *et al.*, 2007; Nozière *et al.*, 2006; Prache, Priolo y Grolier 2003a; Sheath, Coulon y Young, 2001). Esta preocupación de los consumidores por el sistema de producción animal (Dian *et al.*, 2007) incentiva que la investigación se centre en la autenticación de productos que provienen de animales herbívoros, por lo que se están haciendo esfuerzos para desarrollar herramientas analíticas que permitan identificar y cuantificar compuestos específicos de la dieta en el tejido animal que puedan servir como indicadores de las condiciones de explotación (Engel *et al.*, 2007). Estos compuestos se transfieren desde el alimento hasta el producto final, por lo que es razonable pensar que pueden usarse, de alguna forma, para autenticar la dieta animal y, de esta manera, ayudar a dar confianza a los consumidores a la hora de conocer la procedencia de los productos animales y cómo se producen (Sheath, Coulon y Young, 2001; Dian *et al.*, 2007). Los carotenoides son ejemplos de esos compuestos que pueden servir para diferenciar los animales alimentados con pasto de los alimentados con concentrado (Dian *et al.*, 2007; Zawadzki, Prado y Prache, 2013).

## OXIGENASAS: ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ROTURA DE LOS CAROTENOIDES

Los organismos vivos pueden transformar los carotenoides generando metabolitos como los apocarotenoides y los

retinoides, los cuales están implicados en importantes actividades en la naturaleza. Los retinoides ( $C_{20}$ ) son compuestos que pueden actuar como importantes moléculas de señalización y como cromóforos de ftopigmentos (Lobo *et al.*, 2012). La escisión de carotenoides en retinoides o apocarotenoides está catalizada por enzimas oxigenasas de rotura de carotenoides (*carotenoid cleavage oxygenases* CCO). El genoma de los mamíferos codifica, al menos, dos de estas enzimas. La  $\beta,\beta$ -caroteno 15,15' monooxigenasa 1 (CCO1) escinde la molécula de  $\beta$ -caroteno por el centro dando lugar a dos moléculas de *trans*-retinal, que a su vez es oxidado irreversiblemente a ácido retinoico por acción de la enzima retinol deshidrogenasa o reducido reversiblemente a retinol por la enzima retinol reductasa. La CCO1 es considerada la enzima clave para la conversión de  $\beta$ -caroteno en vitamina A. La otra enzima de escisión de carotenoides, la  $\beta,\beta$ -caroteno 9',10' dioxigenasa (CCO2) rompe la molécula de  $\beta$ -caroteno por el doble enlace 9',10' formando  $\beta$ -apo-10'-carotenal y  $\beta$ -ionona (Lietz *et al.*, 2012; Lobo *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción de la CCO1 requiere, al menos, un anillo  $\beta$ -ionona no sustituido, por lo tanto la actividad de esta enzima está limitada principalmente a  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y algunos  $\beta$ -apocarotenoides. En cambio, la CCO2 presenta una especificidad de sustrato más amplia ya que también puede escindir carotenoides no provitamínicos a nivel de los dobles enlaces 9,10 y 9',10' dando lugar tanto a apocarotenoides no volátiles como a derivados volátiles. Además, la CCO1 y la CCO2 están localizadas en compartimentos intracelulares diferentes, la CCO1 se encuentra en el citoplasma, mientras que la CCO2 es una proteína mitocondrial. Esta localización diferente sugiere que el metabolismo de los carotenoides está compartimentado, de forma que  $\beta$ -caroteno se metaboliza en el citoplasma por la

CCO1, mientras que otros carotenoides se metabolizan en las mitocondrias por la CCO2 (Lietz *et al.*, 2012; Amengual *et al.*, 2013; Mein *et al.*, 2011).

En los mamíferos la CCO1 se expresa en las células glandulares y mucosas del estómago, intestino delgado y colon así como en los hepatocitos y células del páncreas, próstata, endometrio y tejido mamario, riñón y células de la piel, células del músculo esquelético y también células de los testículos, ovarios y glándula adrenal. Asimismo, la CCO1 también se encuentra en el epitelio pigmentario de la retina y en el cuerpo ciliar del ojo. Por otra parte, la CCO2 puede encontrarse en casi todos los tipos de células conocidas que expresan CCO1 pero a niveles más bajos. Además, la expresión de ambas CCO en el hígado es diferente, de forma que en los hepatocitos (células parenquimatosas involucradas en la absorción y metabolismo del retinol) pueden encontrarse altos niveles de CCO2, mientras que en las células estrelladas (células hepáticas que almacenan grasas), que juegan un papel fundamental en el almacenamiento hepático de retinoides, existen altos niveles de CCO1 (Lietz *et al.*, 2012).

En resumen, se conocen dos enzimas que metabolizan carotenoides. La CCO1 es una enzima citosólica específica para carotenoides pro-vitamina A, mientras que la CCO2 es una enzima mitocondrial con una especificidad de sustrato más amplia (Lobo *et al.*, 2012).

## PRESENCIA DE CAROTENOIDES EN LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO

Los principales sistemas de cría y, en consecuencia, de alimentación utilizados en ganadería son el sistema extensivo

(alimentación en base a pastoreo) y el sistema intensivo (alimentación en pesebre), pero existen diferentes opciones intermedias. En el sistema extensivo los animales se alimentan permanentemente de pasto sin que se les ofrezca ningún concentrado. En contraposición, en los sistemas intensivos, los animales están estabulados bajo techo recibiendo una dieta basada en concentrados (Zervas y Tsiplakou, 2011).

## Forrajes

El forraje se refiere a la parte vegetativa de plantas de praderas naturales, artificiales o segadas (pastizal), pastos de montaña, ensilado, heno, paja y restos verdes de cosecha de especies anuales o perennes de tierra cultivable. Los pastos frescos suelen presentar concentraciones más altas de carotenoides ya que el contenido de estos compuestos suele disminuir tras la cosecha y el almacenamiento, normalmente debido a oxidación por exposición a la luz solar (Dunne *et al.*, 2009). Es más, la pérdida de carotenoides en los forrajes puede estar favorecida por varios factores, como las prácticas de fertilización, empaquetamiento del silo, marchitez, fermentación o almacenamiento. Sin embargo, el perfil de carotenoides en el tejido verde de la planta es, con muy pocas excepciones, muy constante. Así, los principales carotenoides presentes son  $\beta$ -caroteno y las xantofilas: luteína, violaxantina y neoxantina; además pueden encontrarse, en menor cantidad, zeaxantina, anteraxantina y  $\beta$ -criptoxantina, entre otros. Sin embargo se han descrito importantes diferencias en la concentración de carotenoides entre especies botánicas (Chauveau-Duriot *et al.*, 2005). También es frecuente encontrar diferencias importantes dentro de una misma especie debido a diversos factores como el clima, la estación del año, el genotipo, etc. Por ejemplo, se ha demostrado que la concentración de  $\beta$ -caroteno y luteína en forrajes verdes

puede ser dos o tres veces mayor para la misma especie según se encuentre en trópicos húmedos o secos (Nozière *et al.* 2006a; Mínguez-Mosquera, 1997).

## Piensos concentrados

Los alimentos concentrados suponen una fuente mayor de energía y proteína que los forrajes. Esta dieta suele asociarse a animales estabulados y, en el caso de los rumiantes, puede usarse para suplementar una dieta basada en pasto. Los concentrados suelen estar compuestos por granos enteros de cereales o por proporciones específicas de ingredientes individuales, teniendo cada uno de ellos un papel nutricional específico (Dunne *et al.*, 2009). Es difícil encontrar datos confiables de composición en lo concerniente a carotenoides en alimentos concentrados para animales debido a que su elaboración implica la aplicación de tratamientos térmicos, favoreciéndose la degradación de estos compuestos (Dunne *et al.*, 2009; Nozière *et al.*, 2006). Sin embargo, sí hay cierta información disponible respecto al contenido en carotenoides en cereales. Así, por ejemplo, los pigmentos predominantes en el maíz son luteína y zeaxantina, con bajas cantidades de otras xantofilas como  $\beta$ -criptoxantina o zeinoxantina (Nozière *et al.*, 2006).

## Subproductos industriales usados en alimentación animal

La mayor restricción en la productividad del ganado es la escasez de forrajes y algunas fuentes de alimento, lo que implica mayores costos de alimentación para cubrir las necesidades de los animales; por eso existe una gran preocupación de los ganaderos que tratan de controlar estos costos de producción mediante la elección de sistemas de

alimentación adecuados (Morand-Fehr *et al.*, 2007; Valizadeh y Sobhanirad, 2009). Los subproductos agroindustriales pueden jugar un papel significativo en la nutrición del ganado, ya que tienen un costo menor y, por lo tanto, pueden ayudar a disminuir los costos de alimentación (Valizadeh y Sobhanirad, 2009). En este sentido, el uso de subproductos vegetales de invernaderos puede suponer una fuente de suplementación de bajo costo en nutrición animal (Márquez, Diáñez y Camacho, 2010). Un ejemplo de estos subproductos es la pulpa de cítricos, como la naranja. El característico color naranja tanto de la piel como de la pulpa de la mayoría de las variedades de naranjas maduras se debe a la presencia de numerosos carotenoides (violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, zeinoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno), haciéndose dicho perfil más complejo tras el procesamiento y almacenamiento industrial que puede provocar la formación de 5,8-epóxidos y otras isomerizaciones (Meléndez-Martínez *et al.*, 2008). Asimismo, los productos derivados de la industria de procesamiento del tomate, que suponen una importante fuente de licopeno, pueden usarse en alimentación del ganado (Ruiz-Celma, Cuadros y López Rodríguez, 2012).

## CAROTENOIDES EN RUMIANTES

La naturaleza de la dieta ingerida por los animales influye en la composición de los productos de origen animal, así por ejemplo los carotenoides están relacionados con las propiedades sensoriales y nutricionales de los productos lácteos (Agabriel *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2007). Por esta razón, se ha estudiado ampliamente el efecto de la dieta en la presencia de carotenoides en diferentes tejidos y productos en ganado vacuno (Engel *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2007;

Calderón *et al.*, 2007; Chauveau-Duriot *et al.*, 2010; Dunne *et al.*, 2006; Röhrle *et al.*, 2011; Rafałowski *et al.*, 2014). Este tema ha sido también muy estudiado en ganado ovino (Dian *et al.*, 2007, 2007a; Prache *et al.*, 2009; Prache, Priolo y Grolier, 2003; Cardinault *et al.*, 2006; Prache y Theriez, 1999; Yang *et al.*, 2010). Sin embargo, en ganado caprino se han llevado a cabo muchos menos estudios (Morand-Fehr *et al.*, 2007; Fedele *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2008, 2008a; Yang, Larsen y Tune, 1992). Además, a pesar de que las tres especies son rumiantes, se han encontrado diferencias en el metabolismo y la acumulación de carotenoides y retinoides entre ellas (Schweigert, 1998; Yang, Larsen y Tune, 1992).

## Metabolismo

Schweigert (1998) propuso que, basándose en la acumulación de carotenoides en el tejido adiposo, los mamíferos pueden dividirse en dos grupos: animales de “grasa blanca” y animales de “grasa amarilla”. El primer grupo está formado por las especies que no absorben carotenoides o que lo hacen a niveles muy bajos. Los animales del segundo grupo son aquellos que sí absorben carotenoides eficientemente. En el caso de los rumiantes, el ganado vacuno pertenece al segundo grupo y los pequeños rumiantes al primero (Schweigert, 1998). Además, Yang, Larsen y Tune (1992) sugirieron que las tres especies de rumiantes presentan diferentes mecanismos para la absorción, deposición y metabolismo de los carotenoides, ya que el color de la grasa resulta principalmente de la acumulación de carotenoides procedentes de la dieta y la grasa del ganado vacuno suele presentar un color más amarillo que la de los pequeños rumiantes (Schweigert 1998). En este sentido se ha visto que en ganado vacuno,  $\beta$ -caroteno es el principal carotenoide presente en el suero y en el tejido adiposo (Chauveau-Duriot *et al.*, 2010; Röhrle

*et al.*, 2011; Yang, Larsen y Tune, 1992). Sin embargo, el principal carotenoide presente en tejidos ovinos es luteína, cuya presencia también se ha demostrado, aunque a niveles muy bajos, en el suero y el tejido adiposo del ganado caprino (Yang, Larsen y Tune, 1992). Asimismo, existen estudios que demuestran una actividad más baja de la CCO1 intestinal en ganado vacuno en comparación con ganado caprino (Mora *et al.*, 2000, 2000a), así como una conversión de  $\beta$ -caroteno en retinol, catalizada por la CCO1 intestinal, más eficaz en ovino que en vacuno (Cardinault *et al.*, 2006). De hecho, se asume que, en ovino, prácticamente todo el  $\beta$ -caroteno absorbido se transforma en retinol. Esto no se cumple en el caso del ganado vacuno y, por lo tanto, dicho pigmento aparece como el principal carotenoide en el plasma y algunos tejidos en este ganado; mientras que en ovino sólo se han detectado trazas de  $\beta$ -caroteno (Cardinault *et al.*, 2006). Es más, estudios previos (Schweigert, 1998) establecieron que el transporte de  $\beta$ -caroteno en plasma de vacuno se produce asociado a lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein* HDL). En este sentido, se ha observado que la mayor fracción de lipoproteínas (más de 80%) en el plasma de rumiantes es HDL, seguido por lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein* LDL) (12.8 a 16.6%) y lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein* VLDL) (0.9 a 2.3%) (Yang, Larsen y Tune 1992). Además, Yang Larsen y Tune (1992) encontraron que los carotenoides en plasma de bovino están distribuidos de manera aproximadamente proporcional entre VLDL, LDL y HDL. Mientras que, en el caso de los pequeños rumiantes, los carotenoides están principalmente asociados con la fracción VLDL + LDL (67.3% en ovino y 57.7% en caprino) a pesar de la mayor proporción de la fracción HDL en su plasma, lo que puede ayudar a explicar las diferencias en el transporte de carotenoides en sangre entre las tres especies de rumiantes.

## Plasma

Las concentraciones de carotenoides y retinol en plasma de rumiantes reportadas en la bibliografía varían bastante según los estudios (tabla 1). De esta manera, el  $\beta$ -caroteno sólo aparece en plasma de vacuno (Agabriel *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2007; Chauveau-Duriot *et al.*, 2010; Yang, Larsen y Tune, 1992) apoyando la hipótesis sobre la baja actividad de la CCO1 en este ganado. Además, la mayoría de los estudios llevados a cabo en ovino expresan los carotenoides en plasma como concentración de carotenoides en plasma (*plasma carotenoid concentration* PCC), asumiendo que el único carotenoide circulante en estos animales es luteína (Dian *et al.*, 2007, 2007a; Serrano *et al.*, 2007; Prache, Priolo y Grolier, 2003a; Prache *et al.*, 2009; Zawadzki, Prado y Prache, 2013) (Finalmente, pocos estudios (Yang, Larsen y Tune, 1992) se han llevado a cabo sobre el perfil de carotenoides en plasma de caprino. Los datos resumidos en la tabla 1 apoyan la hipótesis sobre las diferentes formas de transporte de carotenoides y su metabolismo en las tres especies de rumiantes.

Además de luteína y  $\beta$ -caroteno, se han reportado en la bibliografía, otros carotenoides de menor importancia en ganado vacuno. Así, se ha descrito un isómero de  $\beta$ -caroteno identificado provisionalmente como (13Z)- $\beta$ -caroteno (Calderón *et al.*, 2007; Chauveau-Duriot *et al.*, 2010) en plasma de vacuno alimentado con una dieta a base de pasto, concentrado y forraje. Según Calderón *et al.* (2007) el lugar exacto de la isomerización de  $\beta$ -caroteno sigue siendo desconocido aunque son buenos candidatos, el rumen, los enterocitos, el hígado, el plasma y los tejidos periféricos, incluyendo el tejido adiposo y la glándula mamaria. Además, Calderón *et al.* (2007) identificaron, por primera vez, en plasma de bovino la

zeaxantina (2.7% del total de los carotenoides detectados en plasma) aunque no lo encontraron en leche.

Por otro lado, existen numerosos estudios respecto el efecto de la dieta en la concentración de carotenoides en plasma de rumiantes (Dian *et al.*, 2007, 2007a; Prache, Priolo y Grolier, 2003a; Serrano *et al.*, 2007; Prache *et al.*, 2009). Todos estos estudios concluyen que los niveles de carotenoides en plasma de rumiantes dependen de la dieta (tabla 1). De esta manera, la concentración de estos pigmentos en plasma aumenta linealmente con la media de la ingesta diaria de carotenoides (Dian *et al.*, 2007). Prache, Priolo y Grolier (2003a), compararon la persistencia de los carotenoides en plasma de corderos con cuatro tipos de alimentación: sólo pasto, concentrado (corderos estabulados), pastoreo con un periodo de estabulación corto y pastoreo seguido de un periodo de estabulación largo. Estos autores demostraron que la persistencia de los carotenoides en sangre es pequeña puesto que tras un periodo de finalización en estabulación de cuatro a 13 días, el contenido de carotenoides en plasma de los corderos disminuyó hasta alcanzar valores similares a los de los corderos alimentados sólo a base de concentrado. Esto significa que usando este método de trazabilidad, los corderos de pastoreo acabados con concentrado serán considerados como alimentados con pasto durante los primeros 4-13 días del periodo de acabado y como estabulados a partir de ahí. Esto parece indicar que la PCC depende directamente de la dieta del último periodo antes del sacrificio de los animales.

## Leche

La tabla 1 presenta datos de la bibliografía respecto al contenido de carotenoides y retinol en leche de las tres especies rumiantes. En la tabla se puede observar cómo

**TABLA 1.** Efecto de la dieta sobre los niveles de luteína,  $\beta$ -caroteno y retinol en leche y plasma de rumiantes

Referencia	Especie	Dieta	Luteína		$\beta$ -caroteno		Retinol	
			Leche	Plasma	Leche	Plasma	Leche	Plasma
Yang, Larsen y Tume, 1992	Oveja	Pasto		0.006 b				0.35
	Cabra	Pasto		0.004 a				0.35
	Vaca	Pasto		0.057 c		2.19		0.28
Mora <i>et al.</i> , 2000	Vaca	Concentrado				0.002		1.8
Prache <i>et al.</i> , 2003	Oveja	Hierba		0.063a				
		Estabulado		0.012 b				
		Hierba +estabulación corta-acabado		0.009 bc				
		Hierba + estabulación larga-acabado		0.007 c				
Fedele <i>et al.</i> , 2004 <sup>3</sup>	Cabra	Pasto					650.5 a	
		Concentrado					498.6b	
Agabriel <i>et al.</i> , 2007 <sup>4</sup>	Vaca	Ensilado de maíz + praderas temporales y praderas permanentes + heno de pradera temporal y heno de pradera permanente	0.37		4.4			7.6
			0.46		4.4			7.3
			0.49		3.8			6.3
Calderón <i>et al.</i> , 2007 <sup>5</sup>	Vaca	Hierba (heno + ensilado + alfalfa) + concentrado	0.024	0.50	0.10	4.40	0.18	0.44
Dian, <i>et al.</i> , 2007 <sup>2</sup>	Oveja	Pasto		0.075 a				
		Concentrado		0.010 b				
Dian <i>et al.</i> , 2007 <sup>2</sup>	Oveja	Pasto		0.112				
		Concentrado + alfalfa		0.003				
Kondyli <i>et al.</i> , 2007 <sup>5</sup>	Cabra	Pasto					0.13	
Serrano <i>et al.</i> , 2007 <sup>2</sup>	Vaca	Pasto					5.92 a	
		Concentrado (heno)					0.18 b	
Prache <i>et al.</i> , 2009 <sup>2</sup>	Oveja	Pasto		0.103				
		Alfalfa deshidratada (alimentación en pesebre)		0.079				
Chauveau-Duriot <i>et al.</i> , 2010 <sup>5</sup>	Vaca	Forraje			0.22	1.85	0.19	0.67

Referencia	Especie	Dieta	Luteína		β-caroteno		Retinol	
			Leche	Plasma	Leche	Plasma	Leche	Plasma
Gentili <i>et al.</i> , 2013 <sup>5</sup>	Vaca	Pasto	0.01		0.24		2.1	
	Oveja		0.01				4.3	
	Cabra						4.3	
Zawadzki, Do Prado y Prache, 2013 <sup>2</sup>	Oveja	Concentrado + alfalfa + cebada		0.108-0.129				

Los promedios en la misma columna y en el mismo experimento con diferentes letras (a, b y c) difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> μg/mL

<sup>2</sup> PCC: Estimación aproximada del total de la concentración de carotenoides de plasma, teniendo en cuenta que la luteína es el único carotenoide en el suero de ovejas.

<sup>3</sup> Concentración en leche expresado como μg/ 100 DM

<sup>4</sup> Concentración en leche expresado como μg/ g grasa

<sup>5</sup> Concentración en leche expresado como μg/ mL leche

modificar la alimentación del ganado es un medio eficiente para modular la concentración de los carotenoides y la vitamina A en la leche (Chauveau-Duriot *et al.*, 2010). De esta manera, dietas basadas en pastoreo están asociadas a niveles mayores de carotenoides y retinol (Agabriel *et al.*, 2007; Fedele *et al.*, 2004).

Es más, se ha constatado (Hulshof *et al.*, 2006) que el perfil de carotenoides en la leche varía según la especie. En este sentido, Gentili *et al.* (2013) señalan que la leche de los pequeños rumiantes es muy rica en vitamina A, pero la leche de bovino es la única que contiene carotenoides (tabla 1). Además, algunos autores (Fedele *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2008; Kondyli, Katsiari y Voutsinas, 2007) indicaron la presencia de retinol pero no de carotenoides en leche de cabra. Esto parece deberse a la alta conversión enzimática de β-caroteno en retinol en cabra y oveja comparado con vaca (Lucas *et al.*, 2008; Gentili *et al.*, 2013). Por otra parte, Calderón *et al.* (2007) señalaron que en vacuno, cuando la concentración

de β-caroteno en plasma excede 5 μg/ml, existe una limitación del mecanismo responsable del transporte de este carotenoide del plasma a la leche. Dicha limitación puede deberse a una absorción limitada en la glándula mamaria o a un transporte limitado por la asociación a β-lactoglobulina o a la saturación de los glóbulos de grasa de la leche. Estas afirmaciones, junto con la baja actividad de la CCO1 en vacuno, pueden explicar a su vez la presencia de β-caroteno en leche de vaca pero no en la leche de oveja y cabra y, por consiguiente, el color amarillento de la leche de vaca.

## Tejido adiposo

De nuevo, el análisis de la bibliografía (Yang, Larsen y Tume, 1992) conduce rápidamente a la conclusión de que hay diferencias específicas entre especies (ganado vacuno y pequeños rumiantes) en la deposición de carotenoides en los tejidos. Yang, Larsen y Tume (1992) confirmaron que, mientras que el ganado vacuno absorbe tanto luteína como β-caroteno,

la luteína era el único carotenoide en el tejido adiposo de ovino y caprino, aunque la cantidad en este último fue insignificante comparado con los carotenoides presentes en vacuno (tabla 2). Así, se piensa (Yang, Larsen y Tume, 1992) que el color blanco de la grasa de ovejas y cabras se debe a la baja concentración de carotenoides en estos animales.

Además, el color de la grasa de la canal bovina es un componente importante en su calidad y, por lo tanto en los

sistemas de clasificación (Dunne *et al.*, 2009). La grasa amarilla está positivamente asociada con la producción tradicional de carne de ternera con base en pastoreo, y se percibe como un criterio positivo de calidad por estar más “acorde” con una producción ecológica, lo que puede influir en la decisión de compra del consumidor (Dunne *et al.*, 2009). En este sentido, se ha comprobado (Dunne *et al.*, 2006; Röhrle *et al.*, 2011) que el tejido adiposo del ganado vacuno alimentado con pasto tiene niveles más altos de  $\beta$ -caroteno y luteína que el

**TABLA 2.** Efecto de la dieta sobre el contenido en luteína,  $\beta$ -caroteno y retinol en grasa e hígado de rumiantes

Referencia	Especie	Dieta	Luteína		$\beta$ -caroteno		Retinol	
			Grasa <sup>1</sup>	Hígado <sup>2</sup>	Grasa <sup>1</sup>	Hígado <sup>2</sup>	Grasa <sup>1</sup>	Hígado <sup>2</sup>
Yang, , Larsen y Tume, 1992	Oveja	Pasto	0.02 b			0.087 b	0.92	48.4 a
	Cabra	Pasto	0.01 b			0.069 b	1.18	13.6 b
	Vaca	Pasto	0.17 a	0.03	0.81	0.701 a	0.99	14.3 b
Mora <i>et al.</i> , 2000	Vacuno	Concentrado				0.08	1.0	10.1
Yang <i>et al.</i> , 2002	Vacuno	Pasto			0.99	1.21		
		Cereal			0.10	0.08		
Prache <i>et al.</i> , 2003	Oveja	Hierba	0.025					
		Estabulado	0.009					
		Hierba + Estabulación corta-acabado	0.006					
		Hierba + estabulación larga-acabado	0.010					
Dunne <i>et al.</i> , 2006 housed and offered concentrates (PAS-CON)	Vacuno	Pasto	0.28 a		0.37			
		Concentrado	0.18 b		0.22			
Majchrzak, Fabian, E., y Elmadfa, 2006	Vacuno	Concentrado + pasto					4.10	
		Leche de vaca					2.01	
Röhrle <i>et al.</i> , 2011	Vacuno	Pasto	0.14 a		0.55 a			
		Concentrado	0.04 b		0.10 b			

Los promedios en la misma columna y en el mismo experimento con diferentes letras (a, b y c) difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> $\mu\text{g/g}$

<sup>2</sup> $\text{mg}/100\text{g}$

de animales alimentados con concentrado (tabla 2). Además, Röhrle *et al.* (2011) propusieron el tejido adiposo subcutáneo como un depósito de  $\beta$ -caroteno y luteína en vacuno, el cual puede ser movilizado cuando la ingesta de carotenoides está limitada. Es más, Prache, Priolo y Grolier (2003) demostraron que la tasa de reducción en la concentración de carotenoides en grasa es mucho menor que en sangre (la persistencia de carotenoides en sangre es extremadamente baja), lo que implica que la estimación de los niveles de carotenoides en los distintos tejidos puede ser útil como herramienta para estudios de trazabilidad de la alimentación del ganado (Prache *et al.*, 2005).

## Hígado

El hígado es el principal almacén de vitamina A en mamíferos. Es importante tener en cuenta que en rumiantes se produce una degradación de dicha vitamina en el rumen (Alosilla *et al.*, 2007), y ésta aparece como retinol y ésteres de retinol (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006). Sin embargo, el perfil de los ésteres de retinol en el hígado de pequeños rumiantes ha sido, desde nuestro punto de vista, poco estudiado. Dicho perfil está relacionado con la actividad bacteriana de las grasas de la dieta en el rumen, donde los ácidos grasos insaturados libres son hidrogenados a ácidos grasos saturados (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006). Así, estos autores indicaron que los ácidos grasos predominantes en el hígado de vacuno son el palmitato y el estearato de retinol (54% y 32%, respectivamente).

Además, Yang, Larsen y Tume (1992) destacaron que, aunque la luteína fue el único carotenoide detectado en suero y tejido adiposo de ovino y caprino (tablas 1 y 2), no se detectó en sus hígados (tabla 2). Sin embargo, Yang, Larsen y Tume (1992) sí

detectaron  $\beta$ -caroteno en el hígado de estos animales (tabla 2), a pesar de su ausencia en otros tejidos, dando lugar a pensar que las ovejas y las cabras han desarrollado un mecanismo de depósito selectivo de  $\beta$ -caroteno en el hígado, donde puede ser convertido en retinol cuando sea necesario (Yang, Larsen y Tume, 1992).

## CAROTENOIDES EN ANIMALES MONOGÁSTRICOS

En comparación con los rumiantes, la presencia de carotenoides y retinoides en ganado monogástrico ha sido muy poco estudiada. Dentro de la ganadería de animales monogástricos se han encontrado importantes diferencias entre especies en cuanto a la absorción de carotenoides. Schweigert (1998) indicó que la absorción de carotenoides en cerdos es extremadamente baja, mientras que estos compuestos pueden ser fácilmente detectados en el plasma de otras especies, lo que pone de manifiesto diferencias en la biodisponibilidad de los carotenoides entre especies monogástricas. Sin embargo, las características de las diferencias específicas entre especies en la absorción y el metabolismo de carotenoides no están todavía totalmente definidas.

## Metabolismo

El caballo absorbe  $\beta$ -caroteno de la dieta, lo transporta en plasma, lo acumula en tejidos y lo secreta en la leche (Schweigert y Gottwald, 1999). Sin embargo, Greiwe-Crandell *et al.* (1997) encontraron que los caballos en pastoreo obtienen vitamina A de los carotenoides con actividad de provitamina A presentes en el forraje, pero la eficiencia de esta conversión es bastante pobre en estos animales. Además,

en vacuno existe una regulación homeostática de la vitamina A en sangre (Martin *et al.*, 2004) que podría darse también en yeguas (Álvarez *et al.*, 2015). Esta hipótesis puede estar apoyada por estudios previos (Kuhl *et al.*, 2012) en los que se demostró que la suplementación dietética de  $\beta$ -caroteno no aumentaba la concentración de vitamina A ni en las madres ni en los potros. Igualmente, Greiwe-Crandell *et al.* (1997) establecieron que la suplementación con  $\beta$ -caroteno no mejora el almacenamiento hepático de vitamina A en yeguas, apoyando también la hipótesis de la regulación homeostática. Aun así, los mecanismos de esta posible regulación, así como el metabolismo general de los carotenoides en caballo, todavía no han sido muy estudiados. En cualquier caso, conocer mejor el mecanismo de acumulación tanto de carotenoides como de vitaminas liposolubles en tejidos del caballo podría ser interesante ya que, ayudaría a concienciar al consumidor de la alta calidad de los productos equinos (Lorenzo *et al.*, 2014). Así, el estudio de compuestos beneficiosos para la salud como los carotenoides puede ayudar a aumentar la aceptación de los productos del caballo por parte del consumidor (Lorenzo *et al.*, 2014).

Por otro lado, se sabe que el cerdo no absorbe carotenoides (Schweigert, 1998), aunque se ha encontrado retinol en plasma, grasa e hígado del cerdo ibérico (Álvarez *et al.*, 2014). La razón de por qué el cerdo no absorbe y acumula carotenoides no se conoce todavía. Sin embargo, el estudio de la presencia de carotenoides y retinoides en sus tejidos parece interesante por varias razones. Primero, se ha señalado (Janz *et al.*, 2008) que un determinante importante de la calidad nutricional de la carne de cerdo, aparte de su contenido en nutrientes, es la presencia de componentes bioactivos que pueden ser beneficiosos para la salud y el bienestar de los consumidores. Además, Álvarez *et al.* (2014) propusieron

los niveles de retinoides en hígado como biomarcadores de la trazabilidad de la alimentación en cerdo ibérico, para diferenciar los sistemas de alimentación *montanera* (sistema típico de cría en extensivo con una estrategia nutricional basada en pasto y bellotas) y *cebo* (sistema de cría intensivo con una dieta basada en concentrado) ya que los productos de mayor calidad del cerdo ibérico están relacionados con el sistema de alimentación en *montanera*.

## Plasma

$\beta$ -caroteno es el único carotenoide presente a niveles detectables en plasma de caballo (tabla 3). El mayor determinante de la concentración de  $\beta$ -carotenos en plasma de yegua es su consumo en la dieta (Gay *et al.*, 2004). Kuhl *et al.* (2012) establecieron que un suplemento oral con  $\beta$ -caroteno aumentaba su concentración en plasma de yeguas, aunque estos autores también detectaron un aumento en dicha concentración en el tiempo, independientemente del suplemento oral de  $\beta$ -caroteno. Por otro lado, cuando Greiwe-Crandell *et al.* (1997) estudiaron el efecto de las distintas dietas en la concentración de carotenoides en plasma de yeguas y no encontraron diferencias significativas en los niveles de  $\beta$ -caroteno (tabla 3). Además, estos autores (Greiwe-Crandell *et al.*, 1997) afirmaron que en casi todas las yeguas que recibieron una dieta a base de concentrado y heno, la concentración de  $\beta$ -caroteno en suero estaba por debajo de límites detectables. Sin embargo, el rango de niveles de carotenoides en suero en las yeguas en las cuales se encontraron niveles detectables de  $\beta$ -caroteno estaban en consonancia con el de otros estudios (tabla 44). Por otra parte, no se han encontrado datos en cuanto a la presencia de carotenoides en plasma de ganado porcino alimentados con diferentes dietas (tabla 3).

**TABLA 3.** Efecto de la dieta en el contenido de  $\beta$ -caroteno y retinol en plasma, leche e hígado de animales monogástricos

Referencia	Especie	Dieta	$\beta$ -caroteno		Retinol		
			Plasma <sup>1</sup>	Leche <sup>1</sup>	Plasma <sup>1</sup>	Leche <sup>1</sup>	Hígado <sup>2</sup>
Greiwe-Crandell <i>et al.</i> , 1997	Caballo	Pasto + heno	0.21		0.22		
		Pasto + heno + concentrado	0.24		0.22		
		Heno + concentrado	0.17		0.20		
Schweigert y Gottwald, 1999	Caballo	Heno + mazorcas + ensilado de maíz + cebada	0.26-0.59	0.011-0.067	0.17-0.19	0.007-0.025	
Gay <i>et al.</i> , 2004	Caballo	Pasto + concentrado	0.36	<0.03	0.17-0.19	<0.25	
Majchrzak, Fabian, y Elmadfa, 2006	Cerdo	Concentrado					11.5
Kuhl <i>et al.</i> , 2012	Caballo	Concentrado	0-0.25	0.003 b	0.15-0.20	0.10-0.50	
		Concentrado + $\beta$ -caroteno (1000 mg/día)	0-0.60	0.037 a	0.15-0.20	0.10-0.60	
Markiewicz-Kęszycka <i>et al.</i> , 2014	Caballo	Avena + heno + paja		0.388		0.403	
Álvarez <i>et al.</i> , 2014	Cerdo	Pasto + bellota			1.07		37.0 a
		Concentrado			0.68		12.0 b

Los promedios en la misma columna y en el mismo experimento con diferentes letras (a, b y c) difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> $\mu$ g/mL

<sup>2</sup>mg/100 g

## Tejido adiposo

Existen pocos estudios sobre el contenido en carotenoides y retinoides en el tejido adiposo de animales monogástricos. Olivares *et al.* (2009) compararon el contenido de retinol de la grasa subcutánea del lomo en cerdos con una dieta controlada y una dieta enriquecida con vitamina A, concluyendo que la concentración de esta vitamina fue mayor ( $P < 0.001$ ) en los cerdos que estaban recibiendo la dieta enriquecida en vitamina

A. Además, Álvarez *et al.* (2014) estudiaron el efecto de dos dietas con contenido diferente de carotenoides (pasto y bellota vs concentrado) en los niveles de carotenoides y retinol en la grasa perirrenal de cerdos ibéricos, concluyendo que no eran significativamente diferentes.

Por otra parte existe, desde nuestro punto de vista, una escasez de información sobre la concentración de carotenoides y retinol en el tejido adiposo de caballo. A pesar

de que se ha descrito como un animal de “grasa amarilla” (Schweigert, 1998), es decir, animales que sí absorben carotenoides, cuando la grasa perirrenal de potro fue analizada no se encontraron carotenoides aunque sí retinol (Álvarez *et al.*, 2015). Sin embargo, este hecho puede deberse a una menor cantidad de carotenoides en la dieta de los animales estudiados, ya que recibieron una dieta basada en concentrado pobre en estos compuestos y sin suplemento de vitamina A.

## Hígado

En mamíferos más de 80% del retinol total del cuerpo está presente en el hígado, principalmente localizado en las células estrelladas (Wingerath *et al.*, 1997), siendo la forma predominante los ésteres de retinol con ácidos grasos de cadena larga (tabla 3). Se han encontrado diferencias significativas (Álvarez *et al.*, 2014) en el perfil de retinoides en hígado de cerdos ibéricos dependiendo de sus dietas, lo que puede ser útil para discriminar estos animales en función de su dieta mediante la trazabilidad desde la alimentación. El perfil de los ésteres de retinol en hígado de cerdo ya ha sido estudiado con anterioridad (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006; Álvarez *et al.*, 2014), de forma que su composición refleja el perfil de ácidos grasos de una dieta típica para omnívoros (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006). Así, el palmitato de retinol se presenta como la forma predominante de vitamina A en el hígado de cerdo. Aparte del palmitato de retinol y el *todo-trans*-retinol, la fracción de vitamina A en hígado de cerdo está compuesta por oleato de retinol, estearato de retinol y linoleato de retinol (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006; Álvarez *et al.*, 2014). Finalmente, Álvarez *et al.* (2014) demostraron un efecto de la dieta en el perfil de retinoides en hígado de cerdo ibérico, y fueron capaces de discriminar 92.9% de los animales en

función de su dieta (pasto y bellota o concentrado) mediante la concentración de *todo-trans*-retinol y ésteres en las muestras de hígado. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen datos publicados sobre el perfil de ésteres de retinol en hígado de caballo. Sin embargo, hemos observado (Álvarez *et al.*, 2015) que los potros alimentados con concentrado y sacrificados con alrededor de 14 meses de edad acumulan en sus hígados *todo-trans*-retinol, linolenato de retinol, oleato de retinol, palmitato de retinol y estearato de retinol. Se observó también que el palmitato de retinol era la forma predominante, lo que concuerda bien con los resultados de Majchrzak, Fabian y Elmadfa (2006), quienes afirmaron que este éster es la forma principal de la vitamina A en el hígado de diferentes especies.

## Leche

A pesar de que la producción de leche de yegua no tiene tanta importancia económica ni una larga tradición como la producción de leche de rumiantes, está ganando importancia en los países europeos. Esto se debe a que, gracias a su composición, la leche de yegua puede ser una alternativa rentable a la leche de vaca, especialmente entre las personas con alergia a esta última (Markiewicz-Kęszyck *et al.*, 2014). La alta calidad nutricional de los productos lácteos está muy correlacionada con la calidad de la grasa de la leche y, por lo tanto, con su contenido en vitaminas liposolubles, entre otros nutrientes y compuestos de interés nutricional (Markiewicz-Kęszyck *et al.*, 2014). Por esta razón se han realizado, en los últimos años, algunos estudios sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno y retinol en la leche de yegua (tabla 3). Schweigert y Gottwald (1999) declararon que las yeguas absorben  $\beta$ -caroteno de la dieta, lo transportan en los tejidos y lo secretan a la leche. Estos datos están de acuerdo con otros estudios, en los que se han encontrado  $\beta$ -caroteno en la leche

yegua (Kuhl *et al.*, 2012; Gay *et al.*, 2014; Markiewicz Kęszyck *et al.*, 2014) (tabla 3). Además, los autores también constataron la presencia de retinol en la leche yegua (tabla 44). Schweigert y Gottwald (1999) encontraron que los niveles de  $\beta$ -caroteno en la leche de yegua dependen del nivel de dicho pigmento en el torrente sanguíneo, aunque la presencia de retinol en la leche parece ser independiente de su nivel en el plasma. Finalmente, Schweigert y Gottwald (1999) también establecieron que, en general, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y vitaminas liposolubles en leche de yegua son comparables a las encontradas en vacas. Por lo tanto, la leche de yegua puede constituir una valiosa fuente de estos componentes en la dieta humana (Markiewicz-Kęszyck *et al.*, 2014).

## CAROTENOIDES EN AVES

Los pigmentos carotenoides son utilizados por muchas especies de aves como colorantes tegumentarios, y con frecuencia son responsables de sus colores rojo, naranja y amarillo. Dado que las aves no pueden sintetizar carotenoides *de novo*, deben adquirirlos directamente de la dieta (Del Val *et al.*, 2009).

### Metabolismo

Los mamíferos son conocidos por absorber  $\beta$ -caroteno mejor que las aves, pero entre las aves hay algunas especies, como el ganso, que exhiben una capacidad particularmente buena para absorber algunos carotenoides. Por ejemplo, se ha señalado que la zeaxantina es absorbida tres veces mejor que la astaxantina (Jamroz *et al.*, 2002). En las aves, como en los mamíferos, los carotenoides provitamina A se convierten en retinol por acción de la CCO1, principalmente en la mucosa intestinal. El retinol formado se almacena en el hígado y en

la grasa abdominal de los animales, principalmente como palmitato de retinol. Hay que tener en cuenta que, a pesar de que el mecanismo de conversión es el mismo que en mamíferos, la eficiencia de dicha conversión en las aves disminuye con una ingesta elevada de  $\beta$ -caroteno (Jamroz *et al.*, 2002). Finalmente, muchas especies de aves metabolizan carotenoides de la dieta en formas más oxidadas que se depositan en el tegumento, pero no se han caracterizado enzimas responsables de estas conversiones (McGraw, 2004).

### Plasma

Se han realizado algunos estudios (Del Val *et al.*, 2009; Janan *et al.*, 2000; McGraw, Nolan y Crino, 2006; Negro y Garrido-Fernández, 2000) sobre el contenido de carotenoides en el plasma de diferentes especies de aves. Las variaciones tanto en el contenido como en la composición de carotenoides en la dieta se han propuesto como el principal motivo de las diferencias en los niveles de carotenoides en plasma entre las poblaciones de las mismas especies de aves (Negro *et al.*, 2000). La luteína ha sido descrita (Mcgraw, Nolan y Crino, 2006; Negro y Garrido-Fernández, 2000) como el principal y más frecuente carotenoide en el plasma de aves, que se acumula en tejidos blandos, incluyendo la piel, el hígado y el tejido adiposo. Además, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina y cantaxanthin también se han encontrado en el suero de diferentes especies aviares, a diferencia del  $\beta$ -caroteno, cuya presencia no se ha detectado (Surai, Royle y Sparks, 2000). Curiosamente Jamroz *et al.* (2000) también confirmaron la ausencia de  $\beta$ -caroteno en el suero de las aves, específicamente en el plasma de ganso, incluso después de la suplementación con dicho compuesto. También se han descrito otras xantofilas, como la 3-hidroxi-equinenona (Del Val *et al.*, 2009) en el plasma de las aves.

## Tejido adiposo

Las aves son capaces de almacenar carotenoides en diferentes tejidos, entre ellos el tejido adiposo (Negro *et al.*, 2001). Negro y Garrido-Fernández (2000) encontraron luteína y uno de sus isómeros Z,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, neocromo y neoxantina (identificado tentativamente) en grasa de oca, donde la luteína y su isómero Z, fueron los mayoritarios, suponiendo alrededor de 50% del contenido total de carotenoides.  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, neocromo y neoxantina también fueron detectados por Negro y Garrido-Fernández (2000), aunque en concentraciones mucho más bajas. Además, Surai, Royle y Sparks (2000) estudiaron el perfil de carotenoides en grasa de gaviota y describieron la presencia de cantaxantina,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y equinona. Como resultado de estos estudios se puede plantear la hipótesis de que estas especies de aves son capaces de absorber y almacenar en grasa más carotenoides que los mamíferos, por lo que el estudio de sus diferentes mecanismos de absorción y almacenamiento aparece como un campo de investigación interesante.

## Hígado

La composición de carotenoides y retinoides en el hígado de aves ha sido más estudiada que en otros tejidos debido a la importancia comercial del *foie grass o fatty liver*. Las diferentes especies avícolas presentan una gran eficiencia en la conversión de  $\beta$ -caroteno en vitamina A y se considera, al igual que en los mamíferos (Surai, Royle y Sparks, 2000), que el hígado es el principal órgano de almacén de dicha vitamina en forma de ésteres de retinol. El palmitato de retinol es la principal forma de retinol en el hígado de gaviotas (59.6% de contenido de vitamina A en hígado) (Surai, Royle y Sparks,

2000), pollo (40%) y pavo (36%). Mientras que el oleato, el estearato y el linoleato de retinol aparecen minoritariamente en el hígado de aves como la gaviota, el pollo y el pavo. No obstante, en estos animales los niveles de estearato de retinol son superiores a los de oleato y linoleato de retinol (Majchrzak, Fabian y Elmadfa, 2006; Surai, Royle y Sparks, 2000).

Los carotenoides también se han descrito en hígado de aves. En este sentido, Surai, Royle y Sparks (2000) encontraron que en la gaviota el hígado es el tejido donde se almacenan más carotenoides y en más alta proporción. En este estudio, el hígado se caracterizó por presentar altas proporciones de  $\beta$ -caroteno (51.2% del total de carotenoides en el hígado de gaviota), pero bajas de luteína y zeaxantina en comparación con otros tejidos. Por esta razón, Surai, Royle y Sparks (2000) hipotetizaron la posible existencia de una proteína de unión luteína-zeaxantina en el hígado de aves, de forma que esta unión de carotenoides podría ser absorbida en el intestino y depositada en el hígado. De esta forma, los carotenoides en el hígado podrían incorporarse a VLDL de nueva síntesis que serían las responsables de la deposición en los tejidos periféricos, los cuales de esta manera podrían enriquecerse con estos carotenoides mientras que otros, principalmente  $\beta$ -caroteno, podrían permanecer en el hígado, haciendo que este órgano fuese rico en este compuesto en comparación con otros tejidos periféricos. Finalmente, estos autores (Surai, Royle y Sparks, 2000) también señalaron la existencia de otros carotenoides en el hígado de gaviota, tales como cantaxantina (0.153 mg/100g),  $\beta$ -criptoxantina (0.104 mg/100g) y equinona (0.365 mg/100g).

Por otra parte, Del Val *et al.* (2009) señalaron la presencia de 3-hidroxi-equinona en hígado de piquituerto (0.038 mg/100 g)

y desarrollaron la hipótesis de un transporte de carotenoides desde los lugares de conversión y almacenamiento a tejidos periféricos a través del torrente sanguíneo. Explicándose, de este modo, la presencia de 3-hidroxi-equinona en hígado y plasma de piquituertos tras una conversión hepática de la  $\beta$ -criptoxantina procedente de la dieta y el consiguiente transporte en plasma.

## CONCLUSIONES

En las especies ganaderas existen factores específicos según la especie que afectan a la absorción, el metabolismo y el almacenamiento de carotenoides en los distintos tejidos.

Además, la dieta que consumen los animales es un factor importante que influye en el contenido de estos pigmentos en los fluidos biológicos y en los tejidos animales, si bien en algunas especies son necesarios mayores estudios en este campo, como por ejemplo en muchas especies de aves. Asimismo, desde que existe un creciente interés por parte de los consumidores en tener información acerca de los sistemas de producción animal, la investigación tiene un importante desafío, que es averiguar con certeza la dieta animal que han tenido los animales cuyos productos consumimos. En este sentido, algunos estudios realizados en rumiantes y monogástricos sugieren la utilidad de la presencia de carotenoides y retinoides en los tejidos animales para diferenciar los animales según su alimentación.

## REFERENCIAS

- Agabriel, C., Cornu, A., Journal, C., Sibra, C., Grolier, P., Martin B. 2007. *Journal of Dairy Science* 90: 4884-4896.
- Alosilla, C.E., McDowell, L.R., Wilkinson, N. S., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Martin, F.G., Blair M. 2007. *Journal of Animal Science* 85: 1235-1238.
- Álvarez, R., Vicario, I.M., Meléndez-Martínez, A.J., Alcalde M.J. 2014. *Meat Science* 98: 187-192.
- Álvarez, R., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I., Alcalde, M.J. 2015. *Animal* 9(7): 1230-1238.
- Amengual, J., Airanthi M., Widjaja-Adhi, K., Rodriguez-Santiago, S., Hessel, S., Golczak, M., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2013. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 34081-34096.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2008. *Carotenoids. Vol. 4: Natural Functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Pradel, P., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M., Nozière, P. 2007. *Journal of Dairy Science* 90: 5651-5664.
- Cardinault, N., Doreau, M., Poncet, C., Nozière, P. 2006. *Animal Science* 82: 49-55.
- Chauveau-Duriot, B., Thomas, D., Portelli, J., Doreau, M. 2005. *In Renc. Rech. Ruminants* 12, 117.
- Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P., Graulet, B. 2010. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 777-790.
- Del Val, E., Senar, J.C., Garrido-Fernández, J., Jarén, M., Borràs, A., Cabrera, J., Negro, J.J. 2009. *Die Naturwissenschaften* 96: 797-801.
- Dian, P.H.M., Andueza, D., Barbosa, C.M.P., Amoureux, S., Jestin, M., Carvalho, P.C.F., Prado, I.N., Prache, S. 2007. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 1: 1198-1208.
- Dian, P.H.M., Chauveau-Duriot, B., Prado, I.N., Prache, S. 2007a. *Journal of Animal Science* 85: 3054-3061.
- Dunne, P.G., O'Mara, F.P., Monahan, F.J., Moloney, A. P. 2006. *Meat Science* 74: 231-241.
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P. y Moloney, A.P. 2009. *Meat Science* 81: 28-45.
- Engel, E., Ferlay, A., Cornu, A., Chilliard, Y., Agabriel, C., Bielicki, G., Martin, B. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9099-9108.
- Fedele, V., Rubino, R., Claps, S., Manzi, P., Marconi, S., Pizzoferrato, L. 2004. *Scienze degli Alimenti* 34: 148-150.
- Gay, L.S., Kronfeld, D.S., Grimsley-Cook, A., Dascanio, J.J., Ordakowski-Burk, A.O., Splan, R.K., Dunnington, E.A., Sklan, D.J. 2004. *Journal of Equine Veterinary Science* 24: 115-120.

## REFERENCIAS

- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S., Curini, R. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 1628-1639.
- Greiwe-Crandell, K.M., Kronfeld, D.S., Gay, L.S., Sklan, D., Tiegs, W., Harris, P.A. 1997. *Journal of Animal Science* 75: 2684-2690.
- Hulshof, P.J.M., Van Roekel-Jansen, T., Van de Bovenkamp, P., West, C. E. 2006. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 67-75.
- Jamroz, D., Jakobsen, K., Wertelecki, T., Jensen, S. K. 2002. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science* 52: 150-158.
- Janan, J., Bodi, L., Ágota, G., Bárdos, L., Rudas, P. Kozák, J., Karsai, M. 2000. *Acta Veterinaria Hungarica* 48: 89-97.
- Janz, J., Morel, M.P.C.H., Purchas, R.W., Corrigan, V.K., Cumarasamy, S., Wilkinson, B. H. P., Hendriks, W.H. 2008. *Journal of Animal Science* 86: 1402-1409.
- Kondyli, E., Katsiari, M.C. y Voutsinas, L.P. 2007. *Food Chemistry* 100: 226-230.
- Kuhl, J., Aurich, J.E., Wulf, M., Hurtienne, A., Schweigert, F.J., Aurich, C. 2012. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 376-384.
- Lietz, G., Oxley, A., Boesch-Saadatmandi, C., Kobayashi, D. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 241-250.
- Lobo, G., Glenn, P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., Von Lintig, J. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821: 78-87.
- Lorenzo, J.M., Sarriés, M.V., Tateo, A., Polidori, P., Franco, D., Lanza, M. 2014. *Meat Science* 96: 1478-1488.
- Lucas, A., Coulon, J.B., Agabriel, C., Chilliard, Y., Rock, E. 2008. *Small Ruminant Research* 74: 91-106.
- Lucas, A., Rock, E., Agabriel, C., Chilliard, Y., Coulon, J.B. 2008a. *Small Ruminant Research* 74: 243-248.
- Majchrzak, D., Fabian, E., y Elmadfa, I. 2006. *Food Chemistry* 98: 704-710.
- Markiewicz-Kęszyck, M., Wójtowski, J., Czyżak-Runowska, G., Kuczyńska, B., Puppel, K., Krzyżewski, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Bagnicka, E. 2014. *International Dairy Journal* 38: 31-36.
- Márquez, M., Diánez, F. y Camacho, F. 2010. *Renewable Agriculture and Food Systems* 26: 4-12.
- Martin, B., Fedele, V., Ferlay, A., Grolier, P., Rock, E., Gruffat, D. y Chilliard, Y. 2004. En A. Lüscher, B. Jeangros, W. Kessler, O. Huguenin, M. Lobsiger, N. Millar y D. Suter (eds.). *Grassland Science in Europe Volume 9*. Lucerna: Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation.

## REFERENCIAS

- McGraw, K.J., Nolan, P.M. y Crino, O.L. 2006. *Functional Ecology* 20: 678-688.
- McGraw, K. J. 2004. *Journal of Avian Biology* 35: 471-476.
- Mein, J.R., Dolnikowski, G.G., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X.D. 2011. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 506: 109-121.
- Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2008. *Food Chemistry* 109: 546-553.
- Mínguez-Mosquera, M. I. 1997. Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos. Editado por M. I. Mínguez-Mosquera. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Mora, O., Romano, J.L., González, E., Ruiz, F.J. Gómez, R., Shimada, A. 2000. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 133-139.
- Mora, O., Romano, J.L., Gonzalez, E., Ruiz, F.J. Gómez y Shimada, A. 2000a. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 70: 199-205.
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., Le Frileux, Y. 2007. *Small Ruminant Research* 68: 20-34.
- Negro, J. J., y Garrido-Fernández, J. 2000. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology 126: 347-352.
- Negro, J.J., Tella, J.L. Blanco, G., Forero, M.G. y Garrido-Fernández, J. 2000. *Physiological and Biochemical Zoology*: PBZ 73: 97-101.
- Negro, J.J., Figuerola, J., Garrido, J., Green, A.J. 2001. *Functional Ecology* 15: 297-303.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M. 2006. *Animal Feed Science and Technology* 131: 418-450.
- Nozière, P., Grolier, P., Durand, D., Ferlay, A., Pradel, P., Martin, B. 2006a. *Journal of Dairy Science* 89: 2634-2648.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J. 2013. *Meat Science* 95: 919-930.
- Ortega, R.M., Mena, M.C. y Andrés, P. 2005. En A. Gil y F. Sánchez de Medina (eds.). *Tratado de nutrición. Tomo 1: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*, pp. 547-569. Madrid: Médica Paramericana.
- Prache, S. y Theriez, M. 1999. *Animal Science* 69: 29-36.
- Prache, S., Priolo, A. y Grolier, P. 2003. *Animal Science* 77: 225-233.
- Prache, S., Priolo, A. y Grolier, P. 2003a. *Journal of Animal Science* 81: 360-367.
- Prache, S., Cornu, A., Berdagué, J.L., Priolo, A. 2005. *Small Ruminant Research* 59: 157-168.

## REFERENCIAS

- Prache, S., Kondjoyan, N., Delfosse, O., Chauveau-Duriot, B., Andueza, D., Cornu, A. 2009. *Animal* 3: 598-605.
- Rafałowski, R., Żegarska, Z., Kuncewicz, A., Borejszo, Z. 2014. *International Dairy Journal* 36: 82-87.
- Röhrle, F.T., Moloney, A.P. Osorio, M.T. Luciano, G., Priolo, A., Caplan, P., Monahan, F.J. 2011. *Meat Science* 88: 347-353.
- Ruiz Celma, A., Cuadros, F. y López-Rodríguez, F. 2012. *Food and Bioproducts Processing* 90: 700-706.
- Schweigert, F.J. 1998. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, y H. Pfander, *Carotenoids. Vol. 3: Biosynthesis*, pp. 249-284. Basilea: Birkhäuser.
- Schweigert, F.J. y Gottwald, C. 1999. *Equine Veterinary Journal* 31: 319-323.
- Serrano, E., Prache, S., Chauveau-Duriot, B., Agabriel, J., Micol, D. 2007. *Animal Science* 82: 909-918.
- Sheath, G., Coulon, J.B. y Young, O.A. 2001. Proc. XIX International Grassland Congress, Sao Paulo: 1019-1026.
- Surai, P.F., Royle, N.J. y Sparks, N.H. 2000. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 126: 387-396.
- Valizadeh, R. y Sobhanirad, S. 2009. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8: 2375-2379.
- Wingerath, T., Kirsch, D., Spengler, B., Kaufmann, R., Stahl, W. 1997. *Analytical Chemistry* 69: 3855-3860. • Yang, A., Larsen, T.W. y Tume, R. K. 1992. *Australian Journal of Agricultural Research* 43: 1809-1817.
- Yang, A., Brewster, M.J., Lanari, M.C., Tume, R.K. 2002. *Meat Science* 60: 35-40.
- Yang, W., Wang, P., Jing, Y., Yang, Z., Zhang, C., Jiang, S., Zhang, G. 2010. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 5: 274-281.
- Zawadzki, F., Do Prado, I.N. y Prache, S. 2013. *Meat Science* 94: 297-303.
- Zervas, G. y Tsiplakou, E. 2011. *Small Ruminant Research* 101: 140-149.

## CAPÍTULO 25

# FORMAS DE DEPOSICIÓN DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS VEGETALES Y SUS POSIBLES IMPLICACIONES EN SU BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD

Patricia Esquivel, Víctor M. Jiménez, Tania Chacón-Ordóñez, Judith Hempel, Ralf M. Schweiggert y Reinhold Carle



### INTRODUCCIÓN

En las plantas, los carotenoides son generalmente biosintetizados y depositados en diferentes tipos de plastidios. En tejidos vegetales verdes, los carotenoides se encuentran dentro de cloroplastos, los cuales tienen morfología y composición similar. En tejidos vegetales no verdes, estos pigmentos se encuentran en cromoplastos, los cuales pueden tener cierta diversidad estructural (Cazzonelli y Pogson, 2010). Se han descrito cuatro formas de deposición de carotenoides en cromoplastos: aquellos que están disueltos en lípidos, en forma líquido-cristalina, asociados a membranas y en forma sólido-cristalina. Se postula que el tipo de plastidio en el que se encuentran puede tener una importante influencia en la biodisponibilidad de los carotenoides (Schweiggert *et al.*, 2012). Debido a ello, la caracterización ultra-estructural de estos orgánulos es interesante para estimar el potencial de un material vegetal en particular como fuente de carotenoides biodisponibles.

## PERFIL DE CAROTENOIDES Y MORFOLOGÍA DEL CLOROPLASTO EN ALIMENTOS VEGETALES VERDES

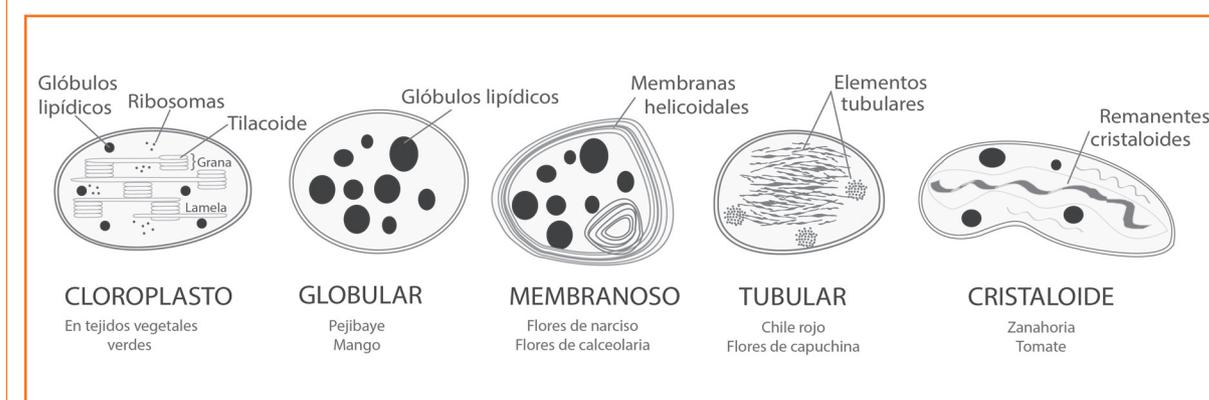
Los carotenoides presentes en los tejidos verdes de las plantas se acumulan en los cloroplastos (Ötles y Çagınd, 2008, Wieslaw, 2010). El perfil de los principales carotenoides en distintos tejidos vegetales verdes es en la mayoría de los casos muy similar, de forma que el  $\beta$ -caroteno se encuentra en una proporción de 20-25% y la luteína de 40-45%. Los otros dos carotenoides típicamente mayoritarios, violaxantina y (9'Z)-neoxantina se encuentran en una proporción menor, concretamente de 10-15% (Britton, 2008). No obstante, el contenido total de carotenoides en estos tejidos es muy variable, al depender de muchos factores.

En general, concentraciones mayores de carotenoides están directamente relacionadas con mayores densidades de cloroplastos. Así, por ejemplo, los vegetales verdes con mayor concentración de carotenoides, como la col rizada, el brócoli

y la espinaca (> 2 mg/100 g en peso fresco), tienen un color verde muy oscuro (Britton y Khachik, 2009).

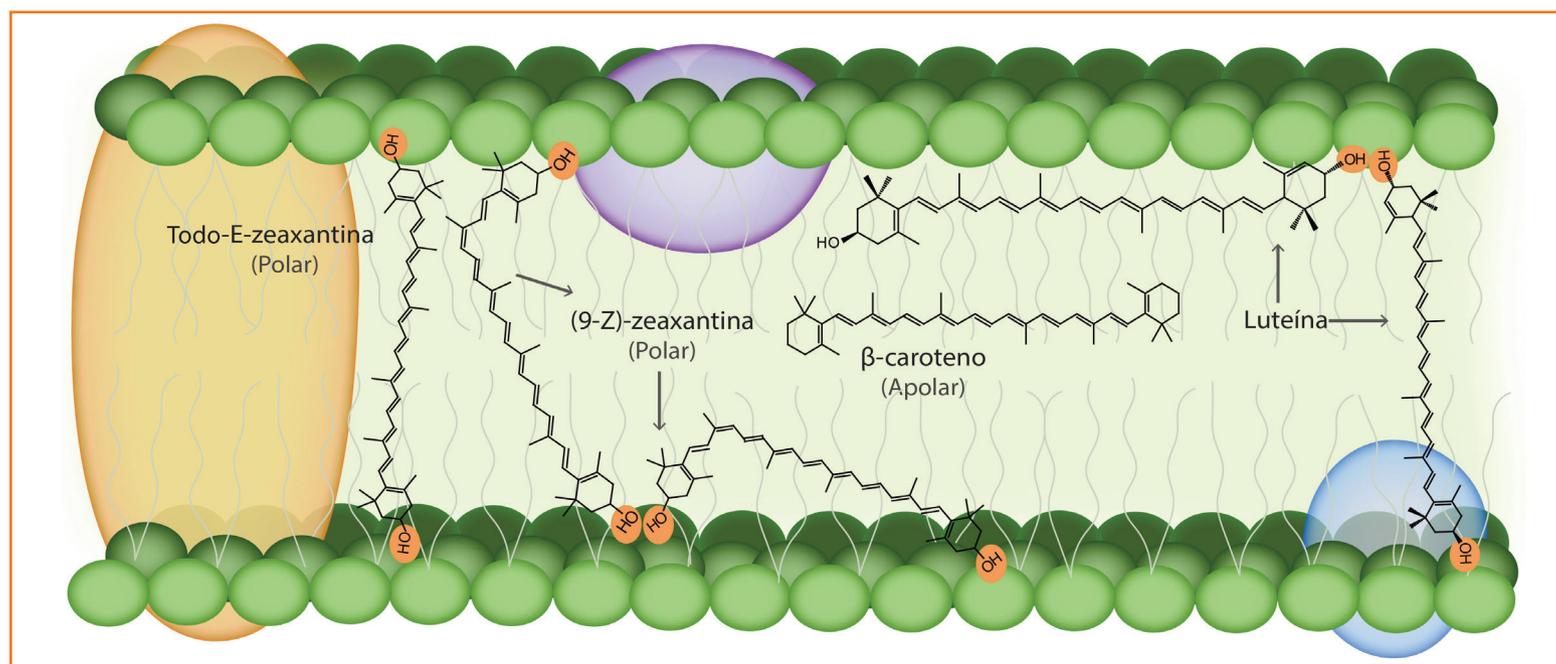
En la figura 1 se muestra la representación esquemática de un cloroplasto. Destaca la presencia de tilacoides, los cuales están con frecuencia ordenados en forma de pilas conocidas como granas. Los tilacoides son elementos membranosos, ricos en carotenoides, en donde se ubican los complejos antena y los centros de reacción de los fotosistemas. Así, los carotenoides de los tilacoides son de vital importancia para la fotosíntesis y se encuentran en los denominados complejos proteína-pigmento. Otras estructuras portadoras de carotenoides ubicadas en los cloroplastos son los plastoglóbulos, que se describirán con mayor detalle más adelante. En ellos existe un ambiente rico en lípidos para la biosíntesis y deposición de carotenoides. Hay evidencia de que los plastoglóbulos están estrechamente asociados con los tilacoides, e incluso se ha propuesto que entre ellos tiene lugar un abundante intercambio de compuestos lipofílicos (Austin *et al.*, 2006).

**FIGURA 1.** Tipos de plastidios presentes en plantas. Los ejemplos corresponden a estudios descritos en la literatura para mango (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2006), la flor del narciso (Liedvogel *et al.*, 1976), calceolarias (Wrischer y Ljubescic, 1984), la flor capuchina y el chile rojo (Deruère *et al.*, 1994), pejibaye y tomate (Hempel *et al.*, 2014) y zanahoria (Straus, 1950).



En los sistemas biológicos, los carotenoides más lipofílicos, como el  $\beta$ -caroteno, se encuentran comúnmente en el núcleo de pequeñas gotas de lípidos, mientras que aquellos carotenoides ligeramente polares, como la luteína y la zeaxantina, están más asociados a las membranas lipídicas (Borel *et al.*, 1996). La forma de anclaje de los carotenoides a estas membranas también está determinada por su estructura. Carotenoides con mayor polaridad, como por ejemplo los que tienen grupos oxigenados, tienden a acomodar su cromóforo dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana (figura 2) (Deming *et al.*, 2002). La orientación de las moléculas dependerá principalmente de los grupos funcionales presentes y de su capacidad para

establecer puentes de hidrógeno con las zonas polares de la membrana (Wieslaw, 2010). Se ha observado que la luteína puede estar orientada tanto de forma vertical como horizontal, debido a la presencia de grupos  $-OH$  en ambos extremos de la molécula (Pasenkiewicz-Gierula *et al.*, 2012, Sujak *et al.*, 1999). Por su parte, la orientación vertical u horizontal de la zeaxantina con respecto a la membrana depende de si su configuración es *cis*- o *trans*- (Widomska y Subczynski, 2008). Los carotenoides apolares, como el  $\beta$ -caroteno, tienen cierta movilidad dentro de la región hidrofóbica de la membrana, ya que no establecen puentes de hidrógeno con los lípidos polares en la superficie de la membrana o en la fase polar (Wieslaw, 2010).



**FIGURA 2.** Orientación de carotenoides polares (zeaxantina, luteína) y no polares ( $\beta$ -caroteno) dentro de la membrana lipídica. Los círculos alrededor de los grupos hidroxilo indican la presencia de puentes de hidrógeno en las zonas polares de la membrana.

En tejidos verdes comestibles, la mayoría de los carotenoides están fuertemente embebidos en los complejos proteicos de los tilacoides apilados de los cloroplastos. Así, si a estos vegetales no se les realiza ningún tipo de preparación tecnológica o culinaria que facilite su liberación, como por ejemplo cocimiento o adición de aceite, la biodisponibilidad de los carotenoides es extremadamente pobre. Por ejemplo, en un estudio se observó que la absorción de carotenoides después de ingerir una ensalada compuesta por espinaca fresca, lechuga romana, zanahoria y tomates cherry sin adición alguna de aceite, fue prácticamente insignificante. La adición de únicamente 6 g de aceite de canola por porción aumentó considerablemente su biodisponibilidad. Un incremento todavía mayor se observó con la adición de 28 g de aceite por porción (Brown *et al.*, 1989, 2004). Resultados similares se obtuvieron en otro estudio en el que se usaron aguacate y su aceite como fuente de grasa (Unlu *et al.*, 2005). Además de lo anterior, con frecuencia se ha relacionado la aplicación de tratamientos térmicos con un aumento en la biodisponibilidad de carotenoides en tejidos verdes. Sin embargo, en la literatura también se encuentra información contradictoria. Por ejemplo, en un estudio se observó un ligero incremento, aunque mucho menor al esperado, en la biodisponibilidad de carotenoides de espinacas tratadas térmicamente en comparación con su equivalente no tratado (Rock *et al.*, 1998). Por otro lado, Tassi y Amaya-Farfán (2008) no encontraron diferencias en la biodisponibilidad de  $\beta$ -caroteno y luteína entre hojas crudas y cocinadas (durante 5 min a 97°C) de arúgula (*Eruca sativa* L.), aunque la cantidad de carotenoides en las primeras era ligeramente mayor que en las segundas. Es importante considerar que la aplicación de calor a vegetales puede dar lugar a isomerizaciones *trans-cis* (E/Z) y a la degradación de carotenoides. No obstante, la adición de lípidos no parece afectar la composición de los isómeros, tal como se observó

en cloroplastos aislados de espinaca (Aman, Schieber y Carle, 2005). En este sentido, es importante considerar que distintos isómeros geométricos (*cis/trans*) de carotenoides pueden tener diferente actividad provitamina A y biodisponibilidad (Rodríguez-Amaya y Tavares, 1992; Ben-Amotz y Levy, 1996). La desintegración mecánica de los tejidos también suele tener un efecto positivo en la biodisponibilidad de carotenoides de tejidos fotosintéticos. Así, en un estudio se observó un incremento de 14% en los niveles plasmáticos de  $\beta$ -caroteno cuando se consumieron espinacas picadas en comparación con hojas enteras (Van Het Hof *et al.*, 1999). También se observó un incremento en la biodisponibilidad de carotenoides después de tratar espinaca picada con una preparación de pectinasa, hemicelulasa y celulasa para desintegrar la matriz en la cual los carotenoides están inmersos (Castenmiller *et al.*, 1999). En resumen, los vegetales verdes deben ser vistos como una fuente importante de  $\beta$ -caroteno y luteína, especialmente cuando se consumen junto con lípidos y reciben al menos cierto tratamiento mecánico mínimo.

## PERFIL DE CAROTENOIDES Y MORFOLOGÍA DE CROMOPLASTOS EN ALIMENTOS VEGETALES EN DONDE PREDOMINAN OTROS COLORES

En tejidos vegetales no fotosintéticos, los carotenoides se encuentran dentro de plastidios especializados, denominados cromoplastos. Cuando los frutos verdes maduran, el aparato fotosintético se degrada y las membranas tilacoidales se desintegran, permitiendo la transformación de cloroplastos en cromoplastos (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005; Britton, 2008). Si bien son procesos independientes, se ha sugerido que puede existir cierta interacción entre la degradación de la

clorofila y la carotenogénesis como se observó en mutantes de pimiento que permanecen verdes durante todo el proceso de maduración (Roca *et al.*, 2006). También existe evidencia de que los cromoplastos se pueden originar *de novo* a partir de plastidios no diferenciados, denominados proplastidios (Evert, 2006). Los cromoplastos constituyen el grupo de plastidios con mayor diversidad morfológica y estructural (figura 1). Considerando su variabilidad estructural y, en consecuencia, también su composición, Britton y Khachik (2009) identificaron cinco patrones distintivos de carotenoides de acuerdo con el color de los tejidos vegetales: 1) con contenidos altos de licopeno, como en el tomate (color rojo); 2) con contenidos altos de  $\beta$ -caroteno y sus hidroxí-derivados  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina (color naranja); 3) similar a 2, pero también con  $\alpha$ -caroteno y sus hidroxí-derivados, especialmente luteína (color amarillo-naranja); 4) con contenidos altos de epóxidos de carotenoides (color amarillo), y 5) carotenoides que parecen ser únicos o característicos de una especie en particular (colores amarillos, anaranjados o rojos, dependiendo del compuesto predominante), como por ejemplo capsantina y capsorrubina en pimientos rojos (*Capsicum annuum* L.) (Britton y Khachik, 2009). En cualquier caso es importante tener en cuenta que la distribución de los carotenoides en frutos es compleja y heterogénea y que sus niveles pueden variar considerablemente según factores como la variedad, el estado de madurez, la zona y condiciones de cultivo y el manejo poscosecha (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

De forma general los cromoplastos se clasifican de acuerdo con su ultraestructura (Evert, 2006). Pueden ser de tipo globular, tubular, membranoso, cristalino o combinaciones de los anteriores. El que se clasifiquen de una forma u otra depende fundamentalmente de los elementos ultraestructurales que predominan en el estroma (e.g., glóbulos, túbulos,

membranas o cristales) (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005; Egea *et al.*, 2010).

Los cromoplastos globulares son los más frecuentes en la naturaleza y se encuentran con frecuencia en pétalos de flores; su presencia en estructuras comestibles es menos frecuente (Jeffery, Holzenburg y King, 2012). Un ejemplo interesante al respecto fue recientemente reportado por Hempel *et al.* (2014) en frutos de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.), aunque había sido también publicado con anterioridad en el flavedo de naranja (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005). En los cromoplastos globulares los carotenoides se encuentran dentro de pequeñas gotas de lípidos llamadas plastoglóbulos (figura 3). Estos plastoglóbulos están formados por una monocapa

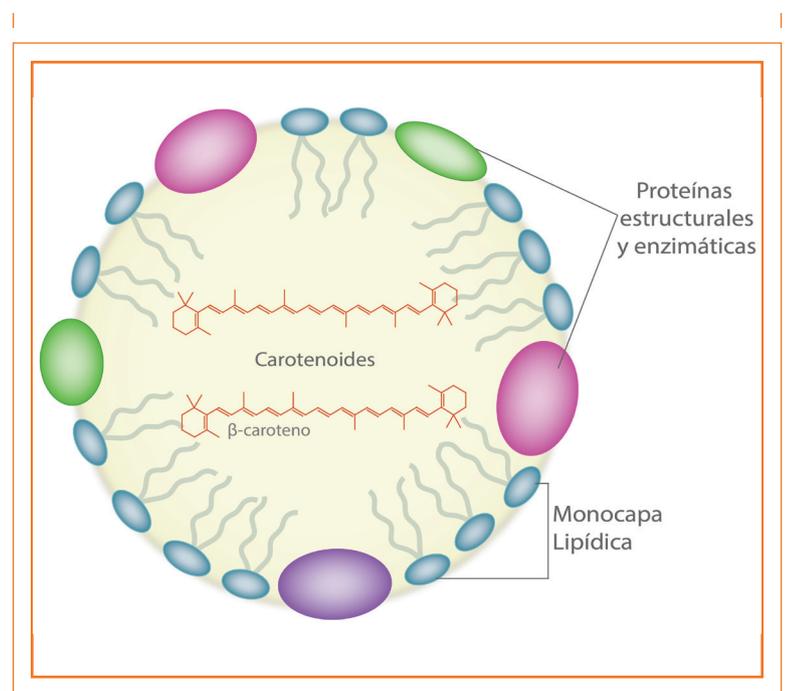


FIGURA 3. Estructura del plastoglóbulo y almacenamiento de carotenoides.

lipídica y varían en tamaño (Bréhélin, Kessler y Van Wijk, 2007). Se ha observado que el número de plastoglóbulos aumenta durante la maduración. En algunos casos, como consecuencia del gran aumento en la concentración de carotenoides, pueden producirse fenómenos de cristalización. Ejemplos típicos son los cristales de  $\beta$ -caroteno en zanahoria o de licopeno en tomate (Ben-Shaul y Shimon, 1965; Harris y Spurr, 1969).

Por otro lado, los cromoplastos tubulares se caracterizan por tener elementos internos con forma de tubo (figura 1). Estos elementos, altamente anisotrópicos, se denominan generalmente túbulos y pueden tener un grosor de entre 20 y 60 nm y una longitud de hasta 10  $\mu$ m. Se han encontrado túbulos ramificados y no ramificados (Sitte 1980). Su núcleo aparentemente consiste en una fase líquido-cristalina nemática de carotenoides, rodeada por una monocapa de glicolípidos, fosfolípidos y proteínas bipolares (Sitte, 1981). Se han encontrado cromoplastos tubulares o globular-tubulares en varias flores y frutos, como por ejemplo níspero (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.), mango (*Mangifera indica* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), physalis (*Physalis pubescens* L. y *P. peruviana* L.), baya de serbal (*Sorbus aucuparia* L.), escaramujo (*Rosa rugosa* Thunb.) y papaya (*Carica papaya* L.) de pulpa amarilla (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2006; Sitte, 1980, Schweiggert, *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2012).

Los cromoplastos membranosos son los menos frecuentes. Contienen hasta 20 membranas dobles concéntricas (figura 1). Este tipo de cromoplasto se encuentra aparentemente limitado a flores de unas pocas familias de plantas, como Amaryllidaceae (e.g., el narciso). Sin embargo, también se ha descrito su presencia en ciertos cultivares de *Capsicum annuum* L. y en el cultivar de tomate de pulpa amarilla Golden Jubilee (Sitte, 1980; Rosso, 1967).

Los cromoplastos cristalinos representan el cuarto tipo de cromoplastos (figura 1). El ejemplo más prominente es el cromoplasto de las raíces de la zanahoria anaranjada, ricas en  $\beta$ -caroteno. En muchos otros casos, los cristales de carotenoides se pueden observar con microscopía de luz, y se han encontrado formas semejantes a cintas, agujas e incluso helicoidales; se conocen también pequeños cristales submicroscópicos, como los encontrados en algunos cultivares de physalis (Hempel *et al.*, 2014; Schweiggert *et al.*, 2011; Sitte, 1980). Se ha sugerido que la formación de los cristaloides es altamente dependiente del tipo de pigmento acumulado. Así, se ha observado que el (todo-*trans*)-licopeno se acumula de forma consistente en forma cristalina en frutos y vegetales, como la sandía (Sitte, 1980), el pomelo rojo (Purcell, Carra y DeGruy, 1963), la papaya de pulpa roja (Schweiggert *et al.*, 2011), y los frutos no comestibles de *Aglaonema commutatum* Schott (Knoth, 1981).

Es posible encontrar más de un tipo de elemento portador de carotenoides en un mismo cromoplasto. Especialmente, los plastoglóbulos son elementos que se encuentran con frecuencia en todos los tipos de plastidios, por lo que están en cromoplastos clasificados como membranosos, tubulares y cristaloides. Estos dos últimos también pueden contener estructuras membranosas y, en ciertos casos, la clasificación de los cromoplastos basada en su ultraestructura detallada puede volverse arbitraria. Además, es importante considerar que al informar sobre la presencia de tipos particulares de cromoplastos, es fundamental especificar en detalle la especie, el genotipo, el órgano y su estado de desarrollo o madurez, ya que éstos pueden ser determinantes en la presencia de un tipo u otro. Así, por ejemplo se ha observado que los cromoplastos de los frutos de tomate son cristaloides, mientras que los de los pétalos de las flores de esta misma especie son globulares (Sitte, 1980).

## DEPOSICIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS VEGETALES SELECCIONADOS

### Pejibaye, pijuayo, chontaduro o pijiguo (*Bactris gasipaes* H.B.K.)

El pejibaye es una palma. Sus usos más relevantes son la producción del fruto, sobre todo para mercados locales, y la producción de palmito, el cual se obtiene a partir de los brotes jóvenes y se comercializa sobre todo a escala internacional. Tradicionalmente, los frutos se consumen después de su cocción debido a la presencia de algunos factores anti-nutricionales (Clement *et al.*, 2004).

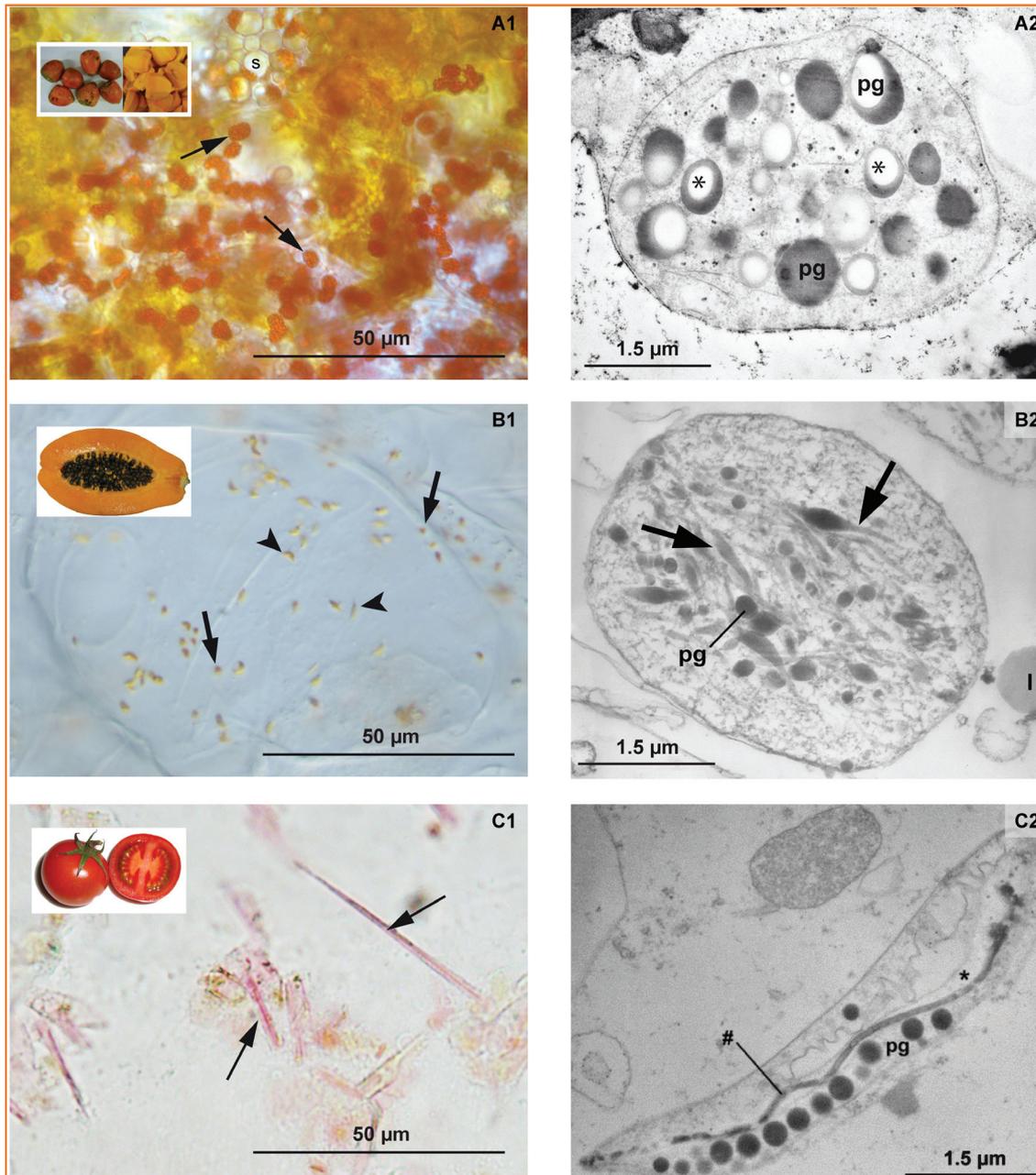
El pejibaye cultivado generalmente presenta una gran variabilidad genética, la cual se puede explicar principalmente por su sistema reproductivo con polinización abierta (el polen proviene de otras plantas), aunado a su estado todavía incipiente de domesticación y los fines variables de los pocos programas de mejoramiento genético que se han establecido (Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997). Esta diversidad se refleja en sus características morfológicas y fisicoquímicas, como por ejemplo el color. Los dos bancos de germoplasma de pejibaye de mayor importancia en el mundo se encuentran en Costa Rica; en su administración y uso participan en estrecha relación entes estatales y de educación superior de ese país.

El fruto del pejibaye es una drupa con colores externos que varían entre anaranjado, amarillo y rojo. El mesocarpio presenta coloraciones que van del crema al anaranjado. Su contenido de lípidos en promedio es de 15.8% de su peso

seco (Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997). El fruto es rico en  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\beta$ -caroteno y ha sido utilizado como alimento para animales. También ha sido objeto de cierto grado de desarrollo industrial, principalmente para obtener harina para consumo humano (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2011). Se ha estimado que la alta concentración de lípidos en el fruto podría favorecer la biodisponibilidad de los carotenoides que contiene. Al respecto, Hempel *et al.* (2014) determinaron contenidos totales de carotenoides en diferentes genotipos de pejibaye que van desde 685 hasta 13.895  $\mu\text{g}/100$  g peso fresco. Al compararse los genotipos con diferente color, se observaron perfiles de carotenoides muy similares pero con diferencias en cuanto a su concentración. Los genotipos de color anaranjado pueden tener niveles de carotenoides hasta diez veces superiores a los de color amarillo (Hempel *et al.*, 2014).

### Morfología del cromoplasto del fruto del pejibaye y biodisponibilidad de sus carotenoides

Estudios con microscopía de luz no han puesto de manifiesto la presencia de cromoplastos cristaloides en el fruto del pejibaye (figura 4, A1), tales como los descritos para vegetales ricos en  $\beta$ -caroteno y licopeno como la zanahoria y el tomate, respectivamente. En zanahoria y tomate, los cristales de caroteno aparecen distorsionando la forma del cromoplasto, con longitudes de hasta 30 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. En contraste, el mesocarpio y el exocarpio del fruto de pejibaye contienen pequeños cromoplastos globulares redondeados. Los cromoplastos del mesocarpio son de mayor tamaño (diámetro aproximado de 5-10  $\mu\text{m}$ ), mientras que los cercanos a la cáscara son más pequeños (diámetro aproximado de 3-4  $\mu\text{m}$ ). Estos últimos tienen una mayor intensidad de color (rojo-naranja oscuro) con distintas estructuras globulares internas (Hempel *et al.*, 2014).



**FIGURA 4.** Micrografías de luz (A1, B1 y C1) y micrografías electrónicas (A2, B2 y C2) de cromoplastos globulares, tubulares y cristaloides de A) fruto de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth), B) fruto de papaya (*Carica papaya* L.) de pulpa amarilla y C) fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) de pulpa roja, respectivamente. Las micrografías fueron recopiladas y modificadas con permiso de Hempel *et al.* (2014) y Schweiggert *et al.* (2011). A1) Las flechas señalan cromoplastos de forma redondeada; s, gránulo de almidón; A2) pg, plastoglobulo; \*, plastoglobulo con contenido parcialmente extraído durante la preparación de la muestra. B1) Las flechas señalan cromoplastos de forma redondeada; puntas de flecha, cromoplastos levemente elongados; B2) pg, plastoglobulo; l, cuerpo lipídico; C1) Las flechas señalan cromoplastos en forma de aguja; C2) pg, plastoglobulo; \*, restos de cristales (cristal de carotenoide extraído durante la preparación de la muestra); #, membrana interna ondulada.

La presencia de cromoplastos globulares en los frutos de pejibaye fue confirmada por medio de microscopía electrónica de transmisión. En las células del exocarpio y del mesocarpio de variedades amarillas y anaranjadas se observaron cromoplastos con plastoglóbulos (figura 4, A2) (Hempel *et al.*, 2014).

Como se mencionó antes, se considera que en los cromoplastos globulares los carotenoides se encuentran disueltos en lípidos. Un prerrequisito para que esto ocurra es la presencia en el material vegetal de un contenido de lípidos suficientemente alto como para asegurar la solubilidad. Hempel *et al.* (2014) estimaron la solubilidad de acuerdo con la metodología de Schweiggert *et al.* (2011), con base en el contenido de carotenoides individuales y utilizando los valores de solubilidad descritos en la literatura (Borel *et al.*, 1996; Garti, Shevachman y Shani, 2004). Se estimó entonces que el contenido de lípidos requerido para la disolución de todos los carotenoides presentes en el pejibaye sería de 0.45 g/100 g peso fresco para frutos de color amarillo, los cuales contenían una concentración aproximada de 3.2 g/100 g peso fresco. Por su parte, los frutos anaranjados tenían 6.1 g de lípidos por 100 g peso fresco, requiriendo 4.4 g de lípidos por 100 g para disolver todos los carotenoides presentes. De acuerdo con estos cálculos, para ambos genotipos se observó que el contenido de lípidos presentes en los frutos era suficiente para garantizar la solubilidad de los carotenoides, apoyando la hipótesis de que los carotenoides del pejibaye se encuentran disueltos en lípidos (Hempel *et al.*, 2014).

Este estado de carotenoides disueltos en lípidos se había descrito con anterioridad para cromoplastos en pétalos de flores (Sitte, 1980). Sin embargo, esta es una forma de almacenamiento excepcional en frutas y vegetales.

Fuentes comunes de carotenoides, como zanahoria, tomate y vegetales verdes, tienen un contenido bajo de lípidos, los cuales no son suficientes para la disolución total de los carotenoides. La zanahoria y el tomate contienen menos de 0.3 g de lípidos por 100 g peso fresco, con un contenido muy alto de carotenoides en comparación con el pejibaye (Surlles *et al.*, 2004; Schweiggert *et al.*, 2012; USDA, 2012). Considerando lo anterior, y como se describirá con mayor detalle más adelante, se recomienda la adición de lípidos en la dieta, como requisito para la absorción eficiente de carotenoides cristalizados presentes en fuentes como el tomate y la zanahoria (Brown *et al.*, 2004). En consecuencia, se considera que los carotenoides del pejibaye, naturalmente disueltos en lípidos, tienen mayor biodisponibilidad que los de tomate y zanahoria, aun sin la adición de otros lípidos para su consumo (Hempel *et al.*, 2014). En concordancia con lo anterior, Cooperstone *et al.* (2015) encontraron mayor biodisponibilidad de todo-*trans*-licopeno (dos veces mayor) y de licopeno total (8.5 veces mayor) en tomates tipo mandarina (*tangerine tomatoes*), en los que predominan cromoplastos globulares, que en tomates rojos comunes, donde predominan cromoplastos cristaloides.

En resumen, los frutos del pejibaye parecen tener un gran potencial nutricional. Contienen carotenoides precursores de vitamina A, los cuales se encuentran disueltos en gotas lipídicas dentro de los cromoplastos y, por lo tanto, son altamente biodisponibles. Además, son frutos con un alto valor energético, por el alto contenido en almidón y lípidos. Actualmente este fruto es subutilizado en América Latina, de donde es originario, y 40% de la producción se utiliza para alimento animal (Clement *et al.*, 2004).

## Papaya o lechosa (*Carica papaya* L.)

La papaya es una planta herbácea semi-leñosa, probablemente originaria de la costa caribeña de Mesoamérica, que ahora se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales. Normalmente tiene un único tallo, al extremo del cual comienza a producir flores a partir de los 3-8 meses. Los primeros frutos se pueden cosechar a los 9-15 meses y pueden variar considerablemente en tamaño (0.1 -10.0 kg), forma (elongada, redondeada o aplanada) y color (amarillo a anaranjado oscuro). Su importancia en el comercio mundial en los últimos años ha aumentado considerablemente (Jiménez, Mora-Newcomer y Gutiérrez-Soto, 2014).

La papaya se considera como una fuente importante de licopeno y de carotenoides precursores de vitamina A, principalmente en países tropicales y subtropicales. En un estudio se comparó la biodisponibilidad al consumir la misma dosis de  $\beta$ -caroteno de papaya, zanahoria y tomate, y se determinó que la absorción *in vivo* es tres veces mayor tras el consumo de papaya. De forma similar a lo indicado antes para pejibaye, estos resultados se atribuyen a la forma de deposición de los carotenoides en papaya. Así, en este fruto se encuentran disueltos en lípidos y en estado cristalino líquido, mientras que en zanahoria y tomate los carotenoides mayoritarios se encuentran en estado cristalino-sólido (Schweiggert *et al.*, 2014).

Conforme progresa la maduración de frutos de papaya se produce un incremento considerable en la acumulación de carotenoides en los cromoplastos. Además, se han observado diferencias dependiendo del genotipo de papaya (Schweiggert *et al.*, 2011, 2011a). Estos autores determinaron concentraciones de carotenoides totales en papaya con

pulpa roja de 59  $\mu\text{g/g}$  peso fresco. En papaya amarilla el nivel de carotenoides fue menor, concretamente de 34  $\mu\text{g/g}$  peso fresco. La diferencia más llamativa en el perfil de carotenoides de las papayas rojas y amarillas es la presencia de licopeno en una gran proporción en las primeras (aproximadamente 51% del total de carotenoides). En la papaya amarilla sólo se encontraron trazas de este compuesto.

### Morfología del cromoplasto del fruto de papaya y biodisponibilidad de carotenoides

En frutos completamente maduros de papaya roja se observaron principalmente estructuras cristaloides elongadas y estructuras redondeadas al microscopio de luz (figura 4, B1), mientras que en frutos equivalentes de papaya amarilla predominaron estructuras redondas y cristaloides pequeñas. Por medio de microscopía electrónica se observaron túbulos, tanto agrupados como sueltos, en ambos tipos de papaya (figura 4, B2). En general, los túbulos estaban organizados de forma paralela. También se observaron transiciones entre estructuras tubulares y globulares. Tanto en una etapa intermedia de madurez como en la madurez completa del fruto rojo se observaron numerosos plastidios con restos cristaloides. El tamaño y forma de los plastidios parecían distorsionados por los cristales. Se pudieron distinguir en el cromoplasto cristaloides, plastoglóbulos y estructuras tubulares (Schweiggert *et al.*, 2011).

Knuth, Hansmann y Sitte (1986) y Simpson *et al.* (1974) describieron cromoplastos glóbulo-tubulares similares a los descritos anteriormente en bayas de *Palisota barteri* Hook y en pimiento (*Capsicum annum* L.). Se observó que los plastoglóbulos de los cromoplastos de la papaya estaban conectados a elementos tubulares, creciendo hacia afuera en diferentes direcciones. Knuth, Hansmann y Sitte (1986) indican

que la acumulación de carotenoides puede ser un requisito para la formación de túbulos. Estos cromoplastos tubulares sólo se observaron en estados avanzados de madurez. La presencia de cristales asociados a las membranas internas del cromoplasto de papaya roja se asoció con la acumulación de licopeno, tal como se había descrito previamente en tomate (Rosso, 1968). El origen de los cromoplastos puede determinar la unión del licopeno a diferentes elementos. En cromoplastos desarrollados a partir de cloroplastos, el licopeno puede encontrarse unido a membranas tilacoidales, lo que podría influir en su biodisponibilidad haciéndolo menos accesible.

Mediante microscopía electrónica se observó la presencia de plastidios con elementos globulares y tubulares en la papaya amarilla, similares a los descritos para la papaya roja, pero sin cristales unidos a las membranas. En la papaya roja, la acumulación del licopeno, poco soluble, resulta en la formación de cristales; lo que no se observó en la papaya amarilla, donde el licopeno está prácticamente ausente (Schweiggert *et al.*, 2011).

En relación con la biodisponibilidad de carotenoides, De Pee *et al.* (1998) asociaron un aumento significativo de  $\beta$ -caroteno y retinol en suero en niños en edad escolar en Indonesia después de consumir una dieta basada en frutos con coloración naranja. Este aumento fue mayor con estos frutos que cuando se aportó una dosis equivalente de carotenoides de vegetales de hoja verde. La absorción predominante de  $\beta$ -caroteno a partir de frutos, como mango y papaya, ha sido también confirmada en mujeres lactantes (Khan *et al.*, 2007). Coincidiendo con estos estudios, una investigación reciente mostró una absorción posprandial de  $\beta$ -caroteno tres veces mayor en la fracción lipoproteica rica en triglicéridos de plasma humano después del consumo de papaya al compararlo con

una dosis equivalente de este compuesto a partir de zanahoria y tomate (Schweiggert *et al.*, 2014). Este mismo grupo había encontrado previamente que la bioaccesibilidad *in vitro* de  $\beta$ -caroteno de mango y papaya es significativamente mayor que de zanahoria y tomate (Schweiggert *et al.*, 2012). Los autores relacionaron la alta biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno en mango y papaya con su forma de deposición a escala nanométrica en los elementos tubulares de los cromoplastos, mientras que la pobre biodisponibilidad de los carotenoides en zanahoria y tomate estaba relacionada con su forma de deposición sólido-cristalina. La solubilización e incorporación de los carotenoides en micelas mixtas durante la digestión es un prerrequisito para que ocurra una absorción eficiente. Esta incorporación en micelas puede ser más efectiva en el caso de los carotenoides de la papaya, que se acumulan en estructuras más pequeñas que en el caso de zanahoria y tomate.

Además de la forma de deposición en los cromoplastos, hay otras propiedades de la matriz del tejido u órgano que pueden contribuir a una mayor o menor biodisponibilidad, como por ejemplo la firmeza, que es mayor en la zanahoria cruda que en la papaya. Sin embargo, Schweiggert *et al.* (2014) encontraron que, a pesar de que los tomates son menos firmes que los frutos de papaya, la biodisponibilidad de  $\beta$ -caroteno fue significativamente mayor en los últimos. También se encontró que la biodisponibilidad de  $\beta$ -caroteno cristalino fue baja y muy similar entre zanahoria y tomate ( $P = 0.86$ ) (Schweiggert *et al.*, 2014).

Independientemente de la razón, la alta biodisponibilidad de los carotenoides presentes en frutos de papaya los hace una fuente excelente de carotenoides importantes para la dieta, tales como  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y licopeno (Schweiggert *et al.*, 2014).

## Raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.) y frutos de tomate de pulpa roja (*Lycopersicon esculentum* L.)

### Morfología del cromoplasto en el fruto de tomate rojo y en raíz de zanahoria

Como se muestra en la figura 4 C1, los cromoplastos de tomate y zanahoria se caracterizan por presentar elementos cristaloides, principalmente con forma de aguja, que pueden llegar a medir casi 50  $\mu\text{m}$ . Por microscopía electrónica (figura 4, C2) ha sido posible observar que los cristales típicos están rodeados por membranas con estructuras ligeramente onduladas densas en electrones (Schweiggert *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios relacionados con la biodisponibilidad de carotenoides en vegetales no verdes se ha realizado en zanahoria común y tomate rojo. Así, el estado de deposición cristalina fue relacionado inicialmente con su baja biodisponibilidad en un modelo animal (Zhou, Gugger y Erdman, 1996). Posteriormente, Kopec *et al.* (2014) demostraron que  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno de la zanahoria cruda eran 4.8 y 6.6 veces más biodisponibles, respectivamente, cuando su consumo se acompañaba de aguacate. En ese mismo trabajo, se describió que la biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno aumentó 2.4 veces cuando el aguacate se suplementó con salsas de tomate con altos niveles de  $\beta$ -caroteno preparados con tratamiento térmico, las cuales también contenían carotenoides cristalinos. Como ya se mencionó, la adición de lípidos es necesaria para la disolución de carotenoides cristalinos, lo cual es un prerrequisito para su incorporación en micelas mixtas y, por consiguiente, para su eficiente incorporación en los enterocitos (Erdman Jr, Bierer y Gugger, 1993).

Además, se ha observado que el procesamiento térmico de los alimentos puede aumentar la biodisponibilidad de carotenoides a partir de fuentes en las que se encuentran en estado cristalino. En el trabajo de Kopec *et al.* (2014), la absorción de  $\beta$ -caroteno después de consumir zanahorias sin acompañamiento con lípidos fue apenas marginal, mientras que la adición de salsa de tomates altos en  $\beta$ -caroteno, preparada con tratamiento térmico, aumentó sustancialmente la incorporación de este pigmento en su forma cristalina, aunque no se le hubieran agregado lípidos adicionales. Esta observación es consistente con el hecho de que el procesamiento mecánico y térmico puede ser beneficioso para la biodisponibilidad. En resumen, carotenoides de fuentes cristalinas, como zanahoria y tomate, no tienen una buena biodisponibilidad, a menos que se adicione lípidos o se procesen térmicamente.

## CONCLUSIONES

En general, se ha observado que los carotenoides se depositan de diferente forma en los cloroplastos y en los distintos tipos de cromoplastos. Los vegetales verdes muestran perfiles de carotenoides muy similares y en ellos están asociados con proteínas. En los cromoplastos se han descrito diversos estados físicos de deposición de los carotenoides, como las formas disueltas en lípidos, características de frutos de pejíbaya, las posibles formas líquido-cristalinas de frutos de papaya, y las formas sólido-cristalinas de zanahoria y tomate. A menos que se lleven a cabo tratamientos apropiados a los alimentos vegetales verdes, la biodisponibilidad de carotenoides es muy pobre. De la misma manera, se acepta que los carotenoides sólido-cristalinos de alimentos vegetales crudos son poco biodisponibles, mientras que hay cada

vez más evidencias de que los carotenoides disueltos en lípidos de cromoplastos globulares son muy biodisponibles por naturaleza. Algo similar se ha observado en el caso de carotenoides de cromoplastos tubulares. El estado físico de los carotenoides así como el tipo de cromoplasto podría permitir, hasta cierto grado, predecir su mayor o menor

biodisponibilidad. En este sentido, el estudio microscópico de las fuentes de carotenoides puede ser de gran importancia en investigación. Por ejemplo, puede ser de mucha utilidad para evaluar el efecto que el procesamiento tiene en la biodisponibilidad de estos compuestos.

## REFERENCIAS

- Aman, R., Schieber, A., y Carle, R. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9512-9518.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F. y Staehelin, L.A. 2006. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Ben-Amotz, A. y Levy, Y. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 729-734.
- Ben-Shaul, Y. y Shimon, K. 1965. *Botanical Gazette* 126: 79-85.
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1996. *Journal of Lipid Research* 37: 250-261.
- Bréhélin, C., Kessler, F. y Van Wijk, K. 2007. *Trends in Plant Science* 12: 260-266.
- Britton, G. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids*, pp. 189-212. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. y Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Volume 5: Nutrition y Health*, pp. 45-66. Basilea: Birkhäuser.
- Brown, E.D., Micozzi, M.S., Craft, N.E., Bieri, J.G., Beecher, G., Edwards, B.K., Rose, A., Taylor, P.R., Smith, J.C. 1989. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49: 1258-1265.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., White, W.S. 2004. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 396-403.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., Linssen, J.P.H., Van Het Hof, K.H., Voragen, A.G.J. 1999. *The Journal of Nutrition* 129: 349-355.
- Cazzonelli, C.I. y Pogson, B. J. 2010. *Trends in Plant Science* 15: 266-274. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.02.003.
- Clement, C.R., Weber, J.C., Van Leeuwen, J., Astorga Domian, C., Cole, D.M., Arévalo Lopez, L.A., Argüello, H. 2004. *Agroforestry Systems* 61-62: 195-206.
- Cooperstone, J.L., Ralston, R.A., Riedl, K.M., Haufe, T.C., Schweiggert, R.M., King, S.A., Timmers, C.D., Francis, D., Lesinski, G.B., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2015. *Molecular Nutrition & Food Research* 59: 658-669.
- De Pee, S., West, C.E., Permaesih, D., Martuti, Muhilal, S., Hautvast, J.G. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1058-1067.
- Deming, D., Boileau, T., Heintz, K., Atkinson, C., Erdman, J. 2002. En E. Cárdenas y L. Packer (eds.). *Handbook of Antioxidants*. Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- Deruère, J., Römer, S., D'harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. *The Plant Cell* 6: 119-133.

## REFERENCIAS

- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latche, A., Chervin, C., Bouzayen, M., Pech, J.C. 2010. *Plant y Cell Physiology* 51: 1601-11.
- Erdman Jr, J.W., Bierer, T.L. y Gugger, E.T. 1993. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691: 76-85.
- Evert, R.F. 2006. En R.F. Evert (ed.). *Esau's Plant Anatomy*, pp. 15-43. Hoboken: John Wiley and Sons.
- Fu, X., Kong, W., Peng, G., Zhou, J., Azam, M., Xu, C., Grierson, D., Chen, K. 2012. *Journal of Experimental Botany* 63: 341-354.
- Garti, N., Shevachman, M. y Shani, A. 2004. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81: 873-877.
- Harris, W.M. y Spurr, A.R. 1969. *American Journal of Botany* 56: 380-389.
- Hempel, J., Amrehn, E., Quesada, S., Esquivel, P., Jiménez, V.M., Heller, A., Carle, R., Schweiggert, R.M. 2014. *Planta* 240: 1037-1050.
- Hudák, J., Gálová, E. y Zemanová, L. 2005. En M. Pessaraki (ed.). *Handbook of Photosynthesis*. Boca Raton: CRC Press.
- Jeffery, J., Holzenburg, A. y King, S. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2594-602.
- Jiménez, V.M., Mora-Newcomer, E. y Gutiérrez-Soto, M.V. 2014. En R. Ming y P.H. Moore (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*, pp. 17-33. Nueva York: Springer.
- Khan, N.C., West, C.E., De Pee, S., Bosch, D., Phuong, H.D., Hulshof, P.J.M., Khoi, H.H., Verhoef, H., Hautvast, J.G.A.J. 2007. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 1112-1120.
- Knoth, R. 1981. *Protoplasma* 106: 249-259.
- Knoth, R., Hansmann, P. y Sitte, P. 1986. *Planta* 168: 167-174.
- Kopec, R.E., Cooperstone, J.L., Schweiggert, R.M., Young, G.S., Harrison, E.H., Francis, D.M., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2014. *The Journal of Nutrition* 144: 1158-1166.
- Liedvogel, B., Sitte, P., y Falk, H. 1976. *Cytobiologie* 12: 155-174.
- Mora-Urpí, J., Weber, J. y Clement, C. 1997. *Peach Palm Bactris gasipaes Kunth. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 20. Roma: International Plant Genetic Resources Institute.
- Ötles, S., y Çagınd, Ö. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical y Functional Properties*, pp. 51-70. Boca Raton: CRC Press.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Baczyński, K., Murzyn, K., Markiewicz, M. 2012. *Acta Biochimica Polonica* 59: 115-118.

## REFERENCIAS

- Purcell, A.E., Carra, J.H. y DeGruy, I.V. 1963. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 17: 123-127.
- Roca, M., Hornero-Méndez, D., Gandul-Rojas, B. Mínguez-Mosquera, M.I. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8782-8787.
- Rock, C.L., Lovalvo, J.L., Emenhiser, C., Ruffin, M.T., Flatt, S.W., Schwartz, S.J. 1998. *The Journal of Nutrition* 128: 913-916.
- Rodríguez-Amaya, D.B. y Tavares, C.A. 1992. *Food Chemistry* 45: 297-302.
- Rodríguez-Amaya, D.B. y Kimura, M. 2004. *Harvest plus Handbook for Carotenoid Analysis, Harvestplus Technical Monographs*. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute/International Center for Tropical Agriculture.
- Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A.M., Bustos-Carmona, J. y Vaillant, F. 2011. *Food Research International* 44: 2377-2384.
- Rosso, S.W. 1967. *Journal of Ultrastructure Research* 20: 179-189.
- Rosso, S.W. 1968. *Journal of Ultrastructure Research* 25: 307-322.
- Schweiggert, R.M., Steingass, C.B., Heller, A., Esquivel, P., Carle, R. 2011. *Planta* 234: 1031-1044.
- Schweiggert, R.M., Steingass, C.B., Mora, E., Esquivel, P., Carle, R. 2011a. *Food Research International* 44: 1373-1380.
- Schweiggert, R.M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C.B., Carle, R. 2012. *Food Chemistry* 135: 2736-2742.
- Schweiggert, R.M., Kopec, R.E., Villalobos-Gutierrez, M.G., Högel, J., Quesada, S., Esquivel, P., Schwartz, S.J., Carle, R. 2014. *British Journal of Nutrition* 111: 490-498.
- Simpson, D.J., Rayman, F.M.M., Buckle, K.A. y Lee, T.H. 1974. *Australian Journal of Plant Physiology* 1: 135-147.
- Sitte, P. 1980. En F.G.C. Czygan (ed.). *Pigments in Plants*, pp. 117-148. Stuttgart y Nueva York: G. Fischer Verl.
- Sitte, P. 1981. En O. Kiermayer (ed.). *Cytomorphogenesis in Plants*, pp. 401-421. Viena: Springer.
- Straus, W. 1950. *Science* 112: 745-748.
- Sujak, A., Gabrielska, J., Grudziński, W., Borc, R., Mazurek, P., Gruszecki, W.I. 1999. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371: 301-307.
- Surles, R.L., Weng, N., Simon, P.W. y Tanumihardjo, S.A. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3417-3421.
- Tassi, E. M. M., y J. Amaya-Farfán. 2008. *Ecology of Food and Nutrition* 47: 77-94.

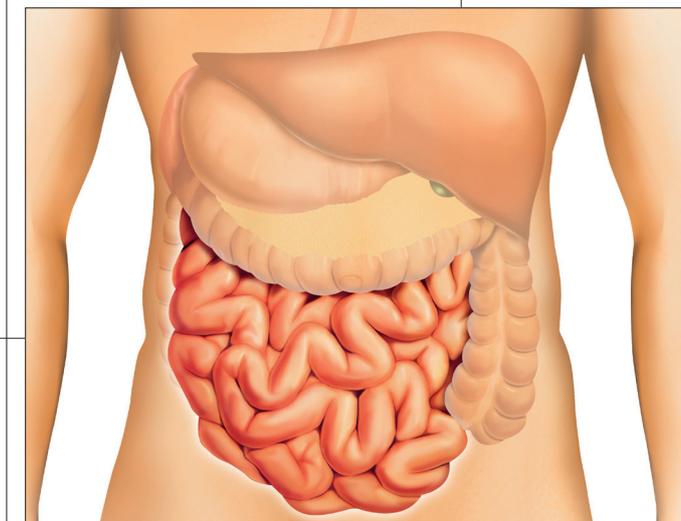
## REFERENCIAS

- Unlu, N.Z., Bohn, T., Clinton, S.K. y Schwartz, S.J. 2005. *The Journal of Nutrition* 135: 431-436.
- USDA. 2012. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Nutrient Data Laboratory Home Page.
- Van Het Hof, K.H., Tijburg, L.B.M., Pietrzik, K., Weststrate, J.A. 1999. *British Journal of Nutrition* 82: 203-212.
- Vásquez-Caicedo, A.L., Heller, A., Neidhart, S, y Carle, R. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5769-5776.
- Widomska, J. y Subczynski, W.K. 2008. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778: 10-19.
- Wieslaw, G. 2010. En J. Landrum (ed.). *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties*, pp. 19-30. Boca Raton: CRC Press.
- Wrischer, M., y Ljubescic, N. 1984. *Acta Botanica Croatica* 43: 19-24.
- Zhou, J.R., Gugger, E.T. y Erdman, J.W. 1996. *Journal of the American College of Nutrition* 15: 84-91.

## CAPÍTULO 26

# BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES, FACTORES QUE LA DETERMINAN Y MÉTODOS DE ESTIMACIÓN

Antonio J. Meléndez-Martínez, Antonio Pérez-Gálvez, María Roca, Rocío Estévez-Santiago, Begoña Olmedilla-Alonso, Adriana Z. Mercadante y José de Jesús Ornelas-Paz



## INTRODUCCIÓN

Los carotenoides están presentes en muchos alimentos. Estudios *in vitro* e *in vivo* parecen indicar que podrían ser beneficiosos para la salud, aunque estos efectos protectores no han sido demostrados de forma contundente en humanos debido a las dificultades que entrañan estos estudios. Algunos de estos compuestos son precursores de la vitamina A. Se considera que los carotenoides de frutas y hortalizas pueden llegar a representar hasta 80-85% de la ingesta de vitamina A en algunas áreas. En cualquier caso, la actividad biológica de los carotenoides y compuestos derivados de ellos dependen más que de la cantidad consumida, de la absorbida y metabolizada por el organismo. El proceso de absorción de carotenoides es complejo y puede ser modificado por factores de diversa naturaleza. Este capítulo aborda el concepto de biodisponibilidad en su versión más amplia. Abunda en los factores que la determinan y los métodos para evaluarla.

## El proceso de absorción de carotenoides

El estudio de la biodisponibilidad de carotenoides siempre ha sido de gran interés. El concepto de biodisponibilidad procede de la fusión de las palabras *disponibilidad* y *biológica* y su significado ha evolucionado a través del tiempo (Metzler y Huang, 1983). El término se acuñó en el campo farmacológico para hacer referencia a la velocidad y cantidad con la que el principio activo de un fármaco se absorbía y alcanzaba el tejido u órgano donde desempeña su actividad. El concepto de biodisponibilidad no se desliga de la actividad biológica o bioactividad, sino que la incluye en su definición más amplia. En la actualidad, el concepto de bioactividad parece generalmente difuminado en el de biodisponibilidad ya que, farmacológicamente, un principio activo una vez que alcanza su sitio de actividad deja de ser inerte, realizando una acción. Parece que la bioactividad es algo obvio y quizá esta sea la causa de que se tienda a olvidar que la bioactividad está implícita en la biodisponibilidad. Algunos acotan el término biodisponibilidad a la fracción del nutriente ingerido que está disponible para su uso en funciones fisiológicas o para su almacenamiento, subestimando el concepto de bioactividad (Maiani *et al.*, 2009). Otros, más puristas, utilizan el término bioaccesibilidad para referirse a la fracción del principio activo que podría ser biodisponible. Según algunos autores, la bioaccesibilidad incluye la *accesibilidad* y *absorción* (Hedrén, Díaz y Svanberg, 2002; Ornelas-Paz *et al.*, 2008). Éstos junto con la bioactividad componen el concepto de biodisponibilidad. La accesibilidad puede definirse como la fracción de componentes del alimento que se libera y se transforma en materia potencialmente absorbible e incluye todos los procesos fisicoquímicos que tienen lugar en el tracto gastrointestinal. La absorción de carotenoides se refiere a la etapa de captación de aquellos que se encuentran en micelas,

los cuales se consideran bioaccesibles por el epitelio mediante alguno de los mecanismos de absorción transepitelial. El uso de estos términos en la práctica no es claro. Suele confundirse la bioaccesibilidad con la accesibilidad, absorción o accesibilidad más absorción. Algunos autores consideran que la bioaccesibilidad de carotenoides representa su capacidad para incorporarse a las micelas (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Victoria-Campos *et al.*, 2013). En algunos casos la bioaccesibilidad de carotenoides se ha obtenido mediante la determinación de la cantidad de carotenoides en plasma después de la ingesta de un alimento o de un suplemento dietético en dosis única o varias dosis en un periodo (Stahl y Sies, 1992; Van Vliet, Schreurs y Van den Berg, 1995; O'Neill y Thurnham, 1998; Granado-Lorencio *et al.*, 2006 y 2009). Conocida la dosis total suministrada y la que aparece en plasma, se hace una estimación de su bioaccesibilidad. Esta estrategia permite estudiar los factores que determinan la accesibilidad y absorción de carotenoides, como el tipo de carotenoides, la matriz alimentaria que los contiene, componentes que la promuevan o dificultan, etc. Con esta estrategia se ha conseguido una cantidad apreciable de información aunque el procedimiento estima la influencia de los factores analizados en el conjunto del proceso de absorción sin poder concretar qué factor afecta a cada etapa y en qué medida.

Otros dos conceptos relacionados con el consumo de carotenoides y su actividad de vitamina A son la *bioconversión* y la *bioeficacia*. La *bioconversión* se define como la fracción de los carotenoides precursores de vitamina A absorbida que se convierte en retinol. La *bioeficacia* indica la eficiencia con la que los carotenoides provitamina A son absorbidos y convertidos en retinol. La estimación de la bioeficacia implica típicamente la medición de las reservas totales de vitamina A

en el organismo (Castenmiller y West, 1998; Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2010).

## ETAPAS DEL PROCESO DE ABSORCIÓN DE CAROTENOIDES

Se puede considerar que el proceso de absorción de carotenoides comienza antes de consumirlos. Depende del apetito mismo y factores psicológicos diversos, los cuales modulan la liberación de enzimas digestivas y los movimientos del tracto gastrointestinal. La masticación es fundamental para la liberación posterior de los carotenoides consumidos. Una vez que el alimento llega al estómago, comienzan a liberarse carotenoides de la matriz gracias al pH gástrico, a los movimientos del estómago y a la acción de diversas enzimas. Durante este proceso, tiene una importancia significativa el grado de procesamiento del alimento consumido como uno de los factores determinantes de la cantidad de carotenoides que se liberan de la matriz. Así, la homogeneización mecánica, la aplicación de tratamientos térmicos y la adición de grasa durante el procesamiento de frutas y hortalizas, pueden aumentar la liberación de carotenoides (Van Het Hof *et al.*, 1998). Estas técnicas pueden modificar las estructuras subcelulares en las que se alojan los carotenoides y facilitar su liberación (Stahl y Sies, 1992; Gartner, Stahl y Sies, 1997; Paetau *et al.*, 1998). Una vez liberados, los carotenoides, como todos los compuestos lipofílicos, se dispersan en la grasa de la dieta. Esta grasa que contiene carotenoides se emulsiona, gracias a los movimientos gástricos, con los componentes acuosos. En el intestino delgado, esta emulsión se hace más fina y la grasa emulsionada es digerida (Van Het Hof *et al.*, 1998; Borel *et al.*, 1998a). Durante este proceso se forman micelas, que son los agregados moleculares con un tamaño

de entre 3 y 10 nm que vehiculizan los carotenoides y otros materiales lipídicos (acilglicéridos, colesterol, fosfolípidos, vitaminas liposolubles, fitoesteroles) y los hacen potencialmente absorbibles (figura 1). En esta fase intervienen las secreciones de la vesícula biliar y del páncreas. Las primeras consisten principalmente en sales biliares, cuya misión es la de coadyuvar en la reducción del tamaño de las gotas de grasa emulsionadas y en su estabilización en el medio acuoso, así como en la formación de micelas. Las secreciones del páncreas contienen bicarbonato de sodio que neutraliza el pH

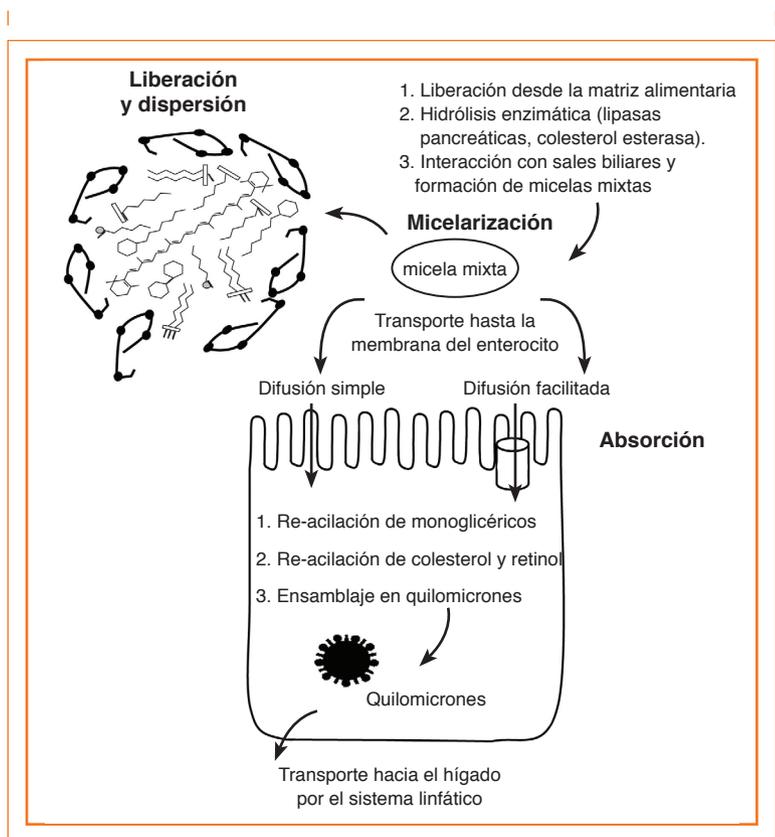


FIGURA 1. Proceso de absorción de carotenoides.

del contenido duodenal y aportan las enzimas digestivas entre las que se encuentran las lipasas pancreáticas, que hidrolizan triacilglicéridos, ésteres de colesterol y otros nutrientes. El factor clave en esta fase es la materia grasa ingerida. Su presencia va a estimular las secreciones biliares y los niveles de lipasas pancreáticas, lo que aumenta la formación de micelas y la biodisponibilidad de carotenoides (Garret, Failla y Sarama, 1999). Posteriormente las micelas deberán establecer contacto con la superficie de los enterocitos del epitelio intestinal, tejido que actúa como filtro selectivo de nutrientes. Inicialmente se creía que los carotenoides se absorbían mediante un proceso de difusión pasiva en el que las micelas colisionaban con la membrana celular y difundían su contenido hacia el citosol de la célula (El-Gorab, Underwood y Loerch, 1975; Hollander y Ruble, 1978). Parker (1996) sugirió que el gradiente de concentración entre el contenido micelar y el celular determinaba la velocidad de difusión. Explicaba cómo a partir de una determinada concentración micelar de carotenoides se podría saturar la absorción, al reducirse el gradiente de concentración. Los estudios realizados por Hauser *et al.* (1980) modificaron sustancialmente esta teoría. Posteriormente, se observó que el perfil biocinético de absorción, obtenido en sistemas modelo como vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC) y cultivos de células del epitelio intestinal (Caco-2), mostraba las características de una difusión facilitada (Thurnhofer y Hauser, 1990; Compassi *et al.*, 1997). De esta forma, se han identificado receptores concretos implicados en la absorción de colesterol y carotenoides, aunque esta asignación es todavía tema de debate e investigación (Van Bennekum *et al.*, 2005). El primero de estos transportadores es el SR-BI (*Scavenger Receptor class B type I*), una glicoproteína transmembranal de 80 kDa que se encuentra en los bordes en cepillo de los enterocitos, desde el duodeno hasta el colon (Lobo *et al.*, 2001). Aunque

en un primer momento se identificó este transportador como responsable de la absorción de luteína en células Caco-2 (Reboul *et al.*, 2005), su papel se ha extendido a otros carotenoides tales como el  $\beta$ -caroteno (Van Bennekum *et al.*, 2005), zeaxantina (During, Doraiswamy y Harrison, 2008) y licopeno (Moussa *et al.*, 2008). Otro receptor es CD36 (*Cluster Determinant 36*), que se expresa en las membranas de borde en cepillo de los enterocitos desde el duodeno hasta el yeyuno (Terpstra *et al.*, 2000). Este receptor ha sido principalmente asociado con la absorción de ácidos grasos en el intestino y se ha demostrado su papel en la absorción de  $\beta$ -caroteno por células COS transfectadas (Van Bennekum *et al.*, 2005). El receptor CD36 también se ha asociado con la absorción de licopeno y luteína en adipocitos de ratón (Moussa *et al.*, 2011). NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*) es considerado el principal transportador de colesterol y fitoesterol en el intestino (Altmann *et al.*, 2004). De forma indirecta, se ha asociado este transportador con la absorción de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina en células Caco-2 (During, Dawson y Harrison, 2005). Los estudios más recientes dirigen su atención hacia la relación que existe entre las variantes genéticas de los transportadores (SR-BI y CD36) y los distintos niveles de carotenoides presentes en el suero humano (Borel *et al.*, 2013). La identificación de estos receptores y el propio mecanismo de absorción están sustentados en el hallazgo de macromoléculas como  $\alpha$ - y  $\beta$ -péptidos o ezetimiba que inhiben la absorción de compuestos lipídicos (Boffelli *et al.*, 1997; Altmann *et al.*, 2002). El mecanismo, además, es consistente con la significativa variabilidad de la eficiencia de absorción de lípidos como el colesterol entre individuos de una misma población, lo que se atribuye a diferencias genéticas expresadas en el epitelio intestinal (Wang, Paigen y Carey, 2001), hecho que también se ha observado en estudios de absorción posprandial de carotenoides (Paetau *et al.*, 1997;

Pérez-Gálvez *et al.*, 2005). Sin lugar a dudas, la consecución de estos logros recientes se debe en gran medida al desarrollo de modelos de absorción *in vitro*, basados en la obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo o cultivos celulares, que se han utilizado como herramienta analítica para el diseño de experimentos encaminados a la determinación de la biocinética de absorción de lípidos en general y de los carotenoides en particular (Wilson, 1990).

Una vez que el material lipídico es interiorizado por las células, se empaqueta en lipoproteína denominadas quilomicrones. Estos agregados moleculares, que se ensamblan en el aparato de Golgi, alcanzan un tamaño de 75 a 1200 nm y se caracterizan por contener la apoproteína B-48, imprescindible para el ensamblaje de estas partículas. Los quilomicrones se excretan al sistema linfático y posteriormente se dirigen al hígado degradándose parcialmente antes de llegar a dicho órgano, por la actividad de la lipoproteína lipasa, en partículas remanentes de quilomicrones, proceso que implica la liberación de parte del contenido lipídico, incluyendo carotenoides, de estas partículas y su absorción en tejido endotelial (Furr y Clark, 1997). Pero la mayor parte logra alcanzar el hígado, donde se almacena o re-excreta al sistema circulatorio empaquetado en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que, durante su circulación, se transforman en LDL y finalmente en lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Van den Berg *et al.*, 2000). Los carotenoides apolares como  $\beta$ -caroteno y licopeno, al estar concentrados en el corazón de las partículas lipoproteicas, experimentan un menor intercambio con otras lipoproteínas, por lo que las LDL aumentan su contenido de carotenoides apolares, mientras que las HDL albergan mayoritariamente las xantofilas, de carácter más polar (Paetau *et al.*, 1998). Esta cuestión es relevante puesto que va a tener un efecto en el depósito preferente de

carotenos o xantofilas en determinados tejidos, en función de su densidad de receptores para LDL o HDL (Schmitz *et al.*, 1991; Handelman *et al.*, 1992).

## CAROTENOIDES BIODISPONIBLES

A pesar de que el número de carotenoides descritos en la naturaleza alcanza una cifra superior a 700 (Maiani *et al.*, 2009), no todas las fuentes naturales que los contienen están presentes en nuestra dieta habitual. Se estima que sólo tenemos acceso a unos 40 carotenoides que pueden ser absorbidos, metabolizados y utilizados en nuestro organismo. Generalmente los carotenoides biodisponibles analizados tradicionalmente son luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno, presentes en los alimentos que habitualmente constituyen nuestra dieta (tabla 1). El fitoeno y fitoflueno son carotenoides incoloros que, si bien, no se incluyen tradicionalmente en tablas de contenido de carotenoides de alimentos y no siempre se analizan en muestras humanas, están presentes en alimentos de consumo frecuente (como tomates, naranjas y zanahorias, entre otros) y son biodisponibles (Khachik *et al.*, 1997a; Khachik *et al.*, 2002; Meléndez-Martínez *et al.*, 2014a; Olmedilla *et al.*, 1998). Típicamente los epóxidos de xantofilas no se encuentran en fluidos biológicos ni en tejidos a niveles comparables con los de los carotenoides anteriormente citados (Barua y Olson, 2001; Asai, Yonekura y Nagao, 2008). En algunos casos se encuentra más de un isómero geométrico (*cis/trans* o *Z/E*) de un carotenoide (Stahl y Sies, 1992; Ben-Amotz y Levy, 1996; Johnson, Krinsky y Russell, 1996; Craft *et al.*, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2013). Algunas investigaciones han demostrado la presencia de apocarotenoides y productos oxidados de carotenoides a concentraciones bajas (Khachik *et al.*, 1992;

**TABLA 1.** Bioaccesibilidad de carotenoides a partir de alimentos

Alimento	Bioaccesibilidad (%)	Modelo in vitro con digestión gástrica e intestinal	Referencia
Tomate	licopeno (1.4); $\beta$ -caroteno (15.5); luteína (58.6); fitoeno (96.2) licopeno (79.4); $\beta$ -caroteno (99.5); luteína (91.6)	Garrett <i>et al.</i> , 1999 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007	Jeffery <i>et al.</i> , 2012 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007
Pulpa de tomate	licopeno (2 <sup>a</sup> ; 7.5 <sup>b</sup> ; 6 <sup>c</sup> )	Colle <i>et al.</i> , 2012	Colle <i>et al.</i> , 2013
Puré de espinacas	$\beta$ -caroteno (29); luteína (27)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Ferruzzi <i>et al.</i> , 2001
Espinacas	luteína (37.6); $\alpha$ -caroteno (2.4); $\beta$ -caroteno (26); zeaxantina (6.7) luteína (4.7);	Reboul <i>et al.</i> , 2006 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007	Reboul <i>et al.</i> , 2006 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007
Zanahoria	licopeno (38.9); $\alpha$ -caroteno (20.2); $\beta$ -caroteno (21.6); luteína (40.5); fitoeno (64.2) $\alpha$ -caroteno (72); $\beta$ -caroteno (75.4); luteína (50)	Garrett <i>et al.</i> , 1999 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007	Jeffery <i>et al.</i> , 2012 Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007
Pulpa de zanahoria cruda	$\beta$ -caroteno (21)	Hedren <i>et al.</i> , 2002	Hedren <i>et al.</i> , 2002
Puré de zanahoria	$\beta$ -caroteno (8.9); $\alpha$ -caroteno (4.4)	Reboul <i>et al.</i> , 2006	Reboul <i>et al.</i> , 2006
Zumo de zanahoria	luteína (22); $\alpha$ -caroteno (1.5); $\beta$ -caroteno (1.5)	Hedren <i>et al.</i> , 2006	Courraud <i>et al.</i> , 2013
Naranja	$\beta$ -criptoxantina (45); zeaxantina (43); luteína (26)	Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007a	Granado-Lorencio <i>et al.</i> , 2007a
Zumo de naranja	luteína (44); zeaxantina (47); $\beta$ -criptoxantina (53); $\alpha$ -caroteno (50); $\beta$ -caroteno (50)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Stinco <i>et al.</i> , 2013
Tapioca hervida	$\beta$ -caroteno (30)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Failla <i>et al.</i> , 2008
Uva	$\beta$ -caroteno (7.9); luteína (8.7); violaxantina (8.4); fitoeno (47.1)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Jeffery <i>et al.</i> , 2012
Mango	$\beta$ -caroteno (31.8); luteína (13.5); violaxantina (19.4)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Jeffery <i>et al.</i> , 2012
Papaya	$\beta$ -caroteno (48.5); luteína (37.3); violaxantina (21.6); fitoeno (67.8)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Jeffery <i>et al.</i> , 2012
Ensalada	luteína/zeaxantina (45.6); $\beta$ -caroteno (2.8); $\alpha$ -caroteno (2.0); licopeno (1.1)	Huo <i>et al.</i> , 2007	Huo <i>et al.</i> , 2007
Ensalada	luteína (82); licopeno (44); $\beta$ -caroteno (26)	Goñi <i>et al.</i> , 2006	Goñi <i>et al.</i> , 2006
Macedonia de frutos	luteína (32); licopeno (5); $\beta$ -caroteno (34)	Goñi <i>et al.</i> , 2006	Goñi <i>et al.</i> , 2006
Melón anaranjado	$\beta$ -caroteno (3.2)	Fleshman <i>et al.</i> , 2011	Fleshman <i>et al.</i> , 2011

Calabaza	$\alpha$ -caroteno (17.9); $\beta$ -caroteno (16.5); luteína (15.9); violaxantina (4.3)	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Jeffery <i>et al.</i> , 2012
Batata	$\beta$ -caroteno (5)	Hedren <i>et al.</i> , 2006	Mulokozi <i>et al.</i> , 2004
Pasta de trigo duro	luteína+zeaxantina (71)	Werner y Böhm, 2011	Werner y Böhm, 2011
Pasta de trigo duro con yema de huevo	luteína (57); zeaxantina (56); cantaxantina (51)	Werner y Böhm, 2011	Werner y Böhm, 2011
Guayaba	luteína (21); licopeno (73)	Chandrika <i>et al.</i> , 2006	Chandrika <i>et al.</i> , 2009
Sandía	licopeno (26)	Chandrika <i>et al.</i> , 2006	Chandrika <i>et al.</i> , 2009
Banana	$\beta$ -caroteno (22); $\alpha$ -caroteno (22.5); <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (27.8)	Reboul <i>et al.</i> , 2006	Ekesa <i>et al.</i> , 2012
Leche fortificada	luteína (46.5 <sup>d</sup> ; 45.8 <sup>e</sup> ; 19.7 <sup>f</sup> )	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Xavier <i>et al.</i> , 2014
Yogur fortificado	luteína (47.5 <sup>d</sup> ; 38.3 <sup>e</sup> ; 17.8 <sup>f</sup> )	Garrett <i>et al.</i> , 1999	Xavier <i>et al.</i> , 2014

<sup>a</sup> sin aceite añadido; <sup>b</sup> con aceite de oliva (5% p/p); <sup>c</sup> con aceite de pescado (5% p/p). <sup>e</sup> leche entera; <sup>f</sup> leche semidesnatada; <sup>g</sup> leche desnatada.

Khachik *et al.*, 1997; Kopec *et al.*, 2010). Durante la digestión, las xantofilas esterificadas con ácidos grasos son hidrolizadas, de forma que en plasma y tejidos se encuentran sobre todo carotenoides libres (Wingerath, Stahl y Sies, 1995; Pérez-Gálvez *et al.*, 2005).

### Biodisponibilidad de carotenoides de fuentes dietarias comunes

Se considera que los carotenoides de frutas son más biodisponibles que los de las hortalizas. De manera general, se sabe que la biodisponibilidad de carotenoides de la dieta en humanos es baja (O'Neill y Thurnham, 1998). Algunos estudios indican que las dosis pequeñas se absorben mejor que las grandes, por lo que se recomienda dividir la dosis diaria de carotenoides en varias porciones para ser consumidas a lo largo del día, lo que permite incrementar la concentración de carotenoides en suero (Prince y Frisoli, 1993; CNNP, 2010).

No obstante, investigaciones recientes, demuestran que la concentración de carotenoides en la fracción del plasma que contiene mayoritariamente lipoproteínas ricas en triglicéridos es superior cuando la ingesta se realiza en una dosis en lugar de varias ingestas al día (Goltz *et al.*, 2013).

Existen estudios que han demostrado que los valores de bioaccesibilidad son similares a los de biodisponibilidad (Borel *et al.*, 1998; Garret, Failla y Sarama, 1999). Sin embargo, en otros se ha observado lo opuesto (Granado-Lorencio *et al.*, 2007a). La bioaccesibilidad generalmente se determina empleando técnicas de digestión *in vitro*, que tratan, con limitaciones e innumerables variantes, de simular el proceso de digestión humano (Borel *et al.*, 1998a). Por eso, es importante verificar los valores obtenidos mediante métodos *in vitro* con los obtenidos *in vivo* (Granado *et al.*, 2006). En la tabla 1 se presentan los valores de bioaccesibilidad de carotenoides, definidos como el porcentaje de pigmento

que se incorpora a micelas respecto al contenido inicial de pigmento en el alimento. Indudablemente, dichos porcentajes de bioaccesibilidad son una buena estimación de la biodisponibilidad de carotenoides. Destacan en la tabla 1 los valores de bioaccesibilidad de carotenoides de cultivos biofortificados. La biofortificación busca incrementar la concentración de nutrientes en alimentos básicos; actualmente, los micronutrientes objetivo son hierro, zinc y carotenoides provitamina A, debido a la alta prevalencia de deficiencias de estos micronutrientes entre los niños de menos de cinco años y en mujeres en edad de procrear en zonas en desarrollo (La Frano *et al.*, 2014). Los alimentos biofortificados estudiados son tres, la batata (Failla, Thakkar y Kim, 2009; Mills *et al.*, 2009; Bechoff *et al.*, 2011), yuca (Thakkar *et al.*, 2007, 2009; Gomes *et al.*, 2013) y maíz (Thakkar y Failla, 2008).

Las algas son alimentos cada vez más habituales en nuestras dietas. Son ricas en algunos carotenoides biodisponibles. El  $\beta$ -caroteno y zeaxantina de *Spirulina* son altamente biodisponibles (Wang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012). Algas como *Haematococcus pluvialis* y *Botryococcus braunii* son fuentes importantes de  $\beta$ -caroteno, luteína y astaxantina, carotenoides que son biodisponibles de estas fuentes en ratas (Ranga Rao *et al.*, 2013).

### Presencia de carotenoides en fluidos biológicos

Los carotenoides se pueden encontrar en plasma y leche humana. Los niveles son aproximadamente cinco veces más altos en el calostro que en la leche (Sommerburg *et al.*, 2000). En este sentido, se ha hipotetizado que los carotenoides podrían estar relacionados con un menor riesgo de padecer cáncer en mujeres que han amamantado a sus hijos (Clarke,

Purdie y Glaser, 2006). El semen humano contiene licopeno, el cual podría tener un efecto beneficioso en la fertilidad masculina, posiblemente protegiendo a los espermatozoides de la oxidación (Gupta y Kumar, 2002).

### Presencia de carotenoides en tejidos

Se considera que la concentración de carotenoides es considerablemente mayor en tejidos como hígado, tejidos reproductivos y glándulas suprarrenales (Canene-Adams y Erdman Jr, 2009). La próstata, además de otros carotenoides minoritarios, contiene altos niveles de licopeno (Clinton *et al.*, 1996) y se ha planteado la hipótesis de que dicho carotenoide, presente en tomates y otros frutos rojos, podría tener un papel beneficioso en la disminución del riesgo de padecer cáncer de próstata (Hadley *et al.*, 2002). Los carotenoides también se encuentran en el tejido adiposo (Kabagambe *et al.*, 2005), la piel —donde pueden proteger de lesiones producidas por la radiación— (Stahl y Sies, 2012), los ojos —fundamentalmente en la mácula lútea de la retina, el área de mayor agudeza visual— (Bone *et al.*, 1997), el tejido mamario (Nantais-Smith *et al.*, 2001; Covington *et al.*, 2001), pulmones, cervix, colon (Khachik *et al.*, 2002) y cerebro (Craft *et al.*, 2004). A diferencia de otros tejidos, donde se pueden detectar varios carotenoides a concentraciones comparables, en la mácula lútea del ojo se pueden encontrar sólo luteína y zeaxantina. En el caso de zeaxantina hay que distinguir dos isómeros ópticos, concretamente (*3R,3'S, meso*)-zeaxantina y (*3R,3'R*)-zeaxantina (figura 6 del capítulo 1) (Bone *et al.*, 1997). La presencia selectiva de estos carotenoides en la retina se atribuye a la existencia de transportadores específicos para estos carotenoides (Bhosale *et al.*, 2004, 2009; Li *et al.*, 2011; Vachali, Nelson y Bernstein, 2012; Vachali *et al.*, 2013). Curiosamente en la piel se detectan ésteres de carotenoides (Wingerath, Sies y Stahl, 1998).

## FACTORES QUE DETERMINAN LA BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES

Los distintos factores que afectan a la biodisponibilidad de carotenoides pueden clasificarse de varias formas. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que pueden interactuar entre sí (Castenmiller y West, 1997; Yeum y Russell, 2002; Canene-Adams y Erdman Jr, 2009).

### Factores relacionados con los carotenoides

#### Polaridad de los carotenoides

La polaridad de los carotenoides modula su solubilidad en los lípidos de la dieta, el vehículo de estos pigmentos. La liposolubilidad depende de la estructura de cada carotenoide. La distinción general de carotenoides en carotenos y xantofilas supone ya una diferenciación en cuanto a su liposolubilidad. Los estudios comparativos indican una absorción preferente de xantofilas frente a carotenos, ya que las primeras son más polares (Faulks y Southon, 2005). Van Het Hof *et al.* (1999) demostraron que la absorción de luteína procedente de hortalizas es aproximadamente cinco veces mayor que la de  $\beta$ -caroteno. Otros han reportado resultados similares (Johnson *et al.*, 2000). Se ha sugerido que, debido a que son más polares, algunas xantofilas pueden incorporarse más fácilmente a las micelas que se forman en el intestino y, por tanto, ser absorbidas con mayor facilidad (Yeum y Russell, 2002). Chitchumroonchokchai, Schwartz y Failla (2004) demostraron que la micelarización *in vitro* de luteína y zeaxantina fue más eficiente que la de  $\beta$ -caroteno.

#### Isomería espacial

El perfil de isómeros de  $\beta$ -caroteno en sangre y tejidos es similar al que se encuentra en alimentos, donde el isómero *todo-trans* es mayoritario, aunque pueden detectarse ciertos niveles de

algunos isómeros *Z* (Faulks *et al.*, 1997; Godoy y Rodríguez-Amaya, 1998). Es interesante que cuando se administra una dosis de (*todo-E*)  $\beta$ -caroteno o (*9Z*)-caroteno, la configuración *todo-E* es la que se encuentra mayoritariamente cuando se evalúa la respuesta posprandial (Gaziano *et al.*, 1995). Esto sugiere una isomerización *9Z*- a *todo-E*. En este sentido, existen otras evidencias de que el (*9Z*)  $\beta$ -caroteno una vez ingerido podría isomerizarse al isómero *todo-E* (You *et al.*, 1996). En el caso de licopeno la situación es totalmente diferente. La mayor parte del licopeno en tomates y productos derivados se encuentra en la forma *todo-E* (Fraser y Bramley, 2004; Stinco *et al.*, 2013). Sin embargo, la proporción de isómeros *Z* en plasma y tejidos suele ser mayor (Stahl *et al.*, 1992; Clinton *et al.*, 1996; Schierle *et al.*, 1997; Ferruzzi, Failla y Schwartz, 2001). En este sentido, se ha hipotetizado que los isómeros *Z* se podrían absorber mejor o que podría producirse una isomerización *in vivo* (Stahl *et al.*, 1992). Unlu *et al.* (2007) también indicaron que la hipótesis de la absorción preferencial de los isómeros *Z* del licopeno no era suficiente para explicar por sí sola su presencia en altas proporciones en humanos, lo que sugiere que se producen isomerizaciones *in vivo*. Recientemente se demostró que la formación de (*5Z*)-licopeno está favorecida termodinámicamente y cinéticamente (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014a), lo cual podría explicar la mayor concentración de estos isómeros en suero y tejidos. En cualquier caso, es importante tener en cuenta el o los isómeros geométricos mayoritarios de carotenoides en fluidos o tejidos humanos a la hora de seleccionar los que serían más adecuados para administrar en los diversos tipos de experimentos para evaluar su actividad biológica (Meléndez-Martínez *et al.*, 2014a).

#### Esterificación

La esterificación de xantofilas con ácidos grasos puede afectar su estabilidad y biodisponibilidad. Existen evidencias

que sugieren que los carotenoides esterificados son más biodisponibles que los libres (Castenmiller y West, 1998; Faulks y Southon, 2005; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2005; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La esterificación de carotenoides con ácidos grasos aumenta su liposolubilidad, en comparación con la que presenta el carotenoide libre, y puede afectar su micelarización, como se ha sugerido en algunos estudios posprandiales e *in vitro* (Roodenburg *et al.*, 2000; Pérez-Gálvez *et al.*, 2003; Victoria-Campos *et al.*, 2013, 2013a). Sin embargo, tras la ingesta de alimentos ricos en ésteres de carotenoides, sólo se detectan en plasma las formas libres, lo que implica que en algún punto del proceso digestivo o de absorción se produce su desesterificación (Olson, 1984; Khachik *et al.*, 1992), aunque está descrita la presencia de ésteres de luteína en suero en sujetos suplementados con luteína y con concentraciones en sangre superiores a 60 µg/dL (Granado *et al.*, 1998). La esterificación de xantofilas y su consecuente mayor liposolubilidad podrían aumentar los requerimientos de sales biliares y enzimas digestivas. Algunos estudios de bioaccesibilidad indican que los requerimientos de ingesta de grasa para alcanzar una eficiencia de absorción de ésteres de xantofilas similar a la de sus correspondientes formas libres son superiores (Roodenburg *et al.*, 2000; Bowen *et al.*, 2002, Aman *et al.*, 2004). Se ha considerado que las lipasas pancreáticas realizan de forma eficiente la hidrólisis de los ésteres de carotenoides, generando las correspondientes formas libres. Sin embargo, Breithaupt, Bamedi y Wirt (2002) demostraron que la lipasa pancreática humana no hidroliza de forma eficiente los ésteres de xantofilas como β-criptoxantina, zeaxantina, luteína y capsantina, mientras que la lipasa pancreática porcina y la lipasa de *Candida rugosa* sí mostraron una actividad importante sobre dichos ésteres. Puede parecer difícil asumir que la lipasa pancreática humana no presente actividad sobre los ésteres de xantofilas pero

también se ha demostrado esta falta de actividad sobre otros sustratos (Rigtrup *et al.*, 1994). La enzima carboxil-éster lipasa, también conocida como colesterol esterasa, parece ser más activa en la desesterificación de los ésteres de carotenoides (Granado-Lorencio *et al.*, 2007a). Esta enzima es una lipasa no específica, cuya actividad depende de la presencia de sales biliares e hidroliza ésteres de colesterol, tri- di- y mono-acilglicéridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos y ceramida (Hui y Howles, 2002). Se considera que el rol de esta enzima es compensar o suplir la actividad hidrolítica de otras lipasas sobre esos sustratos (Harrison, 1998) e incluso se ha sugerido que su actividad está implicada directamente en la hidrólisis de ésteres de vitamina A (Rudd y Brockman, 1984; Rigtrup *et al.*, 1994). Si la enzima responsable de la hidrólisis de ésteres de carotenoides es la carboxil-éster lipasa habría que hacer una consideración importante relacionada con la zona donde se localiza la actividad de esta enzima. Existen evidencias de que es en la membrana de las células del epitelio intestinal donde se ejerce su actividad (Gallo *et al.*, 1977; Lechêne de la Porte *et al.*, 1987). En consecuencia, sólo el material lipídico que es finamente emulsionado y micelarizado y que, por tanto, llega a la membrana de las células epiteliales es susceptible de ser hidrolizado por esta enzima. En el caso concreto de los ésteres de carotenoides, aunque se haya demostrado que son sustratos para la carboxil-éster lipasa no se ha probado que las formas esterificadas se incorporen de forma eficiente a las micelas, hecho necesario para que puedan alcanzar la membrana de los enterocitos donde entonces serán hidrolizados.

### Interacción entre carotenoides

En una dieta normal se ingieren distintos carotenoides. Existen estudios que han demostrado que la absorción de algunos carotenoides podría verse afectada por otros, de forma que

podría existir una competencia por la absorción (Furr y Clark, 1997; Van Het Hof *et al.*, 1999; Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2010; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La suplementación con  $\beta$ -caroteno puede disminuir la absorción de luteína y licopeno (Prince y Frisoli, 1993). Se ha observado que la absorción de licopeno de puré de tomate disminuye cuando se toma además una porción de espinaca o píldoras de luteína. Los cambios fueron parecidos cuantitativamente cuando se suministró espinaca o luteína purificada, apoyando la hipótesis de que la luteína era el componente causante de tal reducción y no otros componentes de la espinaca, como la fibra. De forma parecida, la absorción de luteína en personas que tomaron espinacas disminuyó cuando se ingirió simultáneamente puré de tomate o suplementos de licopeno (Tyssandier *et al.*, 2002).

### Cantidad de carotenoides

La cantidad consumida de carotenoides puede afectar a su biodisponibilidad. Por ejemplo, a dosis altas, la concentración de  $\beta$ -caroteno en suero parece ser independiente del tamaño de las dosis (Ornelas-Paz *et al.*, 2010; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La suplementación de mujeres lactantes con dosis orales de 60 o 210 mg de  $\beta$ -caroteno generó una respuesta similar de  $\beta$ -caroteno en suero y leche materna (Canfield *et al.*, 1997). Todo esto sugiere, en conjunto, que el intestino humano tiene una capacidad finita para absorber carotenoides. En cambio, dosis pequeñas de carotenoides se pueden absorber más eficientemente (Castenmiller y West, 1998; Furusho *et al.*, 2000; Van Lieshout *et al.*, 2001; Rao y Shen, 2002). En el caso de los carotenoides provitamina A hay que diferenciar entre la absorción del carotenoide intacto y su transformación en retinol.

## Factores relacionados con la fuente de carotenoides

### Efecto de la matriz alimentaria

La matriz en la que se encuentran los carotenoides juega un papel esencial en su biodisponibilidad. En este sentido hay que tener en cuenta que los carotenoides no sólo se pueden obtener de alimentos, sino también de otras fuentes, como suplementos, en los que la formulación juega un papel esencial en su liberación. Existen muchos ejemplos que demuestran el efecto tan importante que juega la matriz alimentaria en la biodisponibilidad de carotenoides. La luteína es más biodisponible de huevos que de espinacas (Chung, Rasmussen y Johnson, 2004). El  $\beta$ -caroteno disuelto en aceite se absorbe mejor que el que se encuentra en alimentos (Castenmiller y West, 1998). Los carotenoides de frutas suelen ser más biodisponibles que los de las hortalizas verdes (De Pee *et al.*, 1998). Se piensa que la baja biodisponibilidad de los carotenoides de éstas se debe en gran parte a que se encuentran asociados a proteínas en los cloroplastos (De Pee y West, 1996; Castenmiller y West, 1998). Por otra parte, cuando los carotenoides se encuentran formando cristales en los alimentos (como los cristales de  $\beta$ -caroteno en zanahorias y de licopeno en los tomates), su biodisponibilidad es más baja (De Pee y West, 1996; De Pee *et al.*, 1998; Knockaert *et al.*, 2012; Schweiggert *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2011). La situación es diferente en frutas como la papaya y el mango, donde los carotenoides están disueltos en gotas de aceite y se liberan más fácilmente en el tracto gastrointestinal (Castenmiller y West, 1998). Recientemente se ha demostrado en ratas que la biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno de mango Ataúlfo es superior a la del  $\beta$ -caroteno de zanahorias (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2010). Asimismo, existen evidencias de que el  $\beta$ -caroteno de mangos y papayas es más biodisponible que

el de espinacas, cilantro y zanahorias (Carrillo-López, Yahia y Ramírez-Padilla, 2010).

### Efecto del procesamiento

El tratamiento térmico y mecánico de los alimentos puede aumentar la biodisponibilidad de los carotenoides al favorecer su liberación de la matriz. Esto se debe a que el procesamiento contribuye a la rotura de paredes celulares, orgánulos intracelulares, asociaciones proteína-carotenoide y al incremento en la digestibilidad del alimento (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Canene-Adams y Erdman Jr, 2009; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). La biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno y licopeno de tomates se incrementa al aumentar el grado de homogenización (Van Het Hof *et al.*, 2000). La absorción de  $\beta$ -caroteno de puré de zanahorias cocidas es mayor que la de puré de zanahorias crudas (Livny *et al.*, 2003). Por otra parte, la adición de aceite durante el procesado puede favorecer la disolución de los cristales de carotenoides. En el caso del tomate, la adición de aceite también puede favorecer la isomerización del licopeno (Van Het Hof *et al.*, 1998).

Si bien el procesamiento puede favorecer la absorción de carotenoides al promover su liberación del alimento, es importante controlar bien la temperatura, tiempo y otras condiciones, ya que tratamientos muy severos pueden producir pérdidas excesivas de carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1997; Van Jaarsveld *et al.*, 2006; Gibson, Perlas y Hotz, 2007; Maiani *et al.*, 2009).

### Formulación

Los carotenoides de suplementos son, en general, más biodisponibles que los de la mayoría de las fuentes naturales. Los vehículos para carotenoides utilizados en dichos suplementos son variados. Dichos vehículos deben promover

su estabilidad y liberación, así como otras propiedades (Boon *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; De Paz *et al.* 2014). Se ha comprobado en humanos que el  $\beta$ -caroteno de una bebida enriquecida con dicho carotenoide microencapsulado y dispersado en agua es considerablemente más biodisponible que el de jugo de zanahorias (Thürmann *et al.*, 2002). Evans *et al.* (2013) demostraron que formulaciones de luteína basadas en almidón son más biodisponibles que aquellas basadas en alginato.

### Factores relacionados con otros componentes de la dieta

#### Grasa

El papel de la grasa en la biodisponibilidad de los carotenoides es muy importante. La grasa estimula la liberación de sales biliares y aumenta el tamaño y número de las micelas, facilitando así la solubilización de carotenoides en las mismas y su penetración en las células intestinales. Es necesaria para que el intestino secrete cantidades significativas de lipoproteínas ricas en triglicéridos, en las cuales se vehiculizan los carotenoides (Dubois *et al.*, 1994; Canene-Adams y Erdman Jr, 2009). Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto que la grasa de la dieta mejora la biodisponibilidad de carotenoides. Unlu *et al.* (2005) demostraron que la absorción de carotenoides de salsas y ensaladas aumenta cuando se consumía simultáneamente aguacate o aceite de aguacate como fuente de grasa. Ornelas-Paz *et al.* (2008) demostraron que la adición de grasa dietaria incrementaba la micelarización de  $\beta$ -caroteno de mangos inmaduros, medianamente maduros y completamente maduros en 25.7, 114.4 y 231.1%, respectivamente. En este estudio se empleó un método *in vitro* de digestión acoplado a células Caco-2. Los mismos autores también observaron que el consumo simultáneo de grasa y

mango aumentaba al doble la biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno de la fruta en ratas (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2010).

Un aspecto importante a considerar es la cantidad de grasa que es necesaria para la adecuada absorción de carotenoides. Algunos autores sugieren un mínimo de 5 g/día (Castenmiller y West, 1998), mientras que otros recomiendan un consumo de 3-5 g por alimento (Roodenburg *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004). Es interesante reparar en el hecho de que existen evidencias de que el incremento en la cantidad de grasa no genera necesariamente un incremento proporcional en la biodisponibilidad de los carotenoides (Brown *et al.*, 2004).

Además de la cantidad, es también importante considerar el tipo de grasa consumida. En un interesante estudio se observó que la absorción de  $\beta$ -caroteno fue menor cuando la fuente alimentaria se consumió en presencia de aceite de girasol (rica en ácidos grasos insaturados) que cuando se hizo lo propio en presencia de grasa de res (rica en ácidos grasos saturados), aunque la respuesta lipémica fue mayor como consecuencia del consumo del aceite (Hu, Jandacek y White, 2000). Algunos estudios han demostrado que la biodisponibilidad de carotenoides disminuye cuando se ingieren triacilglicéridos de cadena corta-media en vez de triacilglicéridos de cadena larga, aunque no se ha identificado la etapa donde esta diferencia ejerce su efecto (Hollander y Ruble, 1978; Borel *et al.*, 1998a).

### Efecto de la fibra dietética

La fibra también tiene un papel importante en la biodisponibilidad de carotenoides. Suele tener un efecto negativo, que podría deberse, entre otros factores, a que secuestra sales biliares (necesarias para la micelarización) y a que aumenta la viscosidad del medio gastrointestinal, lo que dificulta el contacto entre micelas ricas en carotenoides y

el enterocito (Pasquier *et al.*, 1996; Canene-Adams y Erdman Jr, 2009). Se ha demostrado que la adición de pectina a un alimento rico en carotenoides reduce considerablemente la respuesta plasmática del  $\beta$ -caroteno en humanos (Rock y Swendseid, 1992). Riedl *et al.* (1999) administraron diversos tipos de fibras (pectina, goma guar, alginato, celulosa y salvado de trigo) en cantidades de 0.15 g/kg de peso corporal a humanos y observaron que la pectina, goma guar y alginato disminuyeron la absorción de  $\beta$ -caroteno entre 33 y 43%, mientras que todas las fibras redujeron la absorción de licopeno y luteína entre 40 y 70%. Se ha demostrado que la presencia de sustitutos de las grasas en la dieta, como poliésteres de sacarosa, reduce notablemente la bioaccesibilidad de carotenoides (Cooper, Webb y Peters, 1997). También existen evidencias de que tanto la cantidad total como el tipo de pectina presente en la matriz alimentaria afectan la incorporación de carotenoides en micelas (Ornelas-Paz *et al.*, 2008).

### Efecto de la vitamina E

El consumo simultáneo de vitamina E podría afectar negativamente la absorción de carotenoides. Entre otras razones, dicha vitamina podría competir con los carotenoides por su incorporación a micelas (Furr y Clark, 1997).

### Efecto de los minerales

El papel de los minerales en la biodisponibilidad de carotenoides se ha estudiado escasamente. En un estudio reciente en el que se usó un método *in vitro* de digestión acoplado a cultivos celulares (Caco-2) se observó que los minerales divalentes causaron una disminución de la micelarización de carotenoides y su posterior incorporación a las células Caco-2. Los efectos fueron más marcados con Fe y Zn que con Ca y Mg (Biehler *et al.*, 2011).

## Efecto de los fitoesteroles

Los esteroides de las plantas reducen la absorción de colesterol. Asimismo, existen estudios que indican que pueden disminuir la absorción de carotenoides (Richelle *et al.*, 2004; Amundsen *et al.*, 2004). Sin embargo, está descrita la ausencia de efecto de los fitoesteroides sobre la biodisponibilidad de  $\beta$ -criptoxantina ingerida simultáneamente (Granado-Lorencio *et al.*, 2011)

## Factores relacionados con el individuo

### Estatus de vitamina A

La absorción de carotenoides puede verse afectada por el estatus de vitamina A. Se ha demostrado que la absorción y bioconversión a vitamina A de carotenoides varió inversamente con el estatus de dicha vitamina. Esta investigación se llevó a cabo con niños filipinos con reservas bajas o marginales de la vitamina (Ribaya-Mercado *et al.*, 2000).

### Bioconversión de carotenoides a vitamina A y otros componentes

Los carotenoides pueden metabolizarse enzimáticamente, y se forman en primera instancia metabolitos como retinoides y apocarotenoides, los cuales pueden intervenir en acciones biológicas. En mamíferos, se han identificado dos enzimas responsables de la rotura oxidativa de carotenoides. BCMO1 ( $\beta$ , $\beta$ -caroteno 15,15'-monooxigenasa 1) rompe la molécula de algunos carotenoides en el centro dando dos moléculas de todo-*trans*-retinal, que puede oxidarse de forma irreversible para formar ácido retinoico o reducirse de forma reversible para dar lugar a retinol. BCDO2 ( $\beta$ , $\beta$ -caroteno 9,10'-dioxigenasa 2) rompe los carotenoides de forma excéntrica, en el doble enlace 9, 10 o 9'-10', dando lugar a apocarotenoides y otro derivado de menor peso molecular (Mein *et al.*, 2011; Lietz *et*

*al.*, 2012; Lobo *et al.*, 2012). El conocimiento de los factores que afectan la actividad de estas enzimas es importante para explicar los niveles de carotenoides en humanos.

### Sexo

Se piensa que podrían existir diferencias en la biodisponibilidad de carotenoides en función del sexo. En un estudio se observó que la respuesta plasmática a una dosis de  $\beta$ -caroteno era mayor en hombres que en mujeres (Nierenberg *et al.*, 1991), aunque estos resultados podrían deberse en parte a las diferencias en peso y composición corporal entre ambos sexos (West y Castenmiller, 1998). En cualquier caso es importante tener en cuenta que los niveles plasmáticos de carotenoides pueden variar considerablemente a lo largo del ciclo menstrual (Forman *et al.*, 1996, 1998). Sin embargo, cuando estos niveles de carotenoides se ajustan a la concentración de colesterol, no se observan cambios importantes durante el ciclo (Rock *et al.*, 1995).

### Edad

El efecto de la edad en la biodisponibilidad de carotenoides no está totalmente claro. En algunos estudios se ha observado una respuesta plasmática de  $\beta$ -caroteno y luteína mayor en personas de edad avanzada que en jóvenes (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2014), mientras que en otros estudios se ha reportado lo contrario (Sugarman *et al.*, 1991). Algunas investigaciones han concluido que el contenido de algunos carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína) en quilomicrones 9 horas después del consumo del alimento investigado no difiere significativamente entre jóvenes y personas de edad avanzada. En el caso del licopeno sí se detectaron diferencias importantes, concretamente una respuesta menor en las personas mayores (Cardinault *et al.*, 2003).

### Enfermedades e infecciones

Evidentemente, la absorción de sustancias liposolubles en general y carotenoides en particular puede verse modificada por cualquier trastorno que afecte la digestión y absorción de grasas (West y Castenmiller, 1998). Existen evidencias de distinta naturaleza que indican que la infección con parásitos disminuye la biodisponibilidad de carotenoides (De Pee *et al.*, 1998; Jalal *et al.*, 1998).

### Consumo de alcohol

El alcohol podría afectar a la biodisponibilidad de carotenoides; sin embargo, se requieren más estudios para demostrar el efecto negativo del alcohol en la absorción de carotenoides (Albanes *et al.*, 1997).

### Tabaquismo

El tabaquismo puede afectar los niveles de carotenoides presentes en humanos. Ross *et al.* (1995) analizaron los contenidos de carotenoides y vitaminas C y E en plasma de varones de entre 50 y 59 años y concluyeron que los niveles de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina eran significativamente menores en fumadores (Ross *et al.*, 1995).

### Variaciones interindividuales

La capacidad de absorber carotenoides puede variar de forma muy significativa de unos individuos a otros, de forma que algunos pueden considerarse como de respuesta baja o incluso no responsivos (Canene-Adams y Erdman Jr, 2009). Las personas no responsivas son aquellas que muestran aumentos pequeños o nulos de carotenoides en plasma tras la ingesta continua de dietas o suplementos ricos en carotenoides. Entre los factores que podrían estar relacionados con dicha falta de respuesta se encuentran problemas en la incorporación del carotenoide por los enterocitos,

conversión excesiva en vitamina A o errores en el metabolismo de lipoproteínas, entre otros (Borel *et al.* 1998). Como se explicó antes, existen transportadores de carotenoides que están involucrados en su biodisponibilidad. La cantidad y funcionalidad de dichos transportadores depende en gran parte del genotipo de cada individuo. Los estudios nutrigenómicos en este contexto son por tanto de gran interés (Reboul y Borel, 2011; Borel, 2012).

## MÉTODOS PARA DETERMINAR LA BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES

Para estimar la biodisponibilidad de carotenoides se han usado distintas estrategias, que van desde la simulación *in vitro* de la digestión hasta la administración de carotenoides radiactivos en humanos (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). También se han realizado estudios con animales (Zuniga y Erdman, 2011; Sy *et al.*, 2012). Sin embargo, el proceso de absorción y transporte de carotenoides en humanos no se simula de forma exacta por ningún modelo *in vitro* o animal (Lee *et al.*, 1999). Muchos estudios han examinado la biodisponibilidad de carotenoides en humanos (Castenmiller *et al.*, 1999; Tyssandier *et al.*, 2003, Riso *et al.*, 2005, 2010; Ross *et al.*, 2011, Goltz *et al.*, 2013; Granado *et al.*, 2006, 2009, 2010), usando una dosis única. Borel *et al.* (1998) demostraron una alta correlación entre la bioaccesibilidad de carotenoides *in vitro* y los resultados de biodisponibilidad *in vivo* en humanos. Eso permite plantear los modelos *in vitro* como una buena alternativa para el estudio de la biodisponibilidad de carotenoides evitando el mayor costo y esfuerzo que suponen los modelos *in vivo* (Carbonell-Capella *et al.*, 2014).

## Balance de materia

Este método consiste en administrar un alimento rico en carotenoides a individuos sometidos previamente a una dieta baja en carotenoides durante algunas semanas, analizando el contenido de carotenoides en las heces fecales expulsadas. Este método considera que la cantidad de carotenoides absorbida es igual a la diferencia entre la cantidad de carotenoides administrados y la cantidad de carotenoides excretados. Una ventaja es que es un método no invasivo. Una desventaja es que es difícil controlar la dieta de los voluntarios durante el periodo previo al experimento (periodo de limpieza o agotamiento). Tampoco considera degradaciones ni transformaciones de carotenoides durante su paso a través del tracto gastrointestinal, ni contempla que existen algunas especies de *Bacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, propias de la flora intestinal humana que pueden metabolizar carotenoides. Finalmente, este método implica trabajar con heces, lo cual puede ser desagradable para el analista. Generalmente el periodo de recolección de heces puede ir de tres a cinco días después de haberse administrado el alimento rico en carotenoides (Van den Berg *et al.*, 2000).

## Balance ileostómico

Este método consiste en administrar un alimento rico en carotenoides a individuos que fueron sometidos a una ileostomía (abertura en el vientre a través de la cual se eliminan las heces) y que también fueron sometidos a una dieta baja en carotenoides durante algunas semanas previas al experimento. Posteriormente, se analiza el contenido de carotenoides en los fluidos que salen del intestino delgado. Este método también considera que la cantidad de carotenoides absorbida es igual a la diferencia entre la cantidad de carotenoides administrados

y excretados. De esta forma se evita el tránsito del alimento por el intestino grueso, con lo cual se ahorra bastante tiempo y se evitan algunas degradaciones y transformaciones de los carotenoides. Sin embargo es difícil controlar exhaustivamente la dieta de los voluntarios durante el periodo previo al experimento (periodo de limpieza o agotamiento) y no se tienen en cuenta degradaciones ni transformaciones de carotenoides durante su paso a través del tracto gastrointestinal (Faulks *et al.*, 1997).

## Lavado gastrointestinal

Este método consiste en administrar un alimento rico en carotenoides a individuos que fueron sometidos previamente a una dieta baja en carotenoides durante algunas semanas. Posteriormente, se administra a los voluntarios una pasta basada en polietilenglicol, para acelerar el tránsito de los carotenoides a lo largo del tracto gastrointestinal. Finalmente, se analiza el contenido de carotenoides en las heces fecales excretadas. Este método también considera que la cantidad de carotenoides absorbida es igual a la diferencia entre la cantidad de carotenoides administrados y excretados. Presenta una ventaja adicional a las que tienen los métodos explicados antes, que consiste en que el paso del alimento por el tracto gastrointestinal es rápido, con lo cual se ahorra bastante tiempo de colección de heces fecales. Una desventaja es que los polietilenglicoles administrados aceleran el paso del alimento a través del tracto gastrointestinal, lo cual puede evitar una adecuada liberación de los carotenoides desde el alimento (Shiau *et al.*, 1994).

## Evaluación de niveles en plasma

Al igual que en los métodos anteriores, los voluntarios reciben un alimento rico en carotenoides tras un periodo de dieta baja en carotenoides. Después se analiza el incremento de los

niveles de carotenoides en el plasma o algunas fracciones de éste. El estudio puede considerar una sola dosis o varias dosis durante un periodo largo. Para el caso de una sola dosis, el método implica que se obtenga una muestra inicial de plasma, previo al suministro del alimento, y otras varias muestras inmediatamente después de administrado el alimento. En general las muestras se toman cada hora durante un periodo promedio de seis horas. Cuando el experimento es a largo plazo generalmente sólo se toman dos muestras, una al comienzo y otra al final del experimento (Wingerath *et al.*, 1995; Olmedilla *et al.*, 2002; Pérez-Gálvez *et al.*, 2005). Una ventaja de este método es que las condiciones experimentales son fisiológicas. Sin embargo, es difícil controlar la dieta de los voluntarios durante el periodo previo al experimento (periodo de limpieza o agotamiento) y en los estudios a largo plazo durante el periodo de experimentación. Por otra parte, no permite obtener datos absolutos de biodisponibilidad. Generalmente los datos se presentan en mg/mL de plasma o como área bajo la curva, por lo que sólo permite comparar la biodisponibilidad de carotenoides entre alimentos. Generalmente estas evaluaciones son difíciles de interpretar, ya que las concentraciones de estos compuestos son muy pequeñas y en algunos casos los cambios de concentración apenas se detectan. Esto puede evitarse en cierta medida incrementando la cantidad de carotenoides suministrada a los individuos. Se recomienda utilizar fracciones del plasma ricas en carotenoides (aquellas fracciones que contienen los quilomicrones), con la finalidad de hacer más sensible el método y de estimar los carotenoides plasmáticos de nueva absorción. No obstante la obtención de dichas fracciones puede ser complicada (Van den Berg *et al.*, 2000).

Como ya se ha comentado, en el caso de los experimentos en los que se usa una sola dosis, las muestras se toman

durante las primeras seis horas posteriores al suministro de los alimentos. Se ha demostrado que parte de los carotenoides absorbidos son retenidos en el enterocito hasta que se suministra un segundo alimento. Con la finalidad de considerar este hecho en las mediciones, el número de muestras se puede incrementar hasta doce, lo cual es molesto para los voluntarios. Aun así, se ha demostrado que después del consumo de un alimento rico en carotenoides, los niveles de estos compuestos en el plasma se mantienen elevados hasta por diez días después del suministro del alimento, lo cual afecta seriamente los resultados (Granado, Olmedilla y Blanco, 2004; Tyssandier *et al.*, 2002, 2003).

Otras desventajas de este método es que suele observarse una gran variabilidad interindividual, así como un cierto número de voluntarios no responsivos (Van den Berg *et al.*, 2000; Maiani *et al.*, 2009).

## Métodos isotópicos

Consiste en suministrar una dosis de carotenoides marcados radiactivamente y monitorear la absorción de los átomos isotópicos. Por ética, este método en humanos está prohibido, a menos que se utilicen isótopos estables. Aun así, existen algunos reportes de este tipo (Goodman *et al.*, 1966; Blomstrand *et al.*, 1966). Este método es uno de los que ofrece mayores ventajas, pues es muy sensible y permite obtener datos absolutos.

## Modelos animales

Estos métodos consisten en suministrar un alimento rico en carotenoides a animales modelo y evaluar su respuesta en plasma o su acumulación en tejidos. Aunque algunos sugieren

que jerbos o hurones simulan el metabolismo humano, lo cierto es que es más que dudable, dadas las enormes diferencias fisiológicas existentes. En estos casos se puede tener un control completo de la dieta de los animales durante todo el tiempo que dura el experimento. Algunos de ellos permiten obtener datos absolutos, especialmente cuando se estudia la acumulación de carotenoides en ciertos órganos (Ornelas-Paz *et al.*, 2010).

### Modelos basados en digestiones *in vitro*

Se considera que los modelos *in vivo* aportan información fundamentalmente sobre los factores asociados al sujeto y los modelos *in vitro* sobre los asociados al alimento. Estos modelos aportan información complementaria, pero no necesariamente intercambiable (Granado *et al.*, 2006). Los modelos *in vitro* se basan en la fisiología humana y se han desarrollado como métodos simples, baratos y reproducibles para estudiar la estabilidad de los componentes de los alimentos durante la digestión, la micelarización, el transporte intestinal y el metabolismo, con la finalidad de predecir la biodisponibilidad a partir del alimento (Maiani *et al.*, 2009). Para el estudio de los procesos preabsortivos de los carotenoides se utilizan modelos de digestión *in vitro*, de micelarización y de incorporación celular (células Caco-2), que aportan información sobre los factores ligados al alimento que pueden afectar su biodisponibilidad (término actualmente utilizado preferentemente en estudios *in vivo*). Los métodos *in vitro* utilizados hasta ahora con los carotenoides son muy diversos y dan lugar a resultados que, en general, son difícilmente comparables. Los métodos de digestión *in vitro* constan de diversas etapas. La masticación del alimento, previa a su digestión, indudablemente afecta la bioaccesibilidad de los carotenoides. Este es uno de los puntos coyunturales de los

modelos *in vitro*, ya que determina en gran parte la liberación de carotenoides del alimento. El grado de masticación u homogenización dará origen a diferentes tamaños de partículas. A menor tamaño de partícula del alimento, mayor superficie disponible para la acción de las enzimas digestivas (Hedré, Díaz y Svanberg, 2002; Granado-Lorencio *et al.*, 2007a, 2009). En los modelos de digestión *in vitro* puede incluirse la fase oral o no, que consiste en exponer al alimento a la acción de la  $\alpha$ -amilasa a 37 °C, lo que favorece la hidrólisis del almidón de la matriz (Hedré, Díaz y Svanberg, 2002; Reboul *et al.*, 2006; O'Connell, Ryan y O'Brien, 2007; Takkar *et al.*, 2007; Failla *et al.*, 2008; Granado-Lorencio *et al.*, 2009). Los tiempos y pH de esta etapa suelen variar de cinco a diez minutos y de 6.5 a 6.8, respectivamente. Esta etapa es sin duda importante. La bioaccesibilidad *in vitro* de  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno cuando se incluye la fase oral varió entre el 72 y 75.4%, mientras que sin dicha fase la bioaccesibilidad de estos carotenos fue del 31.5 y 33.5%, respectivamente (Hedré, Díaz y Svanberg, 2002; Granado-Lorencio *et al.*, 2007a).

La fase gástrica consiste en exponer al alimento en contacto con pepsina en condiciones ácidas a temperatura fisiológica y con agitación. Se añade ácido clorhídrico para obtener un pH ácido. Puede agregarse mucina y albúmina de suero bovino (Granado-Lorencio *et al.*, 2007). En general, el pH usado oscila entre 1 y 2.5. El tiempo de digestión gástrica comúnmente varía entre una y dos horas (Hedré, Díaz y Svanberg, 2002, Granado-Lorencio *et al.*, 2007, Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera 2007, Takkar *et al.*, 2007, Failla *et al.*, 2008). Reboul *et al.* (2006), por su parte, utilizaron un pH de 4 y un tiempo de digestión gástrica de 30 minutos, por considerar que son las condiciones fisiológicas para la digestión de frutas y hortalizas. En estas condiciones la micelarización de carotenoides fue menor.

La fase intestinal de la digestión se realiza a 37 °C, a un pH de entre 6 y 8 y un tiempo que suele variar entre 1-2.5 horas. Las principales diferencias entre los protocolos publicados se encuentran en las soluciones enzimáticas utilizadas, en las que, en general, se incluyen la pancreatina y las sales biliares (Reboul *et al.*, 2006). Algunos añaden otras enzimas como lipasa, colipasa y carboxil-éster lipasa (Granado-Lorencio *et al.*, 2007a, O'Connell, Ryan y O'Brien, 2007, Takkar *et al.*, 2007, Failla *et al.*, 2008). Estas variaciones pueden dar lugar a importantes diferencias en la bioaccesibilidad de carotenoides. Así, por ejemplo, cuando no se añaden sales biliares, la bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno disminuye aproximadamente 80%, en cambio, si se duplica su cantidad, de 20 a 50 g/L, no hay un incremento adicional en la bioaccesibilidad (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). La carboxil-éster lipasa parece ser determinante en la liberación de las xantofilas a partir de sus formas esterificadas presentes en los alimentos (Chitchumroonchokchai y Failla, 2006, Granado-Lorencio *et al.*, 2007a). Durante esta etapa se presenta la formación de micelas y la incorporación de carotenoides a las mismas. La separación de la fase micelar se suele realizar por centrifugación o por sedimentación, con tiempos y velocidades muy variables.

Los estudios *in vitro* indican que los carotenoides son bastante estables durante el paso por el tracto gastrointestinal, ya que, como media, 80% de los carotenoides habitualmente estudiados en la dieta, permanece al final de la digestión (Garret *et al.*, 1999; Chitchumroonchokchai, Schwartz y Failla, 2004; Serrano *et al.*, 2005; Granado-Lorencio *et al.*, 2007). Cuando se valora el contenido de carotenoides esterificados, independientemente del alimento estudiado, se observa que la hidrólisis durante la digestión *in vitro* es incompleta (aproximadamente menos de 40%) (Chitchumroonchokchai

y Failla, 2006, Granado-Lorencio *et al.*, 2007, 2007a). En cambio, la fase de transferencia micelar es crítica para su biaccesibilidad y esto depende de la estructura del carotenoide y del alimento que lo contiene. Por último, en algunos estudios de bioaccesibilidad se incluye como paso final la captación celular, utilizando células Caco-2 como sustitutos de enterocitos intestinales, absorción e incorporación en quilomicrones. Hay que tener presente que aunque el uso de estas células aporte información mecanística (proporción y mecanismos de transporte a lo largo del tiempo, saturación e interacciones), ningún cultivo celular incorpora o metaboliza estos compuestos como las células normales del intestino humano. Los resultados suelen expresarse de diversas maneras, todas ellas válidas, si se consideran las limitaciones de estos modelos (O'Connell *et al.*, 2007; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2007; Granado-Lorencio *et al.*, 2007a; Kean *et al.* 2011; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013), aunque la comparación de resultados entre estudios es difícil.

## NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN

El entendimiento del proceso de absorción de carotenoides es crucial para diseñar estrategias que permitan aumentar su biodisponibilidad. Los mecanismos involucrados en su incorporación intestinal y posterior transporte no se conocen por completo. Estudios con carotenoides marcados isotópicamente sin duda permitirán mejorar el conocimiento sobre dichos mecanismos. Por otra parte, la nutrigenómica está ayudando ya a entender factores genéticos individuales relacionados con la biodisponibilidad de carotenoides; sin embargo, se requieren más estudios de esta naturaleza.

Si bien se conocen los factores que modulan la

biodisponibilidad de carotenoides de la dieta, los estudios existentes son simples y no reproducen exactamente las condiciones reales. El estudio de la interacción de factores es relevante en este sentido. Particular énfasis debe ponerse en los efectos de la cantidad y tipo de fibras, grasa y minerales.

La determinación de la biodisponibilidad de carotenoides de fuentes no tradicionales es un campo de investigación

poco estudiado. Asimismo, la elaboración de tablas de biodisponibilidad de carotenoides de alimentos crudos y procesados es un importante campo de trabajo para el futuro.

Por otra parte, es esencial la adopción de métodos consensuados de digestión *in vitro* que permitan comparar de una forma más directa y razonable los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Recientemente se ha propuesto una metodología consensuada a nivel internacional (Minekus *et al.*, 2014), que, aun así, debe adaptarse para algunos fines.

## REFERENCIAS

- Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., Rautalahti, M., Pietinen, P., Heinonen, O.P. 1997. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 366-372.
- Altmann, S.W., Davis, H., Yao, X., Lavery, M., Compton, D.S., Zhu, L.J., Crona, J.H., Caplen, M.A., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Priestley, T., Burnett, D.A., Strader, C.D., Graziano, M.P. 2002. *Biochimica et Biophysica Acta* 1580: 77-93.
- Altmann, S.W., Davis, H.R. Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M.P. 2004. *Science* 303: 1201-1204.
- Aman, R., Bayha, S., Carle, R., Schieber, A. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6086-6090.
- Amundsen, A.L., Ntanios, F., Van der Put, N., Ose, L. 2004. *European Journal of Clinical Nutrition* 58: 1612-1620.
- Asai, A, Yonekura, L. y Nagao, A. 2008. *The British Journal of Nutrition* 100: 273-277.
- Barreto, G.P.M., Fabi, J.P., De Rosso, V.V., Cordenunsi, B.H., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O., Mercadante, A.Z. 2011. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 620-624.
- Barua, A.B. y Olson, J.A. 2001. *The Journal of Nutrition* 131: 3212-3215.
- Bechoff, A., Poulaert, M., Tomlins, K.I., Westby, A., Menya, G., Young, S., Dhuique-Mayer, C. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10373-10380.
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., Olmedilla Alonso, B., 2012. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1334-1343.
- Ben-Amotz, A. y Levy, Y. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 729-734.
- Bhosale, P., Larson, A.J., Frederick, J.M., Southwick, K., Thulin, C.D., y Bernstein, P.S. 2004. *Journal of Chemical Biology* 279: 49447-49454.
- Bhosale, P., Li, B., Sharifzadeh, M., Gellermann, W., Frederick, J.M., Tsuchida, K., Bernstein, P.S. 2009. *Biochemistry* 48: 4798-4807.
- Biehler, E., Hoffmann, L., Krause, E., Bohn, T. 2011. *The Journal of Nutrition* 141: 1769-1776.
- Blomstrand, R. y Werner, B. 1967. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 19: 339-345.
- Boffelli, D., Compassi, S., Werder, M., Weber, F.E., Phillips, M.C., Schulthess, G., Hauser, H. 1997. *FEBS Letters* 411: 7-11.
- Bone, R.A., Landrum, J.T., Friedes, L.M., Gómez, C.M., Kilburn, M.D., Menéndez, E., Vidal, I., Wang, W. 1997. *Experimental Eye Research* 64: 211-218.

## REFERENCIAS

- Boon, C.S, McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E. 2010. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 5: 515-532.
- Borel, P. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 228-240.
- Borel, P., Grolier, P., Mekki, N., Boirie, Y., Rochette, Y., Le Roy, B., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998. *Journal of Lipid Research* 39: 2250-2260.
- Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998a. *The Journal of Nutrition* 128: 1361-1367.
- Borel, P., Lietz, G., Goncalves, A., De Edelenyi, F.S., Lecompte, S., Curtis, P., Goumidi, L., Caslake, M.J., Miles, E.A., Packard, C.P., Calder, P.C., Mathers, J.C., Minihane, A.M., Tourniaire, F., Kesse-Guyot, E., Galan, P., Hercberg, S., Breidenassel, C., González Gross, M., Meirhaeghe, M.M.A., Reboul, E. 2013. *The Journal of Nutrition* 143: 448-456.
- Bowen, P.E., Herbst-Espinosa, S.M., Hussain, E.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M. 2002. *The Journal of Nutrition* 132: 3668-3673.
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K.H. 2000. *Journal of the Science Food and Agriculture* 80: 913-938.
- Breithaupt, D.E., Bamedi, A. y Wirt, U. 2002. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132: 721-728.
- Britton, G., y Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and Health*, pp. 45-66. Basilea, Boston, Berlin: Birkhäuser.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., White, W.S. 2004. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 396-403.
- Canene-Adams, K. y Erdman Jr, J.W. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and Health*, pp. 115 -148. Basilea, Boston, Berlín: Birkhäuser.
- Canfield, L.M., Guillado, A.R., Neilson, E.M., Yap, H.H., Graver, F.J., Cui, H.A., Blashill, B.M. 1997. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 52-61.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola A. 2014. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13: 155-171.
- Cardinault, N., Tyssandier, V., Grolier, P., Winklhofer-Roob, B.M., Ribalta, J., Bouteloup-Demange, C., Rock, E., Borel, P. 2003. *European Journal of Nutrition* 42: 315-23.
- Carrillo-López, A., Yahia, E.M. y Ramírez-Padilla, G.K. 2010. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, 215-221.

## REFERENCIAS

- Castenmiller, J.J. y West, C.E. 1997. *Pure and Applied Chemistry* 69: 2145-50.
- Castenmiller, J.J.M. y West, C.E. 1998. *Annual Review of Nutrition* 18: 19-38.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.M., Linssen, J.P.H., Van Het Hof, K.H. Voragen, A.G.J. 1999. *The Journal of Nutrition* 129: 349-355.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E.M., Ornelas-Paz, J.J., Gardea-Béjar, A.A., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J.D. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10822-10833.
- Chandrika, U.G., Fernando, K. y Ranaweera, K. 2009. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60: 558-566.
- Chandrika, U.G., Svenberg, U. y Jansz, E.R. 2006. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 86: 54-61.
- Chitchumroonchokchai, C., Schwartz, S.J. y Failla, M.L. 2004. *Journal of Nutrition* 134: 2280-2286.
- Chitchumroonchokchai, C. y Failla, M. 2006. *Journal of Nutrition* 136: 588-594.
- Chung, H.Y., Rasmussen, H.M. y Johnson, E.J. 2004. *Journal of Nutrition* 134:1887-1893.
- Clarke, C.A., Purdie, D.M. y Glaser, S.L. 2006. *BMC Cancer* 6: 170.
- Clinton, S.K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore, B.J., Erdman Jr., J.W. 1996. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 5: 823-833.
- CNNP. 2010. Sample Meal Patterns for the USDA Food Pattern at the 2000 Calorie Level. United States Department of Agriculture. Disponible en: <http://www.cnpp.usda.gov/Publications/USDAFoodPatterns/SampleMealPatterns.pdf>
- Colle, I., Van Buggenhout, S., Lemmens, L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. 2012. *Food Research International* 45: 250-255.
- Colle, I., Lemmens L., Van Buggenhout, S., Met, K., Van Loey A.M., Hendrickx, M.E. 2013. *Food Research International* 51: 32-38.
- Compassi, S., Werder, M., Weber, F.E., Boffelli, D., Hauser, H., y Schulthess, G. 1997. *Biochemistry* 36: 6643-6652.
- Cooper, D.A., Webb, D.R. y Peters, J.C. 1997. *The Journal of Nutrition* 127: 1699S-1709S.
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J.P., Avallone, S. 2013. *Food Chemistry* 136: 871-877.
- Covington, C., Mitchell-Gielegem, A., Lawson, D., Eto, I., Grubbs, C. 2001. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 501:143-152.
- Craft, N.E, Haitema, T.B., Garnett, K.M., Fitch, K.A., Dorey, C.K. 2004. *The Journal of Nutrition Health and Aging* 8: 156-62.

## REFERENCIAS

- De Paz, E., Martín, A., Bartolomé, A., Largo, M., Cocero, M.J. 2014. *Food Hydrocolloids* 37: 14-24.
- De Pee, S. y West, C.E. 1996. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: S38-S53.
- De Pee, S., West, C.E., Permaesih, D., Martuti, S., Muhilal., Hautvast, J. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1058-1067.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2005. *Food Research International* 38, 989-994.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5062-5072.
- De Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. 2009. En T. Bechtold y R. Mussak (eds.). *Handbook of Natural Colorants*. Pp. 53-64. Nueva York: John Wiley and Sons.
- Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C., Oliveira, L. 2008. *Food Chemistry* 109: 815-824.
- Dias, M.G., Camões, M.F.G.F.C. y Oliveira, L. 2009. *Food Chemistry* 113: 808-815.
- Dubois, C., Armand, M., Mekki, N., Portugal, H., Pauli, A.M., Bernard, P.M., Lafont, H., Lairon, D. 1994. *Journal of Lipid Research* 35: 1993-2007.
- During, A., Dawson, H.D. y Harrison, E.H. 2005. *The Journal of Nutrition* 135: 2305-2312.
- During, A., Doraiswamy, S. y Harrison, E.H. 2008. *Journal of Lipid Research* 49: 1715-1724.
- Ekesa, B., Poulaert, M., Davey, M. W., Kimiywe, J., Van den Bergh, I., Blomme, G., Dhuique-Mayer, C. 2012. *Food Chemistry* 133: 1471-1477.
- El-Gorab, M.I., Underwood, B.A. y Loerch, J.D. 1975. *Biochimica et Biophysica Acta* 401: 265-277.
- Evans, M., Beck, M., Elliott, J., Etheve, S., Roberts, R., Schalch, W. 2013. *European Journal of Nutrition* 52: 1381-1391.
- Failla, M.L., Thakkar, S.K. y Kim, J.Y. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10922-10927.
- Faulks, R.M, Hart, D.J., Wilson, P., Scott, K.J., Southon, S. 1997. *Clinical Science* 93: 585-591.
- Faulks, R.M. y Southon, S. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 95-100.
- Ferruzzi, M.G., Failla, M.L. y Schwartz, S.J. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2082-2089.
- Fleshman, M.K., Lester, G.E., Riedl, K.M., Kopec, R.E., Narayanasamy, S., Curley, R.W., Schwartz, S.J., Harrison, E.H. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 4448-4454.
- Forman, M.R, Beecher, G.R., Muesing, R., Lanza, E., Olson, B., Campbell, W.S., McAdam, P., Raymond, E., Schulman, J.D., Graubard, B.I. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 64: 559-565.

## REFERENCIAS

- Forman, M.R., Johnson, E.J., Lanza, E., Graubard, B.I., Beecher, G.R., Muesing, R. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67: 81-87.
- Fotouhi, N., Meydani, M., Santos, M.S., Meydani, S.N., Hennekens, C.H., Gaziano, J.M. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 553-558.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Furr, H.C. y Clark, R.M. 1997. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8: 364-377.
- Furusho, T., Kataoka, E., Yasuhara, T., Wada, M., Masushige, S. 2000. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 70, 43-47.
- Gallo, L.L., Newbill, T., Hyun, J., Vahouny, G.V., Treadwell, C.R. 1977. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 156: 277-281.
- Garrett, D.A., Failla, M.L. y Sarama, R.J. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4301-4309.
- Gartner, C., Stahl, W. y Sies, H. 1996. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 66: 119-125.
- Gartner, C., Stahl, W. y Sies, H. 1997. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 116-122.
- Gaziano, J.M., Johnson, E.J., Russell, R.M., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Ridker, P.M., Frei, B., Hennekens, C.H., Krinsky, N.I. 1995. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61: 1248-1252.
- Gibson, R.S., Perlas, L. y Hotz, C.. 2007. *Proceedings of the Nutrition Society* 65: 160-168.
- Godoy, H.T. y Rodríguez-Amaya, D.B. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3081-3086.
- Goltz, S.R., Sapper, T.N., Failla, M.L., Campbell W.W., Ferruzzi, M.G. 2013. *Nutrition Research* 33: 358-366.
- Gomes, S., Torres, A.G., Godoy, R., Pacheco, S., Carvahlo, J., Nutti, M. 2013. *Food & Nutrition Bulletin* 34: 65-74.
- Goñi, I., Serrano, J. y Saura-Calixto, F. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5382-5387.
- Goodman, D.S., Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H.S., Shiratori, T. 1966. *The Journal of Clinical Investigation* 45: 1615-1623.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Roja-Hidalgo, E. 1992. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2135-2140.
- Granado, F., Olmedilla, B., GilMartínez, E., Blanco, I. 1998. *British Journal of Nutrition* 80: 445-449.
- Granado, F., Olmedilla, B. y Blanco, I. 2004. *Annals of Nutrition and Metabolism* 48: 251-258.
- Granado, F., Olmedilla, B., Herrero, C., Pérez-Sacristán,

## REFERENCIAS

- B., Blanco, I., Blázquez, S. 2006. *Experimental Biology and Medicine* 231: 1733-8.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I., y Blázquez-García, S. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6387-6394.
  - Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., y Blázquez-García, S. 2007a. *Food Chemistry* 102: 641-648.
  - Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., Olmedilla-Alonso, B. 2009. *British Journal of Nutrition*, 101: 576-582.
  - Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Olmedilla-Alonso, B., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B. 2010. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 133-139.
  - Granado-Lorencio, F., Donoso-Navarro, E., Sánchez-Siles, L.M., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 11819-11824.
  - Gupta, N.P. y Kumar, R.. 2002. *International Urology and Nephrology* 34: 369-372.
  - Gupta, R., Kopec, R.E., Schwartz, S.J., Balasubramaniam, V. M. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 7808-17.
  - Hadley, C.W., Miller, E.C., Schwartz, S.J., Clinton, S.K. 2002. *Experimental Biology and Medicine* 227: 869-880.
  - Hamano, P.S. y Mercadante, A.Z. 2001. *Journal of Food and Composition Analysis* 14: 335-343.
  - Handelman, G.K., Snodderly, D.M., Adler, A.J., Russett, M.D., Oratz, E.A. 1992. En L. Packer (ed.). *Methods in epidemiology*, pp. 220-230. San Diego: Academic Press.
  - Harrison, E.H. 1998. *Annual Review of Nutrition* 18: 259-276.
  - Hauser, H., Howell, K., Dawson, R.M.C., y Bowyer, D.E. 1980. *Biochimica et Biophysica Acta* 602: 567-577.
  - Health Canada. 1997. Canada's Food Guide to Healthy Eating. Minister of Public Works and Government Services Canada.
  - Hedrén, E., Díaz, V. y Svanberg, U. 2002. *European Journal of Clinical Nutrition* 56: 425-430.
  - Hempel, J., Amrehn, E., Quesada, S., Esquivel, P., Jiménez, V.M., Heller, A., Carle, R., Schweiggert, R.M. 2014. *Planta* 240: 1037-1050.
  - Henderson, C.T., Mobarhan, S., Bowen, P., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Langenberg, P., Kiani, R., Lucchesi, D., Sugerman, S. 1989. *Journal of the American College of Nutrition* 8: 625-635.

## REFERENCIAS

- Hollander, D. y Ruble, P.E. 1978. *The American Journal of Physiology* 235: E686-E691.
- Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2007. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 407-412.
- Hu, X., Jandacek, R.J., y White, W.S. 2000. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1170-1180.
- Hui, D.Y. y Howles, P.N. 2002. *Journal of Lipid Research* 43: 2017-2030
- Huo, T., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J. y Failla, M.L. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8950-8957.
- Jalal, F., Nesheim, M.C., Agus, Z., Sanjur, D., Habicht, J.P. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 623-629.
- Jatunov, S., Quesada, S., Díaz, C., y Murillo, E. 2010. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60: 99-104.
- Jeffery, J.L., Turner, N.D. y King S.R. 2012. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 92: 2603-2610.
- Johnson, E.J., Krinsky, N.I. y Russell, R.M. 1996. *Journal of the American College of Nutrition* 15: 620-624.
- Johnson, E.J., Hammond, B.R., Yeum, K.J., Qin, J., Wang, X.D., Castaneda, C., Snodderly, M., Russell, R.M. 2000. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1555-1562.
- Kabagambe, E.K., Furtado, J., Baylin, A. y Campos, H. 2005. *Journal of Nutrition* 135: 1763-1769.
- Kean, E.G., Bordenave, N., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 450-459.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., Lusby, W.R., Smith, J.C. 1992. *Analytical Chemistry* 64: 2111-2122.
- Khachik, F., Bernstein, P.S. y Garland, D.L. 1997. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 38: 1802-1811.
- Khachik, F., Spangler, C.J., Smith Jr., J.C., Canfield, L.M., Steck, A. y Pfander, H. 1997a. *Analytical Chemistry* 69: 1873-81.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B. 2002. *Experimental Biology and Medicine* 227: 845-851.
- Knockaert, G., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., Van Loey, A. 2012. *Food Chemistry* 133: 60-67.
- Kopec, R.E., Riedl, K.M., Harrison, E.H., Curley, R.W., Hruszkewycz, D.P., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3290-3296.

## REFERENCIAS

- La Frano, M.R., De Moura, F.F., Boy, E., Lönnerdal, B., Burri, B.J. 2014. *Nutrition Reviews* 72: 289-307
- Lachance, P.A. 1997. En A. Bendich, R.J. Deckelbaum (eds.). *Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals*, pp. 441-454. Totowa: Humana Press.
- Lechêne de la Porte, P., Aboukail, N., Lafont, H., Lombardo, D. 1987. *Biochimica et Biophysica Acta* 920: 237-246.
- Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W.M., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman, J.W. 1999. *The Journal of Nutrition* 129: 2271-2277.
- Li, B., Vachali, P., Frederick, J.M., Bernstein, P.S. 2011. *Biochemistry* 50: 2541-2549.
- Lietz, G., Oxley, A., Boesch-Saadatmandi, C., Kobayashi, D. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 241-250.
- Livny, O., Reifen, R., Levy, I., Madar, Z., Faulks, R., Southon, S., Schwartz, S.J. 2003. *European Journal of Nutrition* 42: 338-345.
- Lobo, M.V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., De la Cueva, P., Celdran, A., Martín-Hidalgo, A., Vega, M.A., Bragado, R. 2001. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49: 1253-1260.
- Lobo, G.P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., Von Lintig, J. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821:78-87
- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. 2009. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: S194-S218.
- Mein, J.R., Dolnikowski, G., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X.D. 2011. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 506:109-121.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Food Chemistry* 101, 177-184.
- Meléndez-Martínez, A.J., Stinco, C.M., Liu, C., Wang, X.D. 2013. *Food Chemistry* 138: 1341-1350.
- Meléndez-Martínez, A.J., Paulino, M., Stinco, C.M., Mapelli-Brahm, P., Wang, X.D. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 12399-12406.
- Meléndez-Martínez, A.J., Mapelli-Brahm, P., Benítez-González, A., y Stinco, C.M. 2014a. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572: 188-200.
- Meléndez-Martínez, A.J., Stinco, C.M., Hernanz, D., Murillo, E., Benítez-González, A. 2014b. *Carotenoid Science*, 18: 131.

## REFERENCIAS

- Metzler, C.M. y Huang, D.C. 1983. *Clinical Research Practices and Drug Regulatory Affairs* 1: 109-132.
- Mezadri, T., Pérez-Gálvez, A. y Hornero-Méndez, D. 2005. *European Food Research and Technology* 220: 63-69.
- Micozzi, M.S., Brown, E.D., Edwards, B.K., Bieri, J.G., Taylor, P.R., Khachik, F., Beecher, G.R., Smith, J.C. 1992. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55: 1120-1125.
- Mills, J.P., Tumuhimbise, G.A., Jamil, K.M., Thakkar, S.K., Failla, M.L., Tanumihardjo, S.A. 2009. *The Journal of Nutrition* 139: 44-50.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W., Brodkorb, A. 2014. *Food & Function* 5: 1113-1124.
- Moussa, M., Landrier, J.F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Comera, C., Collet, X., Frohlich, K., Bohm, V., Borel, P. 2008. *The Journal of Nutrition* 138: 1432-1436.
- Moussa, M., Gouranton, E., Gleize, B., Yazidi, C.E., Niot, I., Besnard, P., Borel, P., Landrier, J.F. 2011. *Molecular Nutrition & Food Research* 55: 578-584.
- Mulokozi, G., Hedrén, E. y Svanberg, U. 2004. *Plant Foods for Human Nutrition* 59: 1-9.
- Nantais-Smith, L.M., Covington, C.Y., Nordstrom-Klee, B.A., Grubbs, C.J., Eto, I., Lawson, D.M., Pieper, B.A., Northouse, L.L. 2001. *Nursing Research* 50: 172-177.
- Nierenberg, D.W., Stukel, T.A., Baron, J.A., Dain, B.J., Greenberg, E.R. 1991. *The American Journal of Clinical Nutrition* 53, 1443-1449.
- Niizu, P.Y. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2005. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 62: 195-199.
- Niizu, P.Y. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2003. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 739-749.
- O'Neill, M.E. y Thurnham, D.L. 1998. *The British Journal of Nutrition* 79: 149-159.
- O'Connell, O.F., Ryan, L., O'Brien, N.M. 2007. *Nutrition Research* 27: 258-264.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., y RojasHidalgo E. 1993. En Waldrom, K., Johnson, IT., Fenwick, GK. (eds). *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*, pp. 141-145. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Gil-Martínez, E. 1998. En Pandalai. S.G. (ed). *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry*, Vol. 2, pp. 57-70. Kerala: Research Signpost.

## REFERENCIAS

- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A., Blanco, I., Gil-Martínez, E., Van den Berg, H., 2001. *British Journal of Nutrition* 85: 227-38.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A.J.A., Blanco, I., Gil-Martínez, E., Van den Berg, H., Corridan, B., Hininger, I., Thurnham, D.I., Chopra M. 2002. *Clinical Science* 102: 447-456.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M. 2003. *Nutrition* 19: 21-24.
- Olmedilla-Alonso, B., Beltrán-de-Miguel, B., Estévez-Santiago, R., Cuadrado-Vives, C. 2014. *Nutrition Journal* 13:52.
- Olson, J.A. 1984. En Machlin, L.J. (ed.). *Handbook of Vitamins Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects*, pp. 1-43. Nueva York: Marcel Dekker.
- Ornelas-Paz, J.deJ., Yahia, E.M., Gardea-Bejar, A. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6628-6635.
- Ornelas-Paz, J.deJ., Failla, M.L., Yahia, E.M., Gardea, A. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1511-1516.
- Ornelas-Paz, J.deJ., Yahia, E. M. y Gardea, A. 2010. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5: 301-308.
- Paetau, I., Chen, H., Goh, N. M.Y., White, W.S. 1997. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 1133-1143.
- Paetau, I., Khachik, F., Brown, E.D., Beecher, G.R., Kramer, T.R., Chittams, J., Clevidence, B.A. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1187-1195.
- Parker, R.S. 1996. *The FASEB Journal* 10: 542-551.
- Pasquier, B., Armand, M., Guillon, F., Castelain, C., Borel, P., Barry, J.L., Pieroni, G., Lairon, D. 1996. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7: 293-302.
- Pérez-Gálvez, A., Martin, H.D., Sies, H., Stahl, W. 2003. *The British Journal of Nutrition* 89, 787-793.
- Pérez-Gálvez, A., Pacheco, Y.M., Bermúdez, B., López, S., Abia, R., Muriana, F.J.G., Villar, J., Garrido-Fernández, J. 2005. *Food Research International* 38: 1097-1102.
- Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2005. *Nutrition Research* 25: 631-640.
- Prince, M.R., y Frisoli, J.K. 1993. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57: 175-181.
- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H., McClements, D.J. 2012. *Food Chemistry* 135: 1440-1447.
- Ranga Rao, A., Baskaran, V., Sarada, R., Ravishankar, G.A. 2013. *Food Research International* 54: 711-717.
- Rao, A.V. y Shen, H. 2002. *Nutrition Research* 22: 1125-1131.

## REFERENCIAS

- Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., Andre, M., Portugal, H., Jourdheuil-Rahmani, D., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P. 2005. *Biochemical Journal* 387: 455-461.
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., Borel, P. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8749-8755.
- Reboul, E. y Borel, P. 2011. *Progress in Lipid Research* 50: 388-402.
- Ribaya-Mercado, J.D., Solon, F.S., Solon, M.A., Cabal-Barza, M.A., Perfecto, C.S., Tang, G., Solon, J.A., Fjeld, C.R., Rusell, R.M. 2000. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72: 455-465
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J.P., Berger, A., Métairon, S., Quaile, S., Piguet-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H., Fay, L.B. 2004. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 171-177.
- Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., Wolfram, G. 1999. *The Journal of Nutrition*, 129: 2170-2176.
- Rigtrup, K.M., McEwen, L.R., Said, H.M., Ong, D.E. 1994. *The American Journal of Clinical Nutrition* 60: 111-116.
- Riso, P., Visioli, F., Gardana, C., Grande, S., Brusamolino, A., Galvano, F., Galvano, G., Porrini, M. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 941-947.
- Riso, P., Brusamolino, A., Contino, D., Martini, D., Vendrame, S., Del Bo, C., Porrini, M. 2010. *Pharmacology Research* 62: 318-21.
- Rock, C.L., Demitrack, M.A., Rosenwald, E.N., Brown, M.B. 1995. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 4: 283-88
- Rock, C.L. y Swendseid, M.E. 1992. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55: 96-99.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1997. *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods*. Washington, D.C.: OMNI/USAID.
- Rodríguez-Roque, M.J, Rojas-Grau, M.A., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 1859-1867.
- Roodenburg, A.J., Leenan, R., Van Het Hof, K.H., Westrate, J.A., Tijburg, L.B.M. 2000. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1187-1193.
- Ross, M.A., Crosley, L.K., Brown, K.M., Duthie, S.J., Collins, A.C., Arthur, J.R., Duthie, G.G. 1995. *European Journal of Clinical Nutrition* 49: 861-65.
- Ross, A.B., Vuong, L.T., Ruckle, J., Synal, H.A., Schulze-König, T., Wertz, K., Rumbeli, R., Liberman, R.G., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R., Bourgeois, A., Guy, P.A., Enslin, M., Nielsen, I.L.F., Kochhar, S., Richelle, M., Fay, L.B., Williamson, G. 2011. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93: 1263-1273.

## REFERENCIAS

- Rudd, E.A. y Brockman, H.L. 1984. En Borgstrom, B. y Brockman H.L. (eds.). *Lipases* pp. 185-204. Ámsterdam: Elsevier Science.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., McClements, D.J. 2013. *Food Chemistry* 139: 878-884.
- Schierle, J., Bretzel, W., Bhler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., Schoep, W. 1997. *Food Chemistry* 59: 459-465.
- Schmitz, H.H., Poor, C.L., Wellman, R.B., Erdman, J.W. Jr. 1991. *The Journal of Nutrition* 121: 1613-1621.
- Schweiggert, R.M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C.B., Carle, R. 2012. *Food Chemistry* 135: 2736-2742.
- Shiau, A., Mobarhan, S., Stacewicz-Sapontzakis, M., Benya, R., Liao, Y., Ford, C., Bowen, P., Friedman, H., y Frommel, T.O. 1994. *Journal of the American College of Nutrition* 13: 369-375.
- Silva, N.A., Rodrigues, E., Mercadante, A.Z., de Rosso, V.V. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5072-5084.
- Sommerburg, O., Meissner, K., Nelle, M., Lenhartz, H., y Leichsenring, M. 2000. *European Journal of Pediatrics* 159: 86-90.
- Stahl, W. y Sies, H. 1992. *The Journal of Nutrition* 122: 2161-2166.
- Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A.R., Sies, H. 1992. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294: 173-77.
- Stahl, W. y Sies, H. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 287-295.
- Stinco, C.M., Rodríguez-Pulido, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Gordillo, B., Vicario, I.M., Meléndez-Martínez, A.J. 2013. *Food Research International* 50: 111-20.
- Sugarman, S.B., Mobarhan, S., Bowen, P.E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Langenberg, P. 1991. *Journal of the American College of Nutrition* 10: 297-307.
- Sy, C, Gleize, B., Dangles, O., Landrier, J.F., Veyrat, C.C., Borel, P. 2012. *Molecular Nutrition & Food Research* 56:1385-1397.
- Takkar, S.K., Maziya-Dixon, B., Dixon, A.G.O., Failla, M.L., 2007. *The Journal of Nutrition* 137: 2229-2233.
- Terpstra, V., Van Amersfoort, E. S., Van Velzen, A.G., Kuiper, J., Van Berkel, T.J. 2000. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20:1860-1872.
- Thakkar, S.K., Maziya-Dixon, B., Dixon, A.G., y Failla, M.L. 2007. *The Journal of Nutrition* 137: 2229-2233.
- Thakkar, S.K. y Failla, M.L. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11441-11446.
- Thakkar, S.K., Huo, T., Maziya-Dixon, B., Failla, M.L. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1344-1348.

## REFERENCIAS

- Thürmann, P.A., Stefrfen, J., Zwernemann, C., Aebischer, C.P., Cohn, W., Wendt, G., Schalch, W. 2002. *European Journal of Nutrition* 41: 228-235.
- Thurnhofer, H. y Hauser, H. 1990. *Biochemistry* 29: 2142-2148.
- Tyssandier, V., Cardinault, N., Caris-Veyrat, C., Amiot, M.J., Grolier, P., Bouteloup, C., Azais-Braesco, V., Borel, P. 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75: 526-534.
- Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, .F., Bougteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., Sallas, M., Borel, P. 2003. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 284: 913-923.
- Unlu, N.Z., Bohn, T., Clinton, S.K., Schwartz S. J. 2005. *Journal of Nutrition* 135: 431-436.
- Unlu, N.Z, Bohn, T., Francis, D.M., Nagaraja, H.N., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2007. *British Journal of Nutrition* 98: 140-146.
- Vachali, P., Li, B., Nelson, K., Bernstein, P.S. 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 519: 32-37.
- Vachali, P.P., Besch, B.M., González-Fernández, F., Bernstein, P.S. 2013. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539: 181-86.
- Van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S.T., Han, C.H., Duong, P., Williams, D.L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M.C., Hauser, H. 2005. *Biochemistry* 44: 4517-4525.
- Van den Berg, H. 1999. *Nutrition Reviews* 57: 1-10.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, W. 2000. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 880-912.
- Van Het Hof, K.H., Gärtner, C., West, C.E., Tijburg, L. 1998. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 68:366-370.
- Van Het Hof, K.H., Browuwer, I.A., West, C.E., Haddeman, E., Steegers-Theunissen, R.P. M., Van Dusseldorp, L., Weststrate, J.A., Eskes, T.K.A.B., Hautvast, G.A.J. 1999. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70: 261-268.
- Van Het Hof, K.H., De Boer, B.C.J., Tijburg, L.B.M., Lucius, B.R.H.M., Zijp, I., West, C.E., Hautvast, J.G.A.J., Weststrate. J.A. 2000. *Journal of Nutrition*, 130: 1189-1196.
- Van Jaarsveld, P.J., De Wet, M., Harmse, E., Nestel, P., Rodríguez-Amaya, D.B. 2006. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 321-29.
- Van Lieshout, M., West, C.E., Permaesih, D., Wang, Y., Xu, X., Van Breeman, R.B., Creemers, A.F., Verhoeven, M.A., Lugtenburg, J. 2001. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 949-958.

## REFERENCIAS

- Van Vliet, T., Schreurs, W.H.P. y Van den Berg, H. 1995. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62: 110-116.
- Victoria-Campos, C.I., Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Jiménez-Castro, J.A., Cervantes-Paz, B., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J.D., Zamudio-Flores, P.B., Escalante-Minakata, P. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:9938-9949.
- Victoria-Campos, C.I., Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Failla, M.L. 2013a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 3642-3653.
- Wang, D.Q.H., Paigen, B., y Carey, M.C. 2001. *Journal of Lipid Research* 42: 1820-1830.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, Z., Li, L., Qin, J., Lai, W., Fu, Y., Suter, P.M., Russell, R.M., Grusak, M.A., Tang, G., Yin, S. 2008. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87: 1730-1737.
- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research). 1997. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Menasha: Banta Book Group.
- Werner, S. y Böhm, V. 2011 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1163-1170.
- West, C.E. y Castenmiller, J.J.M. 1998. *International Journal for Vitamin and Nutrition* 68: 371-377.
- Wilson, G. 1990. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 15: 159-163.
- Wingerath, T., Stahl, W. y Sies, H. 1995. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324: 385-390.
- Wingerath, T., Sies, H. y Stahl, W. 1998. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 355: 271-274.
- Xavier, A.A.O., Mercadante, A.Z., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A. 2014. *Food Research International* 65: 171-176.
- Yahia, E. M., y Ornelas-Paz, J. de J. En *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, ed. L. A. De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, G. A. Gonzalez-Aguilar. 177-222. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing. 2010
- Yeum, K. J., y Russell, R. M. 2002. *Annual Review of Nutrition* 22: 483-4504.
- Yong, L. C., Forman, M. R., Beecher, G. R, Graubard, B. I, Campbell, W. S, Reichman, M. E, Taylor, P. R., Lanza, E., Holden, J. M., y Judd, J. T. 1994. *The American Journal of Clinical Nutrition* 60: 223-230.
- You, C. S., Parker, R. S., Goodman, K. J., Swanson, J. E., y Corso, T. N. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 64: 177-183.
- Yu, B., Wang, J., Suter, P. M., Russell, R. M., Grusak, M. A., Wang, Y., Wang, Z., Yin S., y Tang, G. 2012. *British Journal of Nutrition* 108: 611-619

## REFERENCIAS

- Zino, S., Skeaff, M., Williams, S., y Mann, J. 1997. *British Medical Journal* 314: 1787-1791.
- Zuniga, K.E. y Erdman, J.W. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5335-5341.

## CAPÍTULO 27

# EL MODELO DE ASIMILACIÓN POR DIFUSIÓN FACILITADA DE CAROTENOIDES. TRANSPORTADORES Y METABOLISMO

Antonio Pérez-Gálvez y María Roca



### INTRODUCCIÓN

El consumo de lípidos en la dieta occidental supone entre 35-40% del aporte calórico total, sobre todo en forma de triacilglicéridos estructurados, hasta 95%, por ácidos grasos de cadena larga. Debido a su función energética y otras acciones de vital importancia en el metabolismo y eficacia celular sería esperable que la absorción intestinal de los lípidos fuera significativamente eficiente. Sin embargo los enterocitos están sujetos diariamente a importantes modificaciones en el suministro cualitativo y cuantitativo de macro y micronutrientes, y solamente mediante el mantenimiento de unas condiciones ambientales en el lumen y de la adaptación morfológica de estas células especializadas es posible explicar que se consiga una aceptable eficiencia de la asimilación de lípidos a través de la membrana intestinal, considerando que sus propiedades fisicoquímicas no favorecen ni facilitan su transporte ni asimilación celular. De hecho, aunque el conocimiento de los eventos asociados a la digestión y

movilización de lípidos en el tracto gastrointestinal no se ha modificado, el concepto de difusión pasiva de lípidos como mecanismo de asimilación ha experimentado en las últimas dos décadas una importante revisión al ponerse en evidencia la existencia de proteínas asociadas a la membrana de los enterocitos implicadas en facilitar la asimilación de lípidos. Además, la investigación ha avanzado hacia el estudio del metabolismo y transporte intracelular de estos lípidos, así como de los mecanismos responsables del eflujo y de la secreción celular.

### El modelo de difusión pasiva de lípidos

La diversa configuración estructural de los lípidos implica un amplio rango de interacción con agua, desde los que son totalmente insolubles a los que se pueden dispersar más fácilmente en solución acuosa, y que no puedan atravesar las membranas celulares directamente. Por eso, el proceso digestivo se centra en emulsionar, hidrolizar y dispersar la fracción lipídica de la ingesta para conseguir la asimilación de estos componentes. Estos eventos se consiguen mediante la participación de diversas secreciones digestivas que contienen enzimas, como la lipasa lingual y gástrica (Hamosh, 1990), la lipasa y la co-lipasa pancreáticas, la fosfolipasa, la colesterol esterasa y las sales biliares. Las diversas actividades enzimáticas, la participación de las sales biliares, los movimientos del lumen y la modificación de su composición provocan la aparición de agregados celulares denominados micelas mixtas, que albergan el material lipídico digerido. Los estudios de Hofmann y Borgstrom, descubridores de la formación y asimilación de micelas mixtas, fueron los referentes para proponer el modelo de difusión pasiva como mecanismo de asimilación de lípidos por los enterocitos. La importancia de la micelarización estriba en la presencia de una capa

acuosa que tapiza la pared intestinal, separando la fase fluida que conforma el lumen de los enterocitos, y a través de la cual sólo se difunde el material hidrosoluble y ciertos lípidos como los ácidos grasos de cadena corta y media (<16 átomos de carbono). Esta capa acuosa obliga a que el resto del material lipídico digerido se difunda por ella en el interior de las micelas mixtas que alcanzan un tamaño de entre 30 y 100 Å de diámetro. Aunque su difusión es lenta, la concentración del material lipídico digerido y transportado en las micelas mixtas es tal (entre cien y mil veces superior que en el pared intestinal), que gracias a este proceso de micelarización se logra una elevada eficacia en el transporte y asimilación de los lípidos. Al atravesar la capa acuosa las micelas se acumulan, chocan, rompen y liberan su contenido en la proximidad de la membrana celular del enterocito, comenzando el proceso de asimilación celular. Este proceso se sustentaba exclusivamente en el mecanismo de difusión pasiva (Thomson *et al.*, 1989). El gradiente de concentración que se establece entre el exterior y el interior de los enterocitos, fuerza a que los lípidos se difundan pasivamente (sin costo energético y sin la implicación de transportadores) desde la membrana celular al citoplasma, donde comienzan otros procesos que permitirán su tráfico en el interior de la célula y hacia el sistema linfático. Sin embargo se descubrió que asociado a este modelo de difusión pasiva, coexiste otro mecanismo de absorción que implica transportadores específicos de membrana, encargados de interiorizar los lípidos que se aproximan a los enterocitos. Para los ácidos grasos, los trabajos pioneros de Stremmel (1988) y Chow y Hollander (1978) fueron los que propusieron este modelo de difusión facilitada. Los dos modelos están habilitados para la asimilación de lípidos y su funcionamiento depende de la concentración del sustrato a asimilar. A bajas concentraciones el proceso que predomina es el de difusión facilitada, mientras que a altas concentraciones prevalece

la difusión pasiva. La caracterización de los transportadores de membrana implicados en la difusión facilitada ha puesto de manifiesto que pueden reconocer un amplio abanico de sustratos de muy diferentes particularidades estructurales, una característica ya mencionada de los lípidos. Así Stremmel *et al.* (1985) demuestran que la misma proteína implicada en el transporte de ácidos grasos funciona con colesterol. Trabajos posteriores van a demostrar que éstos y otros transportadores de membrana se encargan de la difusión facilitada no sólo de los ácidos grasos sino también de lípidos muy diversos estructuralmente, incluyendo los carotenoides.

### Descubrimiento de los receptores asociados a membrana. Transporte de colesterol

Al comparar los estudios referentes a la asimilación de colesterol con los que se centran en la asimilación de carotenoides se observa una serie de similitudes que apuntan a que ambos tipos de compuestos comparten ruta y mecanismos de absorción. Resulta por tanto oportuno exponer los trabajos que condujeron a descubrir los procesos implicados en la asimilación en el epitelio intestinal del colesterol. Thurnhofer y Hauser (1990) fueron los primeros en observar la presencia, en el epitelio intestinal, de una proteína de membrana que facilita la asimilación de colesterol, localizada sobre todo en el duodeno y el yeyuno, en un proceso que ocurre a gran celeridad (Igel *et al.*, 2003). Se conocían más aspectos de este proceso, como el hecho de que sigue un modelo cinético de segundo orden (Schulthess *et al.*, 1996), su especificidad por los esteroides (Glover y Morton, 1958) y su inhibición por fármacos como la ezetimiba (Rosenblum *et al.*, 1998). Las proteínas que se postularon como facilitadoras de la absorción de colesterol fueron las

ATPasas del tipo ABC y los receptores residuales del tipo B1 (McNeish *et al.*, 2000; Lindenthal *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 1998). Estudios posteriores demuestran que la inactivación de los genes que codifican estas proteínas no tuvieron efecto en la asimilación de colesterol en ratones (Repa *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2002), por lo que la identificación de la proteína implicada en el transporte de colesterol quedó en suspenso hasta que Altmann *et al.* (2004) con herramientas combinatorias de genómica y bioinformática, y considerando las características que debía reunir esta proteína (presencia de un dominio transmembrana, interacción con esteroides, péptidos de señalización extracelular, N-glicosilación) postularon a *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) como la proteína encargada del transporte de colesterol. Sus ensayos con ratones mutantes en los que se inhibió el gen que codifica NPC1L1 demostraron que en esos ratones la absorción de colesterol era residual (25-30%). La localización de esta proteína se restringe al epitelio que bordea el lumen intestinal, mayoritariamente en la franja proximal, localizándose en la zona apical de los enterocitos. Cuando los ratones mutantes en NPC1L1 fueron tratados con ezetimiba, no se produjo un descenso de los niveles de colesterol residuales que se absorben en esta cepa, niveles de absorción que fueron similares al descenso logrado con el tratamiento con ezetimiba en ratones no mutantes en NPC1L1. Este hecho demuestra que la proteína NPC1L1 juega un papel fundamental en el proceso de asimilación de colesterol, sensible al tratamiento con ezetimiba.

### Inhibidores del transporte

La identificación de estos receptores y del propio mecanismo de absorción están sustentados en el hallazgo de macromoléculas como  $\alpha$ - y  $\beta$ -péptidos o la ezetimiba que inhiben la absorción de compuestos lipídicos (Boffelli *et al.*,

1997; Altmann *et al.*, 2002). La ezetimiba es un potente y selectivo inhibidor de la absorción de colesterol (Van Heek *et al.*, 1997) que no afecta la asimilación de triglicéridos, ácidos grasos libres, ácidos biliares y vitaminas liposolubles (van Heek *et al.*, 2000). Este fármaco se modifica tras su administración mediante el metabolismo de fase II. En el epitelio intestinal se forma el derivado glucurónido que se absorbe rápidamente y se transporta hacia el hígado y posteriormente al páncreas, de donde se excreta de nuevo al intestino delgado. Esta circulación enterohepática impide cualquier actividad del fármaco en otros tejidos periféricos. El derivado glucurónido es la forma activa del fármaco y una vez en el epitelio intestinal inhibe la actividad de la NPC1L1, mediante un mecanismo que hasta el momento no se ha elucidado (Burnett *et al.*, 2002, 2002a). Este fármaco representa una estrategia para el estudio de la inhibición del transporte de otros lípidos, y particularmente se ha utilizado en el análisis de la difusión facilitada de carotenoides (During *et al.*, 2005), ya que es capaz de inhibir a algunos transportadores como SR-B1 y NPC1L1. Además de la ezetimiba, recientemente se han identificado nuevos inhibidores específicos de algunos transportadores; así, BLT1 (*blocks lipid transport 1*) es un inhibidor del transporte lipídico mediado por SR-B1 (Reboul *et al.*, 2005). La ventaja de la especificidad de este compuesto es que no interfiere con los procesos de endocitosis mediada por receptores o cualquier otra forma de tráfico intracelular (Nieland *et al.*, 2002). Para inhibir específicamente el transportador CD36, se sintetiza sulfo-N-succinimidiloleato (SSO), en un principio desarrollado para el estudio del proceso de absorción de ácidos grasos. Conforme ha avanzado la investigación, ha sido necesario utilizar nuevas herramientas, aún más sofisticadas, como el desarrollo de anticuerpos específicos frente a proteínas transportadores, habiéndose utilizado anticuerpos mono y policlonales frente

a: CD36, SR-B1 y NPC1L1 (Reboul *et al.*, 2005; Moussa *et al.* 2008). La utilización tanto de inhibidores químicos más o menos específicos, como los ensayos con anticuerpos, ha sido la herramienta esencial que ha permitido profundizar en los mecanismos de los diferentes transportadores implicados en la absorción de carotenoides.

## MODELOS PARA EL ANÁLISIS DE LA ASIMILACIÓN DE LÍPIDOS POR DIFUSIÓN FACILITADA

Sin lugar a dudas, la consecución de estos recientes logros se debe en gran medida al desarrollo de modelos de absorción *in vitro*, basados en la obtención de vesículas de membrana de borde en cepillo, o cultivos celulares, que se han utilizado como herramienta analítica para el diseño de experimentos encaminados a la determinación de la biocinética de absorción de lípidos en general y de los carotenoides en particular (Wilson, 1990). Existe un amplio abanico de modelos experimentales que permiten obtener información de la eficiencia de cada etapa del proceso digestivo y la asimilación, así como de los mecanismos implicados en cada proceso. Cada uno de estos modelos coloca el foco de observación en un aspecto concreto (eficiencia de digestibilidad o de asimilación, modificaciones estructurales debidas al proceso digestivo o al metabolismo intestinal, mecanismos implicados en la asimilación o la inhibición de la misma) lo que permite obtener información más relevante acerca del mismo. Es el investigador el que decide qué aspecto pretende conocer en detalle para después integrarlo en el conocimiento más general que se obtenga del proceso de biodisponibilidad.

## Vesículas de membrana de borde en cepillo

Las preparaciones de vesículas de membrana de borde en cepillo (VMBC) constituyen el método clásico para estudios mecanísticos del transporte de nutrientes, compuestos bioactivos o fármacos a través de la membrana celular. Las vesículas, membranas celulares en suspensión, actúan como receptoras, ya que conservan los transportadores proteicos y las enzimas de membrana con los que interaccionan con los nutrientes procedentes de la solución donante con la que se ponen en contacto. Las vesículas se obtienen aislando células de la mucosa intestinal, mediante su raspado o por vibración y someténdolas a un proceso de eliminación de los restos de tejido y de membrana basolateral. El concentrado purificado de células de la mucosa se fracciona mediante centrifugación y precipitación, en vesículas de membrana de borde en cepillo separadas de la fracción nuclear y mitocondrial. Esta técnica, descrita en 1961 por Miller y Crane experimentó ligeras modificaciones en cuanto al procedimiento experimental, que lograron incrementar la pureza, estabilidad y rendimiento de la preparación, pero a partir de entonces, la técnica ha permanecido bastante inalterada. La preparación en búfer isotónico de VMBC se incuba con la solución o suspensión donante que contiene los nutrientes objeto de estudio, y una vez finalizado el ensayo se filtra o centrifuga, para separar la fracción de VMBC de la solución búfer y donante para poder analizar el contenido en nutriente tanto en dicha fracción de VMBC como en búfer para completar el balance de materia. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en estudios mecanísticos de asimilación de nutrientes como glucosa, sales biliares, lípidos, xenobióticos, colesterol y carotenoides (Hopfer *et al.*, 1973; Kessler *et al.*, 1978; Proulx *et al.*, 1982; Burckhardt *et al.*, 1983; Ikeda *et al.*, 1988; Ling, Lee y Hollander, 1989; Alcorn *et al.*, 1991; Keelan *et al.*, 1992; Moore, Gugger y

Erdman, 1996). En esos estudios se utilizó tejido intestinal de diversas especies animales, como cerdo, conejo, gallina, rata, ratón, y también de humanos, aunque lógicamente éstos son menos frecuentes debido a la escasa disponibilidad de tejido que reúna las condiciones necesarias para los ensayos. También este modelo presenta limitaciones, fundamentalmente porque sólo es predictivo para una parte del proceso de absorción, la que ocurre hacia el interior de la membrana. Las vesículas se encuentran en suspensión, por lo que se aplican condiciones dinámicas en el ensayo, pero eso impide que se diferencie una zona basolateral, que represente el transporte a través de la membrana.

## Cultivos celulares

Los modelos basados en cultivos celulares gozan de una gran popularidad y están ampliamente implantados y aceptados por la comunidad científica como referentes válidos para estimar la asimilación de nutrientes y compuestos bioactivos. Puesto que los cultivos primarios de enterocitos procedentes de explantes de tejido epitelial no forman una monocapa epitelial, y por tanto no presentan zona apical y basolateral, es necesario recurrir a líneas celulares que en general proceden de tumores que sí conforman las características estructurales de una monocapa celular. La monocapa de células se cultiva sobre un filtro soporte y se coloca en la zona apical la solución búfer donante y bajo la zona basolateral la solución búfer receptora. Se han descrito distintas líneas celulares como la MDCK (células procedentes de riñón de perro, Madin-Darby Canine Kidney), 2/4/A1 (células intestinales procedentes de intestino de fetos de rata), LLC-PK1 (células procedentes de epitelio de riñón de cerdo) y la más conocida, Caco-2. Dicha línea celular procede de colonocitos humanos procedentes de un adenocarcinoma y, cultivados en condiciones

adecuadas, presentan las características morfológicas de los enterocitos así como una amplia mayoría de enzimas y proteínas de membrana (Jumarie y Malo, 1991). Con esta línea celular se ha caracterizado el transporte activo de glucosa, péptidos, aminoácidos, ácidos biliares, carotenoides y otros compuestos (Delie y Rubas, 1997; Garret, Failla y Sarama, 1999; Bleasby, Chauhan y Brown, 2000; Manach y Donovan, 2004). La miniaturización, el desarrollo de soluciones búfer de carácter fisiológico y la estandarización con sustancias patrón referentes para contrastar resultados interlaboratorios son las mejoras que se están introduciendo para aproximar estos modelos a situaciones *in vivo* (Ingels y Augustijns, 2003). Como los modelos basados en membranas artificiales, los modelos basados en cultivos celulares también son excesivamente estáticos, lo cual estará sujeto a sucesivas mejoras. También se trabaja en lograr que las células lleguen a expresar convenientemente la pléyade de transportadores proteicos que habitualmente se encuentran en los enterocitos del epitelio intestinal. No hay que olvidar que esta línea procede de colon, no de intestino delgado, lo que supone una ventaja en la expresión del número adecuado de transportadores (superior en intestino delgado que en colon). Para mejorar este aspecto se han desarrollado clones de la línea Caco-2, como la TC7 (Carriere *et al.*, 1994) que expresan SR-BI, NPC1L1 y ABCA1 (ATP-Binding Cassette transporter 1), pero no expresan CD36 (During, Dawson y Harrison, 2005). Para estudios específicos con el transportador CD36 se ha utilizado la línea celular COS1 (fibroblastos derivados de tejido renal de mono) y HEK (*human embryonic kidney*) transfectada con el gen correspondiente (Borel *et al.*, 2013). Esta última línea también ha sido transfectada con SR-BI, ya que los primeros trabajos de investigación con células Caco2 y siRNA no permitían una inhibición completa de este gen. Con la línea celular HEK se han conseguido resultados mucho más positivos para SR-BI.

Cuando además de analizar el transporte en los enterocitos, se pretende estudiar en transporte de carotenoides en tejidos dianas, se cultivan otras líneas celulares, como por ejemplo ARPE19, que son células epiteliales de la retina pigmentada de humanos (During, Doraiswamy y Harrison 2008), HepG2, línea celular de carcinoma de hígado humano (Lobo *et al.*, 2010), o diversas líneas procedentes de tejido adiposo humano, como 3T3-L1 (Moussa *et al.*, 2011).

Al igual que los modelos de membrana, los modelos de asimilación *in vitro* basados en cultivos celulares constituyen una técnica de barrido experimental de alta resolución (*high-throughput screening*) ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para estimar la asimilación de fármacos, siendo posible, con la instrumentación adecuada, realizar cientos de experimentos simultáneamente. Este modelo también presenta una excelente correlación con los resultados de estudios *in vivo* (Verma, Hansch y Selassie, 2007).

### Implicación de los transportadores asociados a membrana en la asimilación de carotenoides

El modelo de difusión facilitada explica la significativa variabilidad entre individuos en la eficiencia de absorción de compuestos lipídicos (Borel *et al.*, 1998; Pérez-Gálvez *et al.*, 2005) y conjuga diferentes situaciones patofisiológicas del epitelio intestinal con deficientes niveles de absorción de lípidos, situaciones que no eran totalmente compatibles con el modelo de absorción de difusión simple. La implicación de transportadores en el proceso de asimilación de lípidos se ha demostrado utilizando inhibidores competitivos como apolipoproteínas y lipoproteínas del suero, péptidos  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos y fármacos de síntesis como la ezetimiba.

Algunos de los indicios que promovieron la búsqueda del actual mecanismo de absorción para los ácidos grasos y otros compuestos lipofílicos también se intuían para los carotenoides. Esta familia de isoprenoides, cuya presencia en el organismo de los mamíferos se debe exclusivamente a la dieta, desarrolla una serie de funciones y acciones biológicas de significativo interés en la salud humana, por lo que los eventos asociados a su asimilación se estudian con atención. Los ensayos clínicos *in vivo* mostraban una gran variabilidad de la eficiencia de absorción entre individuos, por lo que apareció el concepto de “respondedores poco eficaces”, como se explica adelante (Johnson y Russell, 1992); también se demostraba la competencia por la absorción entre diferentes compuestos, la tendencia a acumular en tejidos biológicos un grupo reducido de carotenoides a pesar de que la ingesta de frutas y vegetales aporta un número más amplio, e incluso la existencia de esteroespecificidad en la absorción (Khachik *et al.*, 1991, 1992; Van den Berg, 1999; During *et al.*, 2002). Todos estos indicios hacían pensar en la posibilidad de un mecanismo de transporte de difusión facilitada, similar o incluso coincidente con el de colesterol.

### Evidencias obtenidas a partir de modelos de experimentación

El trabajo de Moore *et al.* (1996) utilizó al modelo de membrana de borde en cepillo para estudiar el proceso de asimilación de  $\beta$ -caroteno en roedores sometidos a una deficiencia nutricional en vitamina A durante ocho semanas para, una vez sacrificados, obtener del raspado intestinal las VMBC y realizar los experimentos de asimilación suministrando la misma cantidad de  $\beta$ -caroteno micelar a las preparaciones de VBMC. Cuando se comparó el nivel de asimilación de  $\beta$ -caroteno en las VMBC del grupo marginal con el grupo control se observó

que la capacidad de asimilación de  $\beta$ -caroteno en el primer grupo era sensiblemente inferior al segundo, mostrando que una situación de desajuste nutricional provoca un desajuste en la capacidad de asimilación del epitelio intestinal que no puede explicarse mediante un modelo de difusión pasiva. Un estudio posterior realizado con células Caco-2 (Garret, Failla y Sarama, 1999) puso de manifiesto la diferente capacidad de asimilación en función de las características estructurales del pigmento, así como la competencia por la asimilación cuando se provee al cultivo de una mezcla de ellos, efectos que se deben al proceso de difusión facilitada. During *et al.* (2002) proporcionan más evidencias al incluir factores que resultan ser significativos en la eficiencia de la asimilación de carotenoides, como la isomería *Z/E* y la interacción entre diferentes pigmentos.

La prueba definitiva llegó con el estudio de Kiefer *et al.* (2002) en el que se demostró que un receptor residual, denominado ninaD, es esencial para la absorción de carotenoides y que la secuencia que codifica ese receptor es significativamente homóloga al receptor residual tipo B presente en mamíferos. Posteriormente, se han publicado estudios que sustentan la anterior evidencia y la analogía con el mecanismo de absorción propuesto para colesterol y otros lípidos. En la absorción de carotenoides existe más de un transportador implicado (SR-BI, NPC1L1 y ABCA1) aunque es posible que la afinidad de cada uno de ellos por los diferentes carotenoides de la dieta no sea la misma. Esta preferencia por un transportador puede estar relacionada con el hecho de que la diferente polaridad de carotenos y xantofilas provoque su mayor afinidad por un determinado transportador. Aunque se haya demostrado que los receptores residuales ejercen su actividad sin demasiada discriminación estructural, y facilitan la asimilación de colesterol libre y esterificado, triacilglicéridos y fosfolípidos, Werder *et al.* (2001) sugieren que el receptor SR-BI facilita preferentemente

la asimilación de aquellos lípidos más hidrofóbicos. Resulta adecuado indicar que en todos los estudios de asimilación de carotenoides se denota la existencia del proceso de difusión pasiva que permite la asimilación de niveles basales de carotenoides (y compuestos lipídicos) y acoplado a él se sitúa el modelo de difusión facilitada, que puede ser más específico y selectivo en función de las características estructurales del pigmento y de las condiciones en las que se produce la asimilación. De hecho, actualmente se acepta que a altas concentraciones de carotenoides existe una difusión pasiva, pero que a las dosis que habitualmente son ingeridos los carotenoides está claramente involucrado un transporte mediado por proteínas (Reboul, 2013).

### Analogía de la asimilación de carotenoides con la asimilación de retinol

El conocimiento adquirido sobre los mecanismos de absorción de la vitamina A puede proporcionar una mejor aproximación al estudio de la asimilación y transporte de compuestos relacionados estructuralmente con ella, como los carotenoides, sin importar que muestren o no actividad de provitamina A. Precisamente, es la similitud estructural entre carotenoides y retinoides lo que provoca que los procesos de digestión, asimilación y transporte de vitamina A sigan mecanismos, sino idénticos, muy parecidos. De hecho, las estrategias experimentales utilizadas para esclarecer los procesos implicados en la absorción de retinoides se han aplicado para los carotenoides (Quick y Ong, 1990). Así, las enzimas implicadas en los procesos de hidrólisis de los ésteres de retinol (una fuente significativa de vitamina A procedente de alimentos de origen animal), la presencia de proteínas transportadoras en el epitelio intestinal y la coexistencia del

mecanismo de difusión facilitada con la difusión simple como los sistemas de absorción celular son elementos coincidentes para los dos grupos de compuestos (Harrison, 2005). Además los estudios de asimilación realizados con ésteres de retinol son un excelente punto de partida para determinar la eficiencia de la asimilación de ésteres de carotenoides, su posible posterior re-esterificación en las células del epitelio intestinal (Harrison, 2005; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2005; Sugawara *et al.*, 2009), y su posterior transporte hacia el sistema linfático. Esta cadena de eventos puede conformar un proceso autorregulado ligado al metabolismo posprandial.

### Familias de transportadores implicadas en la difusión facilitada

Como se ha comentado, las diferentes evidencias experimentales no podían ser explicadas por un simple proceso de difusión pasiva, entre ellas, la alta variabilidad inter-individuos en los procesos de absorción en estudios con humanos (Borel *et al.*, 1998; Jeanes, Hall y Lodge, 2005), la selectividad en la isomería y la competición en la absorción entre carotenoides (During *et al.*, 2002). La identificación del gen *ninaD* en *Drosophila* como transportador esencial en la distribución celular de carotenoides (Kiefer *et al.*, 2002) fue la prueba definitiva. Desde entonces, varios transportadores se han asociado al proceso de absorción de carotenoides por enterocitos, tanto transportadores de lípidos (SR-BI, CD36) como transportadores de colesterol (NPC1L1). De ellos se conocen bastantes propiedades, como se describirá a continuación, incluso para algunos, ciertas rutas de regulación. En cambio, se desconocen en gran medida los mecanismos responsables del transporte intracelular y del eflujo de carotenoides a través de la membrana de borde en cepillo (MBC). Ambos fenómenos constituyen los grandes retos del futuro.

## Scavenger receptor B

Es una glicoproteína de 80 kDa localizada en las MBC de los enterocitos, decreciendo su presencia desde el duodeno al colón (Lobo *et al.*, 2001). Como transportador, SR-BI exhibe una baja especificidad por lípidos, de hecho acepta una variada gama de sustratos, lipoproteínas, fosfolípidos, triacilgliceroles, etc., aunque probablemente su función principal sea la de transportar colesterol (Reboul y Borel, 2011). Inicialmente, se implicó a SR-BI en la absorción de luteína (Reboul *et al.*, 2005), ya que mediante la utilización de anticuerpos anti-SR-BI de humanos se consiguió inhibir hasta 32% el transporte de luteína en células Caco-2, y la incubación con BLT1 (*blocks lipid transport 1*, un inhibidor químico del transporte de lípidos por SR-BI) logró una inhibición de 57% de la absorción de luteína. El hecho de que la inhibición no fuera completa, hacía sospechar que uno o más transportadores debían estar implicados en la absorción de luteína. Más tarde se demostró la participación de SR-BI en el transporte de  $\beta$ -caroteno (During, Dawson y Harrison, 2005). El tratamiento con ezetimida (que disminuye la expresión de *SCARB*, gen que codifica para SR-BI) consiguió inhibir casi 70% del transporte, mientras que los anticuerpos anti-SR-BI inhibieron 20%. Con la misma aproximación, se ha demostrado que SR-BI es responsable de la absorción intestinal de (todo-*E*)- y (5*Z*)-licopeno (Moussa *et al.*, 2008). *In vitro*, la inhibición por BLT-1 y anticuerpos anti-SR-BI sólo fue efectiva en 50%, por lo que, como para otros carotenoides, se acepta cierto proceso pasivo o la implicación de otros transportadores para la absorción de luteína. Específicamente, para este carotenoide se ha comprobado *in vivo*, que la concentración de licopeno se incrementa unas diez veces en el plasma de ratones que sobre-expresan SR-BI en el intestino en comparación con ratones silvestres, confirmando la implicación de SR-BI en la absorción de carotenoides. No obstante, a diferencia de los

esteroles y otras moléculas que son capaces de regular su propia absorción, ya que pueden autorregular la expresión de sus propias proteínas transportadoras, el licopeno no modula la eficiencia de su propia absorción, ya que distintas concentraciones de licopeno no tienen efecto en los niveles de expresión de este transportador (Moussa *et al.*, 2008). La ausencia de una completa inhibición de este transportador en células Caco 2, ha llevado a buscar otras alternativas, como utilizar otras líneas celulares tipo HEK (*hepatic embryonic kidney*) fácilmente transformable con el ADN de *SCARB1* (Borel *et al.*, 2013). Esta nueva técnica ha permitido demostrar por primera vez la implicación de SR-BI en la absorción de  $\beta$ -caroteno, pero no en la de retinol. La aplicación de esta nueva herramienta, además de permitir sobre-expresar transportadores de forma específica, ha logrado inhibiciones casi absolutas de la absorción de los carotenoides analizados. Pero además de su presencia en el intestino, SR-BI es responsable de la absorción de carotenoides a nivel de la retina. Las xantofilas suponen tan solo 20-30% de los carotenoides totales presentes en el plasma humano, pero a nivel de la retina, las xantofilas suponen 80% mientras que la presencia de  $\beta$ -caroteno es prácticamente a nivel de trazas. Esto sugiere es que debe existir una absorción selectiva de xantofilas por parte del tejido de la retina. Para investigar este punto, el grupo de Harrison (During *et al.*, 2008), utilizando la línea celular ARPE-19, ha demostrado la absorción selectiva del epitelio pigmentario de luteína y zeaxantina frente a  $\beta$ -caroteno. La prueba definitiva se obtuvo, mediante ARN de interferencia pequeña que llegó a inhibir 90% de la expresión de SR-BI, y en igual medida la absorción de zeaxantina. En consecuencia, la absorción específica de xantofilas por parte del epitelio de la retina es totalmente dependiente del transportador SR-BI.

### Cluster determinant 36

Es una glicoproteína de 90 kDa que se expresa en los MBC de los enterocitos desde el duodeno hasta el yeyuno (Terpstra *et al.*, 2000). Demostrar su implicación en el transporte de carotenoides ha sido más complicado, porque aunque siempre se ha incluido como una posibilidad en todos los trabajos de investigación sobre absorción de carotenoides, no se expresa en células Caco-2 (Reboul *et al.*, 2005), línea celular básica en los inicios de esta investigación, por lo que los resultados siempre fueron negativos; por eso, a pesar de que su implicación en la absorción de ácidos grasos a nivel de epitelio intestinal está más que demostrada, su participación en la absorción de carotenoides a este nivel es más lábil. Sólo recientemente, Borel *et al.* (2013) y utilizando células HEK transfectadas con el gen de CD36, se ha demostrado su posible papel como proteína transportadora para  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina.

En otro tejido, como el epitelio de la retina, aunque este transportador se exprese (Ryeom *et al.*, 1996), no participa en la absorción de xantofilas o  $\beta$ -caroteno (During *et al.*, 2008), al menos de forma preliminar. Esta conclusión se debe a la distribución polarizada de receptores en el epitelio pigmentado de la retina. Así, mientras SR-BI se localiza en la zona basolateral, CD36 se sitúa en la zona apical. Esta localización puede ser la causa de que los anticuerpos anti-CD36 no hayan sido efectivos en células ARPE-19, por lo que su implicación en la absorción de carotenoides en este tejido no puede excluirse definitivamente.

Aunque el tejido adiposo se considera el principal tejido de reserva de carotenoides del organismo, hasta hace relativamente poco se desconocían los mecanismos responsables de la absorción en él. El grupo de Borel (Moussa

*et al.*, 2011) ha llegado a establecer que precisamente es CD36, de momento, el principal responsable de la absorción de licopeno y luteína (dos de los tres carotenoides mayoritarios presentes en plasma) en los adipocitos. Para ello, a partir de cultivos de tejido adiposo con inhibidores específicos para CD36 (SSO) y siRNA frente a CD36 en una línea transfectada se logró inhibir parcialmente la absorción de licopeno y luteína. La prueba concluyente se obtuvo con explantes *in vivo* de tejido adiposo de ratones CD36<sup>-/-</sup> detectándose inhibiciones de 30% en el transporte de ambos carotenoides en comparación con el genotipo silvestre. Aunque para esta proteína se ha propuesto un mecanismo tipo *micelle docking protein* para el transporte específico de ácidos grasos, de momento se desconoce el mecanismo exacto de reconocimiento para carotenoides, que puede ser una interacción directa o mediar una proteína tipo albúmina. En cualquier caso, nuevamente hay que aceptar la posibilidad de un cierto grado de difusión pasiva u otra proteína transportadora para este tejido.

### Niemann-Pick C1-Like 1

NPC1L1 es una proteína de 135 kDa responsable principalmente del transporte y absorción del colesterol y fitoesterol a nivel del intestino (Davies *et al.*, 2004) y localizada en las MBC (Davies, Levy y Ioannou, 2000). Las primeras pruebas de la implicación de NPC1L1 en el transporte de carotenoides (During, Dawson y Harrison, 2005) se realizaron con ezetimiba como inhibidor específico, con valores de aproximadamente 50% para  $\alpha$ -caroteno, alrededor de 20% para licopeno y  $\beta$ -criptoxantina y apenas 5% de inhibición para luteína y zeaxantina. No obstante, la validez de estos resultados se ha visto comprometida con ensayos más sofisticados. Específicamente para licopeno (Moussa *et al.*, 2008), se ha demostrado que NPC1L1 no está implicado en la absorción, repitiendo los ensayos con ezetimiba pero completándolos con

anticuerpos anti-NPC1L1, se obtiene siempre una respuesta negativa. During y Harrison (2007) demostraron que NPC1L1 tampoco está implicado en el transporte de carotenoides provitamina A, utilizando como estrategia ARN pequeño interferente. En ese momento, varias hipótesis pretenden explicar la falta de implicación de NPC1L1 en la absorción de carotenoides: una es el hecho de que al contener NPC1L1 un dominio específico para esteroides, este transportador es mucho más selectivo que SR-BI a la hora de la especificidad de sustrato. Una segunda explicación es la localización de NPC1L1; posiblemente esta sea una proteína de membrana intracelular responsable del transporte citosólico del colesterol (Davies y Ioannou, 2006), y dificulte su acceso a sustratos extracelulares. En la actualidad, sólo se ha confirmado la implicación de NPC1L1 en la absorción de luteína (Sato *et al.* 2012).

### Transportadores implicados en el eflujo de carotenoides de la membrana apical

En la actualidad se desconoce si alguno de los transportadores descritos antes como importadores podría estar implicado en el eflujo de carotenoides de la membrana apical. De hecho, dada la falta de trabajos con carotenoides, sólo se pueden referir ejemplos con compuestos relacionados, como colesterol, vitaminas E y D. Específicamente, el transporte reverso de colesterol es un proceso importante y necesario para eliminar el exceso de colesterol del organismo (McKay *et al.*, 2013). Se ha demostrado que SR-BI es un receptor de membrana que media tanto la absorción como el eflujo de colesterol (Acton *et al.*, 1996). Este mismo transportador media el eflujo apical para vitamina E (Reboul *et al.* 2006), y éste además se incrementa cuando en el medio se adiciona un aceptor

fisiológico de vitamina E, tipo micelas libres de vitamina E. Ensayos similares se han realizado para vitamina D (Reboul *et al.*, 2011) demostrando su implicación. No obstante, a pesar de la falta de pruebas experimentales, existen propuestas teóricas sobre nuevas posibilidades, como la de que un transportador de tipo ABC pueda actuar como bomba responsable del eflujo de lípidos (Reboul, 2013).

## METABOLISMO INTRACELULAR

Una vez absorbidos, una gran parte de los carotenoides ingeridos en la dieta no son metabolizados en los enterocitos, sino que se transportan como otros lípidos acompañados de lipoproteínas circulantes hacia tejidos diana. Pero el resto (60% aproximadamente) es metabolizado a otros compuestos como retinoides y apocarotenoides, que ejercen diferentes funciones fisiológicas. En mamíferos, se han identificado tres familias de enzimas responsables de la degradación de carotenoides. Dos de ellas son auténticas oxigenasas de carotenoides, capaces de romper la cadena de polieno: BCMO1 ( $\beta$ ,  $\beta$  caroteno 15, 15'-monooxigenasa 1) y BCDO2 ( $\beta$ ,  $\beta$  caroteno 9, 10-dioxigenasa 2). La tercera familia compuesta por RPE65 (*retinalpigmentepitelium 65*) no es una auténtica oxigenasa de carotenoides, pero es responsable de la isomerización de los ésteres de retinol en 11 *cis*-retinal, esencial para la visión (Von Lintig *et al.*, 2010). BCMO1 requiere para su catálisis un anillo  $\beta$  no sustituido, es decir, es específico para carotenoides provitamínicos como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxanteno. En cambio, BCDO2 parece que no es tan restrictiva en la especificidad de sustrato, habiéndose descrito su acción además de sobre  $\beta$ -caroteno, sobre carotenoides con anillo ionona hidroxilado y  $\epsilon$ -ionona, como zeaxantina y luteína (Mein *et al.*, 2010) o carotenoides acíclicos como licopeno (Hu *et al.*,

2006). Además de la especificidad de sustrato, ambas enzimas se diferencian en la localización subcelular, BCMO1 es una proteína citoplasmática (Lindqvist y Andersson, 2002), mientras que BCDO2 se encuentra en la mitocondria (Amengual *et al.*, 2011). La necesidad de tal compartimentalización se atribuye a que ambas enzimas ejercen su función en las mismas células (hepatocitos) y tienen sustratos comunes (como el  $\beta$ -caroteno), y de esta forma se evita una innecesaria y poca efectiva competencia.

La ruta de degradación mejor conocida es la catálisis de BCMO1 sobre  $\beta$ -caroteno. Este enzima por rotura simétrica origina todo-*trans*-retinal, cromóforo de los conos y bastones de la retina, sobre la que actúa RP65 como se ya ha comentado, isomerizando a 11-*cis*-retinal, el pigmento funcional en el epitelio retinal pigmentario. Todo-*trans*-retinal puede ser oxidado a ácido retinoico (RA) por deshidrogenasas retinoicas, un compuesto tipo hormona que regula una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y fetal, la diferenciación celular y el control metabólico. Entre las muchas funciones asignadas a los retinoides en general y específicamente al RA se encuentra la de regular las reservas de grasas del organismo, a través de la clásica ruta RAR (receptores de ácido retinoico) o bien mediante otros receptores (Lobo *et al.* 2011). Alternativamente, todo-*trans*-retinal puede ser reducido a todo-*trans*-retinol que al esterificarse origina los ésteres de retinol (RE), formato en el que el retinol es transportado en plasma.

Sobre los catabolitos que puede originar BCDO2 sólo se conocen ejemplos muy específicos. Se ha descrito que por rotura asimétrica de carotenoides origina diferentes apocarotenoides y compuestos relacionados tales como  $\beta$ -14'-apocarotenal, rosaflueno,  $\beta$ -10'-apocarotenal, etc.,

mediadores en diversas funciones fisiológicas, pero de las cuales queda aún por describir bioquímica y molecularmente su formación.

## TRANSPORTE INTRACELULAR

Existe bastante desconocimiento sobre este proceso celular, y son muy pocas las pruebas evidentes de implicación de ciertas proteínas en el transporte. El ejemplo más claro sobre transporte celular resulta del proceso de coloración en la piel del gusano de seda (*Bombyx mori*). La cepa naturalmente utilizada es la de coloración blanca, pero existen en la naturaleza cepas de distintas coloraciones (amarilla, rosa, dorada, etc.), y la mayor parte de esta coloración se debe a carotenoides y flavonoides. Como otros animales, el gusano de seda es incapaz de sintetizar estos carotenoides. Éstos están en las hojas de las moreras de las que se alimenta, son absorbidos a nivel de estómago medio y transferidos vía hemolinfa hasta la glándula de la seda, donde se acumulan. El proceso de coloración de estos gusanos ha sido extensivamente estudiado y en la actualidad, gracias a los estudios clásicos de mapeo genético, se han llegado a identificar unos diez genes implicados de forma más o menos directa en el transporte de carotenoides. De todos ellos, dos son los más estudiados. El gen C es responsable del transporte de carotenoides de la hemolinfa a la glándula de la seda y codifica para Cameo 2, una proteína de membrana homóloga al receptor de HDL de los mamíferos. El otro gen es Y, que codifica para CBP (*carotenoid-binding protein*) que se une directamente a los carotenoides y se expresa específicamente en el citosol (Wang *et al.*, 2014) del estómago medio y de la glándula de la seda. Los últimos trabajos en este tema han demostrado que es necesaria una interacción directa

entre ambas proteínas para que se produzca la absorción y acumulación de carotenoides.

Sobre la existencia de otras proteínas implicadas en el transporte intracelular de carotenoides, sólo se tienen pruebas indirectas, como las diferentes localizaciones intracelulares que se han obtenido para algunos transportadores. Por ejemplo NPC1L1 ha sido localizado en endosomas, lisosomas, y mitocondrias (Sane *et al.*, 2006), mientras que CD36 ha sido detectada en el aparato de Golgi (Pohl *et al.*, 2005). Por su parte, SR-BI ha sido encontrado en gotas de lípidos del citoplasma y membranas tubulovesiculares. No obstante, excepto estos trabajos de localización celular, no se dispone de pruebas más evidentes.

## PARADOJA RESPONDERS VS LOW-RESPONDERS

En el estudio del proceso de absorción de carotenoides, históricamente siempre han surgido de forma transversal ambos conceptos. Aunque inicialmente han estado ligados fundamentalmente a  $\beta$ -caroteno, hoy en día pueden asociarse a otros carotenoides, fundamentalmente aquellos con valor de provitamina A. A finales de la década de 1980 surgieron los primeros trabajos en los que se medían los niveles de  $\beta$ -caroteno en suero tras dosis controladas administradas a diferentes sujetos. Los resultados mostraban individuos que no respondían al suplemento de  $\beta$ -caroteno, mientras que otros individuos cuadruplicaban los niveles de  $\beta$ -caroteno en plasma. Esta diferencia interindividual propició los primeros trabajos sobre *responders* y *non-responders* (Johnson y Russel, 1992; Stahl *et al.*, 1995), aunque no se establecía una clara causa en la diferencia de respuesta entre individuos, y se asociaba

a diferentes factores como diferencias en edad, índice de masa corporal y niveles basales de  $\beta$ -caroteno, colesterol o triglicéridos en plasma entre individuos. Posteriormente, Borel *et al.* (1998), fueron los primeros en asociar las grandes diferencias en  $\beta$ -caroteno en plasma (CV de 60%) con distintas eficiencias en la absorción a nivel de intestino de este carotenoide, y eso que entonces todavía se asumía un transporte pasivo para la absorción de carotenoides. Estos mismos autores, modificaron el concepto de *no responders* por *low responders* e identificaron que la respuesta es característica de cada individuo, es decir, el individuo muestra siempre la misma respuesta en diferentes ensayos. Se asume, pues, que la respuesta es unimodal, no pudiéndose establecer una clara diferencia entre *low-* y *high-responders*. En la actualidad, se ha demostrado que son las variantes genéticas a distintos niveles las responsables de la diferencia de absorción de carotenoides. En primer lugar, diferentes SNP en SR-B1 y CD-36 se han asociado con la concentración de carotenoides en plasma (Borel *et al.*, 2013), variaciones en el gen que codifica para BCMO1 son responsables de distintos fenotipos de  $\beta$ -caroteno *low converters* (Lobo *et al.*, 2001) y finalmente, probables diferencias genéticas en expresión o actividad de transportadores en tejidos diferentes del intestino (hígado, tejidos diana) son también responsable de las diferencias en la absorción de carotenoides. En la actualidad 45% de la población occidental puede considerarse como *low converters* (Hickenbottom *et al.*, 2002). El futuro pasa obligatoriamente por mayores estudios de correlación entre diferentes SNP de genes implicados en algún punto en la absorción y metabolismo de carotenoides y la asociación con exhaustivos trabajos de intervención.

## RETOS FUTUROS

Debido a la gran importancia que la vitamina A tiene para los mamíferos, es uno de los metabolitos más estudiados y por ello del único carotenoide del que se conoce el mecanismo de regulación de su absorción. Diversas pruebas experimentales han puesto de manifiesto que existe un control metabólico importante en mamíferos de los niveles de vitamina A en suero para mantenerlos constantes, de hecho, ante un descenso en las concentraciones por baja ingesta de carotenoides con valor de pro-vitamina A, el organismo libera ésteres de retinol acumulados en el hígado (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Es decir, en mamíferos existe un mecanismo regulatorio bastante conservado que controla la respuesta a carotenoides de la dieta y valores de vitamina A. Aunque queda mucha investigación por delante, recientemente se ha identificado un factor de transcripción ISX (Lobo *et al.*, 2010) que controla la absorción de  $\beta$ -caroteno inhibiendo la expresión de SR-BI y *Bcmo1* vía ácido retinoico. Una vez que  $\beta$ -caroteno entra en el enterocito BCMO1 origina retinal, que se transforma en ácido retinoico (RA). Como se ha comentado, RA es un compuesto que regula la expresión génica por activación de receptores nucleares denominados receptores de ácido retinoico (RAR). Estos son factores de transcripción controlados por ligandos que funcionan como heterodímeros con el receptor X de retinoico (RAX). El heterodímero RAR/RAX se une a regiones regulatorias de genes específicos que contienen elementos de respuesta (RE) concretos y activan la expresión por unión de ligando. Específicamente, ISX se une a una secuencia ya determinada del promotor de *Bcmo1* (Lobo *et al.*, 2013), y actúa como un represor transcripcional de su expresión. Esta secuencia está relacionada con un SNP en el gen de BCMO1 que ha sido relacionado con los niveles de  $\beta$ -caroteno en suero procedentes de la dieta (Ferruci *et al.*, 2009) así como

con una reducción en la conversión de  $\beta$ -caroteno (Lietz *et al.*, 2012). La unión de ISX a esta secuencia específica y las consecuencias de los SNP en la actividad del promotor de *Bcmo1* es una de las líneas de investigación más prometedoras, ya que contribuirá a explicar parcialmente las diferencias interindividuales en el proceso de absorción de  $\beta$ -caroteno.

A pesar de que en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del proceso de absorción de carotenoides, queda aún mucho por investigar. Varios son los procesos de los que apenas se conocen datos experimentales, como el eflujo, el metabolismo y transporte intracelular o la secreción basolateral. De este último se desconoce prácticamente todo. Sólo existen pruebas indirectas (con inhibidores poco específicos e inhibición parcial mediante siRNA) de la implicación de una proteína ABCA1 en el eflujo de ésteres de retinol (During y Harrison, 2007). Esta proteína fuertemente expresada en la zona basolateral del enterocito está implicada en el transporte reverso de colesterol (Oram y Vaughan, 2000).

Pero como conclusión con diferencia, el análisis de las diferentes variantes genéticas en los genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de carotenoides (o en su metabolismo), y que afectan a la eficiencia en la absorción de los mismos es el tema con más prospección de futuro.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (Gobierno de España, proyectos AGL-2015- 63890-R) y la Junta de Andalucía (AGR-6271-2011).

## REFERENCIAS

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., y Krieger, M. 1996. *Science* 271: 518-20
- Alcorn, C.J., Simpson, R.J., Leahy, D., Peters, T.J. 1991. *Biochemical Pharmacology* 42: 2259-2264.
- Altmann, S.W., Davis, H., Yao, X., Laverty, M., Compton, D.S., Zhu, L.J., Crona, J.H., Caplen, M.A., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Priestley, T., Burnett, D.A., Strader, C.D., Graziano, M.P. 2002. *Biochimica et Biophysica Acta* 1580: 77-93.
- Amengual, J., Lobo, G.P., Golczak, M., Li, H.N., Klimova, T., Hoppel, C.L., Wyss, A., Palczewski, K., VonLintig, J. 2011. *FASEB Journal* 25:948-959.
- Bleasby, K., Chauhan, S. y Brown, C. 2000. *British Journal of Pharmacology* 92: 1250-1261.
- Boffelli, D., Compassi, S., Werder, M., Weber, F.E., Phillips, M.C., Schulthess, G., y Hauser, H. 1997. *FEBS Letters* 411: 7-11.
- Borel, P., Grolier, P., Mekki, N., Boirie, Y., Rochette, Y., Le Roy, B., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998. *Journal of Lipid Research* 39: 2250-2260.
- Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998a. *Journal of Nutrition* 128: 1361-1367.
- Borel, P., Lietz, G., Goncalves, A., Szabo de Edelenyi, F., Lecompte, S., Curtis, P., Goumidi, L., Caslake, M.J., Miles, E.A., Packard, C., Calder, P.C., Mathers, J.C., Minihane, A.M., Tourniaire, F., Kesse-Guyot, E., Galan, P., Hercberg, S., Breidenassel, C., Gonzalez Gross, M., Moussa, M., Meirhaeghe, A., y Reboul, E. 2013. *Journal of Nutrition* 143: 448-456.
- Burckhardt, G., Kramer, W., Kurz, G., Wilson, F. A. 1983. *Journal of Biological Chemistry* 258: 3618-3622.
- Burnett, D.A., Caplen, M.A., Browne, M.E., Zhau, H., Altmann, S.W., Davis, H.R., y Clader, J.W. 2002. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 315-318.
- Burnett, D.A., Caplen, M.A., Domalski, M.S., Browne, M.E. Davis, H.R. Jr., Clader, J.W. 2002a. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 311-314.
- Carriere, V., Lesuffleur, T., Barbat, A., Rousset, M., Dussaulx, E., Costet, P., de Waziers, I., Beaune, P., y Zweibaum, A. 1994. *FEBS Letters* 355: 247-250.
- Chow, S.L. y Hollander, D. 1978. *Lipids* 13: 768-776.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., y Blaner, W.S. 2011. *Nutrients* 3: 63-103.
- Davies, J.P., Levy, B., y Ioannou, Y.A. 2000. *Genomics* 65: 137-45.
- Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P., Lam, M.H., Lund, E.G., Detmers, P.A., Graziano, M.P., Altmann, S.W. 2004. *Journal of Biological Chemistry* 279: 33586-92.

## REFERENCIAS

- Davies, J.P. y Ioannou, Y.A. 2006. *Current Opinion in Lipidology* 17: 221-226.
- Delie, F. y Rubas, W. 1997. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 14: 221-286.
- During, A., Hussain, M.M., Morel, D.W., Harrison, E.H. 2002. *Journal of Lipid Research* 43: 1086-1095.
- During, A., Dawson, H.D. y Harrison, E.H. 2005. *Journal of Nutrition* 135:2305-2312.
- During, A. y Harrison, E.H. 2007. *Journal of Lipid Research* 48: 2283-94.
- During, A., Doraiswamy, S. y Harrison, E.H. 2008. *Journal of lipid Research*, 49: 1714-1729.
- Ferrucci, L., Perry, J. R., Matteini, A., Perola, M., Tanaka, T., Silander, K., Rice, N., Melzer, D., Murray, A., Cluett, C., Fried, L.P., Albanes, D., Corsi, A. M., Cherubini, A., Guralnik, J., Bandinelli, S., Singleton, A., Virtamo, J., Walston, J., Semba, R.D., Frayling, T. M. 2009. *The American Journal of Human Genetics* 84: 123-133.
- Garret, D. A., Failla, M.L. y Sarama, R.J. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4301-4309.
- Glover, J. y Morton, R.A. 1958 *British Medicine Bulletin* 14: 226-233.
- Hamosh, M. 1990. *Nutrition* 6: 421-428.
- Harrison, E.H. 2005. *Annual Reviews in Nutrition* 25: 87-103.
- Hauser, H., Dyer, J.H., Nandy, A., Vega, M.A., Werder, M., Bieliauskaite, E., Weber, F.E., Compassi, S., Gemperli, A., Boffelli, D., Wehrli, E., Schulthess, G., Phillips, M.C. 1998. *Biochemistry* 37: 17843-17850.
- Hickenbottom, S.J., Follett, J.R., Lin, Y., Dueker, S.R., Burri, B.J., Neidlinger, T.R., Clifford, A.J. 2002. *American Journal of Clinical Nutrition* 75: 900-907.
- Hopfer, U., Nelson, K., Perrotto, F., Isselbacher, K. J. 1973. *Journal of Biological Chemistry* 248: 25-32.
- Hu, K.Q., Liu, C., Ernst, H., Krinsky, N.I., Russell, R.M., Wang, X.D. 2006. *Journal of Biological Chemistry* 281:19327-19338.
- Igel, M., Giesa, U., Lutjohann, D., Von Bergmann, K. 2003. *Journal of Lipid Research* 44: 533-538.
- Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G.V., Gallo, L.L. 1988. *Journal of Lipid Research* 29: 1573-1582.
- Ingels, F.M. y Augustijns, P.F. 2003. *Journal of Pharmacological Sciences* 92: 1545-1558.
- Jeanes, Y.M., Hall, W.L. y Lodge, J.K. 2005. *British Journal of Nutrition* 94: 92-99.
- Johnson, E.J. y Russell, R.M. 1992. *American Journal of Clinical Nutrition* 56: 128-135.

## REFERENCIAS

- Jumarie, C. y Malo, C. 1991. *Journal of Cellular Physiology* 149: 24-33.
- Keelan, M., Burdick, S., Wirzba, B., Thomson, A.B.R. 1992. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70: 1128-1133.
- Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M., y Semenza, G. 1978. *Biochimica et Biophysica Acta* 506: 136-154.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., Lusby, W.R. 1991. *Pure and Applied Chemistry* 63: 71-80.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., Lusby, W.R., Smith, J.C. 1992. *Analytical Chemistry* 64: 2111-2122.
- Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M.F., Von Lintig, J. 2002. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10581-10586.
- Krieger, M. 2004. *Journal of Lipid Research* 45: 1256-1265.
- Lietz, G., Oxley, A., Leung, W., Hesketh, J. 2012. *Journal of Nutrition* 142: 161S-165S.
- Lindenthal, B., Holleran, A.L., Aldaghas, T.A., Ruan, B., Schroepfer, G.J., Wilson, W.K., Kelleher, J.K. 2001. *FASEB Journal* 15: 775-784.
- Lindqvist, A. y Andersson, S. 2002. *Journal of Biological Chemistry* 277:23942-23948.
- Ling, K., Lee, H. y Hollander, D. 1989. *Lipids* 24: 51-55.
- Lobo, M.V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., De la Cueva, P., Celdran, A., Martín-Hidalgo, A., Vega, M.A., y Bragado, R. 2001. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49: 1253-1260.
- Lobo, G.P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A.R., Wyss, A., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2010. *The FASEB Journal* 24: 1656-1666.
- Lobo, G.P., Amengual, J., Baus, D., Shivdasani, R.A., Taylor, D. Von Lintig J. 2013. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 9017-9027.
- Manach, C. y Donovan, J.L. 2004. *Free Radical Research* 38: 771-785.
- McKay, G.J., Loane, E., Nolan, J.M., Patterson, C.C., Meyers, K.J., Mares, J.A., Yonova-Doing, E., Hammond, C.J., Beatty, S., Silvestri, G. 2013. *Ophthalmology* 120: 1632-1640.
- McNeish, J., Aiello, R.J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K.L., Roach, M.L., Royer, L.J., De Wet, J., Broccardo, C., Chimini, G., Francone, O.L. 2000. *Proceedings of the National Academy of Science* 97: 4245-4250.
- Mein, J. R., Dolnikowski, G.G., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X. D. 2010. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 506: 109-121.
- Miller, D. y Crane, R.K. 1961. *Analytical Biochemistry* 2: 284-286.

## REFERENCIAS

- Moore, A.C., Gugger, E.T. y Erdman, J.W. 1996. *Journal of Nutrition* 126: 2904-2912.
- Moussa, M., Landrier, J.F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Coméra, C., Collet, X., Fröhlich, K., Böhm, V., Borel, P. 2008. *Journal of Nutrition* 138: 1432-1436.
- Moussa, M., Gouranton, E., Gleize, B., Yazidi, C.E., Niot, I., Besnard, P., Borel, P., Landrier, J.F. 2011. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 578-584.
- Nieland, T.J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M., Kirchhausen, T. 2002. *Proceedings of the National Academy of Science* 99: 15422-15427.
- Oram J.F. y Vaughan A.M. 2000. *Current Opinion on Lipidology* 11: 253-260.
- Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2005. *Nutrition Research* 25: 631-640.
- Pérez-Gálvez, A., Pacheco, Y.M., Bermúdez, B., López, S., Abia, R., Muriana, F.J.G., Villar, J., Garrido-Fernández J. 2005. *Food Research International* 38: 1097-1102.
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, U., Eehalt, R., y Stremmel, W. 2005. *Molecular Biology of the Cell* 16: 24-31.
- Proulx, P., McNeil, J., Biglez, I., Williamson, D.G. 1982. *Canadian Journal of Biochemistry* 60: 904-909.
- Quick, T.C. y Ong, D.E. 1990. *Biochemistry* 29: 11116-11123.
- Reboul, E. 2013. *Nutrients* 5: 3563-3581.
- Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., Andre, M., Portugal, H., Jourdheuil-Rahmani, D., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P. 2005. *Biochemical Journal* 387: 455-461.
- Reboul, E., Berton, A., Moussa, M., Kreuzer, C., Crenon, I., Borel, P. 2006. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 4-10.
- Reboul, E. y Borel, P. 2011. *Progress on Lipid Research* 50: 388-491.
- Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., Nowicki, M., Landrier, J.F., Jourdheuil-Rahmani, D., Dufour, C., Collet, X., Borel, P. 2011. *Molecular Nutrition and Food Research* 560: 691-702.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J. 2000. *Genes & Development* 14: 2819-2830.
- Rosenblum, S.B., Huynh, T., Afonso, A., Davis, H.R.Jr., Yumibe, N., Clader, J.W. Burnett, D.A. 1998. *Journal of Medicinal Chemistry* 12: 973-980.
- Ryeom S.W., Silverstein R.L., Scotto A., Sparrow J.R. 1996. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20536-20539.
- Sane, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., Beaulieu, J.F., Levy, E. 2006. *Journal of Lipid Research* 47: 2112-2120.

## REFERENCIAS

- Sato, Y., Suzuki, R., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Noda, T., Mizuno, S., Sugawara, M., Iseki, K. 2012. *Journal of Pharmacology and Pharmacy Sciences* 15: 256-264.
- Schulthess, G., Compassi, S., Boffelli, D., Werder, M., Weber, F.E., Hauser H. 1996. *Journal of Lipid Research* 37: 2405-2419.
- Stahl, W., Schwarz, W., Von Laar J., Sies, H. 1995. *Journal of Nutrition* 125: 2128-2133.
- Stremmel, W. 1988. *The Journal of Clinical Investigation* 82: 2001-2010.
- Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., y Berk, P.D. 1985. *The Journal of Clinical Investigation* 75: 1068-1076.
- Sugawara, T. Ymashita, K., Asai, A., Nagao, A., Shiraishi, T., Imai, I., Hirata, T. 2009. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 205-212.
- Terpstra, V., van Amersfoort, E.S., van Velzen, A.G., Kuiper, J., Van Berkel, T.J. 2000. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20: 1860-72.
- Thomson, A.B., Keelan, M., Garg, M.L., Clandinin, M.T. 1989. *Lipids* 24: 494-501.
- Thurnhofer, H. y Hauser, H. 1990. *Biochemistry* 29: 2142-2148.
- Van den Berg, H. 1999. *Nutrition Reviews* 57: 1-10.
- VanHeek, M., France, C.F., Compton, D.S., McLeod, R.L., Yumibe, N.P., Alton, K.B., Sybertz, E.J., Davis, H.R.Jr. 1997. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283: 157-163.
- VanHeek, M., Farley, C., Compton, D.S., Hoos, L., Alton, K.B., Sybertz, E.J., y Davis, H.R. 2000. *British Journal of Pharmacology* 129: 1748-1754.
- Verma, R.P., Hansch, C. y Selassie, C.D. 2007. *Journal of Computer- Aided Molecular Design* 21: 3-22.
- VonLintig J, Kiser, P.D., Golczak, M., Palczewski, K. 2010. *Trends in Biochemistry Sciences* 35: 400-410.
- Wang, W., Huang, M., Dong, X., Chai, C., Pan, C., Tang, H., Chen, Y., Dai, F., Pan, M., Lu, C. 2014. *PLOS One* 9: e86594.
- Wilson, G. 1990. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 15: 159-163.
- Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. 2003. *Journal of Biological Chemistry* 278: 15565-15570.

# CAROTENOIDES Y SALUD HUMANA: POTENCIAL EFECTO ANTI-OBESIDAD

M. Luisa Bonet, Joan Ribot, José A. Canas y Andreu Palou



## INTRODUCCIÓN

La principal función conocida de los carotenoides en los seres humanos es la de servir como precursores de la vitamina A (retinol) y otros retinoides relacionados que juegan un papel importante en el ciclo visual (11-*cis*-retinal) y en la regulación de genes vinculados a muchos procesos fisiológicos y del desarrollo (ácido retinoico) (Grune *et al.*, 2010). El  $\beta$ -caroteno (BC) es el principal carotenoide provitamina A en la dieta humana. Otros son el  $\alpha$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina. Los carotenoides no provitamina A (incluyendo el licopeno, la luteína y la zeaxantina, abundantes en el cuerpo humano) y los carotenoides provitamina A pueden tener otras funciones cuya relevancia para la salud humana es aún incierta, como la de actuar como antioxidantes. Además se ha comprobado que pueden actuar como filtros fotoprotectores para la luz azul (Fiedor y Burda, 2014; Johnson, 2014). El espectro de procesos fisiopatológicos afectados por los retinoides a través de mecanismos genómicos y no genómicos se está

ampliando (Brun *et al.*, 2013). Además, se describen nuevas actividades biológicas de carotenoides intactos y derivados de carotenoides distintos de los retinoides que implican la interacción de estos compuestos con vías de señalización celular y con factores de transcripción, a veces de manera similar y a veces de manera muy diferente de los retinoides (Elliott, 2005; Eroglu y Harrison, 2013). En particular, se sugiere una nueva perspectiva sobre la función de los carotenoides y sus productos derivados que conecta estos compuestos con el control de la biología de los adipocitos y la acumulación de grasa corporal, con posibles implicaciones para la etiología y el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades (Bonet *et al.*, 2003; Bonet, Ribot y Palou, 2012; Landrier, Marcotorchino y Tourniaire, 2012; Tourniaire *et al.*, 2009).

Estudios epidemiológicos han asociado niveles circulantes altos de  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides, resultado de un alto consumo de frutas y verduras, con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Krinsky y Johnson, 2005). Teniendo en cuenta que el tejido adiposo es un importante depósito de carotenoides y retinol y que la adiposidad corporal es un factor determinante de la susceptibilidad para muchos trastornos metabólicos (Bays, 2011), es concebible que efectos beneficiosos potenciales de carotenoides y retinoides sobre la salud estén estrechamente vinculados a la modulación de los fenómenos asociados a la “adiposopatía” o grasa “mala o enferma”. De hecho, numerosos estudios pre-clínicos indican que carotenoides y apocarotenoides derivados (retinoides y otros) modulan aspectos clave de la biología del tejido adiposo, incluyendo la diferenciación, expansión hipertrófica, capacidad para la oxidación de grasas y la termogénesis y función secretora de los adipocitos. Esta evidencia se presenta y discute aquí.

## METABOLISMO DE LOS CAROTENOIDES Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE LA VITAMINA A

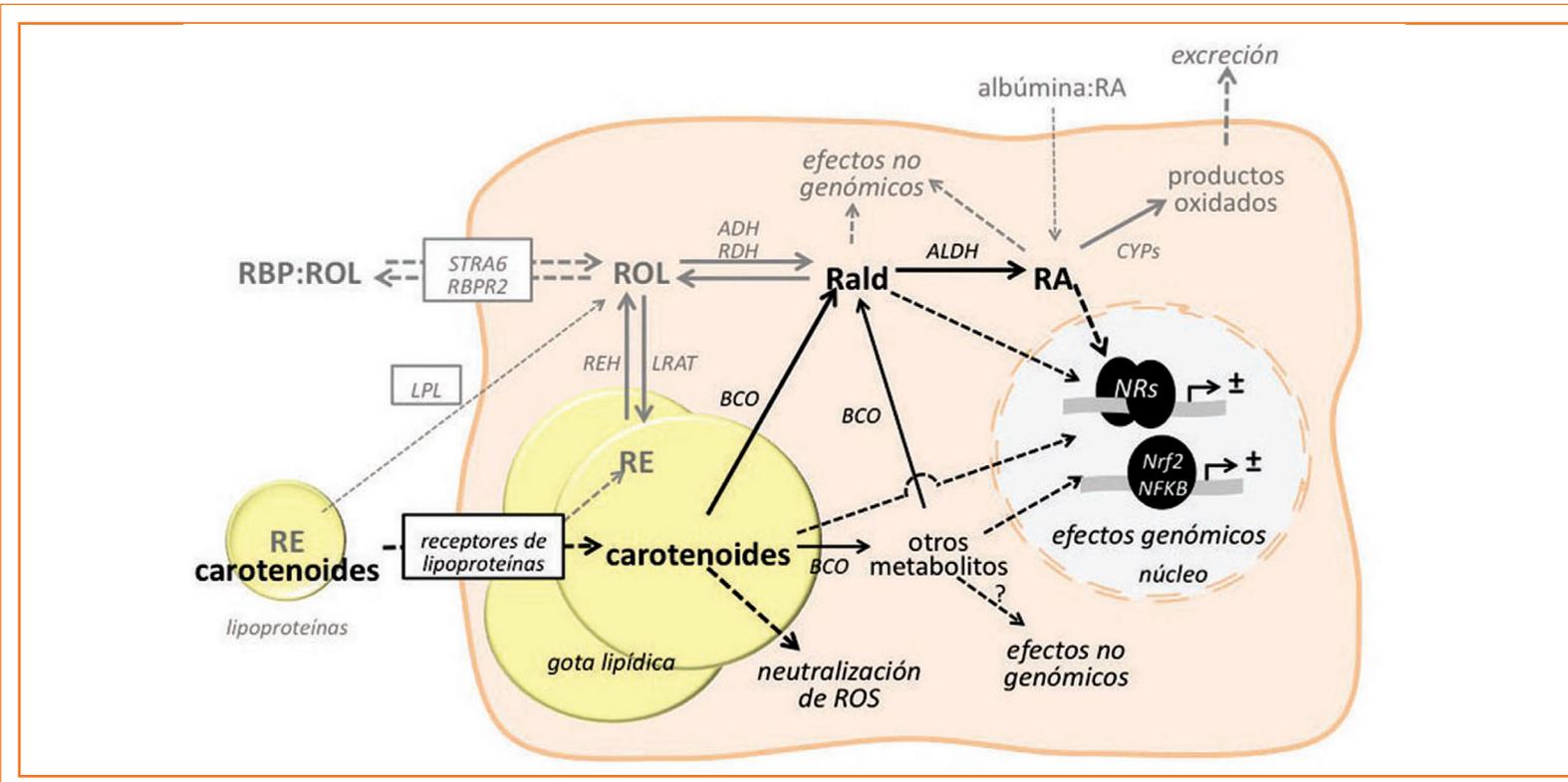
La identificación de la maquinaria molecular para la absorción y el metabolismo de carotenoides es un logro científico relativamente reciente. La escisión no enzimática de los carotenoides puede ocurrir, pero en todo caso se conocen dos enzimas celulares que escinden el  $\beta$ -caroteno en mamíferos: la BC 15,15'-oxigenasa (BCO1) y la  $\beta$ -caroteno 9',10'-oxigenasa (BCO2) (Von Lintig, 2012). La BCO1 escinde el BC centralmente en dos moléculas de retinaldehído (también llamado retinal), que puede ser oxidado irreversiblemente a ácido retinoico o reducido reversiblemente a retinol. Estudios en ratones *knockout* han demostrado que la BCO1 es la enzima clave para la producción de retinoides a partir del BC (Amengual *et al.*, 2013; Hessel *et al.*, 2007). La segunda enzima, la BCO2, escinde el BC asimétricamente generando diversos  $\beta$ -apocarotenales y  $\beta$ -apocarotenonas. Algunos productos de escisión de la BCO2, en particular, el  $\beta$ -apo-10'-carotenol, pueden ser convertidos en retinaldehído, con la participación de la BCO1 (Amengual *et al.*, 2013). Otros productos de la BCO2 parecen tener actividad biológica en sí mismos (Eroglu y Harrison, 2013). Las dos enzimas de escisión del BC también difieren en su especificidad de sustrato y en su ubicación en las células. La BCO1 muestra especificidad para los carotenoides provitamina A que contienen al menos un anillo  $\beta$  no sustituido en su molécula (como BC,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina), mientras que la BCO2 muestra una especificidad de sustrato mucho más amplia, y es capaz de metabolizar el caroteno acíclico licopeno y carotenoides oxigenados (esto es, xantofilas como la luteína y la zeaxantina) además de carotenos cíclicos (Von Lintig, 2012). BCO1 es una proteína citosólica, mientras que BCO2 se localiza en las

mitocondrias, donde funcionaría escindiendo carotenoides a fin de evitar su acumulación local y las consecuencias nocivas de la misma sobre la función mitocondrial (Amengual *et al.*, 2011a; Lindqvist y Andersson, 2002; Lobo *et al.*, 2012). Es importante destacar que BCO1 y BCO2 se expresan ampliamente en tejidos periféricos, además de en la mucosa intestinal; esta expresión generalizada, junto con la amplia distribución de los carotenoides en el cuerpo, ya sugiere que la conversión local de los carotenoides podría contribuir a la generación *in situ*, en los tejidos, de retinoides y otros apocarotenoides capaces de afectar el metabolismo tisular (Von Lintig, 2012). Esto sería particularmente cierto para los tejidos adiposos, como veremos más adelante.

La absorción y el metabolismo de los carotenoides han sido objeto de varias revisiones recientes (Harrison, 2012; Reboul, 2013; Shete y Quadro, 2013; Von Lintig, 2012) y aquí sólo haremos un breve resumen. Los carotenoides de la dieta son absorbidos como parte de micelas mixtas que incluyen lípidos y componentes de la bilis. La absorción intestinal se produce por difusión pasiva o por transporte facilitado, a través del receptor *scavenger* de clase B, miembro 1 (SR-BI) y quizá otros transportadores de lípidos, tales como CD36. En los enterocitos, el BC es escindido por la BCO1 a retinaldehído, que pasa a retinol. Al igual que el retinol preformado de la dieta, el retinol derivado del BC es esterificado con ácidos grasos de cadena larga y empaquetado como éster de retinilo en los quilomicrones, para su distribución a los tejidos. La BCO1 se expresa abundantemente en los enterocitos; no obstante, la eficiencia de la escisión del BC intestinal varía mucho entre especies. Las ratas adultas y ratones son altamente eficientes: convierten casi todo el B Co absorbido en retinol. No obstante, después de una suplementación oral con BC aguda o crónica, incluso si es moderada (20-

35 mg/kg de peso corporal), parte del BC es absorbido intacto en ratones, como lo indica su acumulación en tejidos incluyendo el tejido adiposo (Amengual *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2010). En los seres humanos y otros mamíferos, como los caballos y los hurones, una cantidad sustancial del BC absorbido (aproximadamente de 17% a 45%) escapa a la escisión intestinal, se incorpora en los quilomicrones y viaja asociado a lipoproteínas circulantes. Es de destacar que la absorción intestinal del BC y su conversión en retinoides en los enterocitos son dependientes del estatus de vitamina A, merced a un mecanismo de retroalimentación negativa que implica la inducción dependiente de ácido retinoico de ISX, un factor de transcripción específico del intestino delgado que inhibe la expresión de SR-BI y BCO1 (Lobo *et al.*, 2010a).

Los carotenoides y los ésteres de retinilo contenidos en las lipoproteínas circulantes son captados por las células gracias a la acción de receptores específicos de lipoproteínas, como SR-BI (que es el receptor de las HDL), el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr), la proteína-1 relacionada con el LDLr o la lipoproteína lipasa (LPL) (Shete y Quadro, 2013), o la acción de CD36, este último implicado en particular en la captación celular de licopeno por los adipocitos (Moussa *et al.*, 2011). El hígado, el tejido adiposo, el riñón, la piel y el pulmón se encuentran entre los principales sitios de acumulación de BC y otros carotenoides (Shete y Quadro, 2013). El hígado también constituye el principal almacén de vitamina A, que se acumula en forma de ésteres de retinilo en las células estrelladas hepáticas. El retinol hepático puede ser movilizado y pasar a la circulación unido a la proteína de 21-kDa de unión a retinol RBP (también conocida como RBP4), producida por los hepatocitos. Los tejidos extrahepáticos toman el retinol de los complejos retinol-RBP (holo-RBP). La proteína de la membrana plasmática STRA6 (estimulada



**FIGURA 1.** Esquema general del metabolismo celular de carotenoides y retinoides. Lipoproteínas circulantes que contienen carotenoides y ésteres de retinilo (RE) son internalizadas por endocitosis. Dentro de la célula, los carotenoides son escindidos por acción de oxigenasas específicas (BCO) para formar distintos metabolitos oxidados, incluido el retinaldehído (Rald), que puede ser reversiblemente reducido a retinol (ROL) por acción de varias deshidrogenasas (RDH o ADH) u oxidado irreversiblemente a ácido retinoico (RA), por acción de aldehído deshidrogenasas (ALDH). Los RE contenidos en lipoproteínas circulantes también pueden ser hidrolizados por la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), liberándose ROL que es absorbido. Además las células pueden obtener ROL a partir del que circula unido a la proteína de unión a retinol (RBP); este ROL entra en las células a través de la acción de receptores de superficie específicos (Stra6, RBPR2), o por difusión a través de la membrana plasmática. La captación eficiente de ROL depende de su unión a una proteína de unión a retinol intracelular (no mostrada) y de la actividad de la lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT) para formar RE, que son almacenados en la gotas lipídicas. Intracelularmente, los RE pueden ser hidrolizados por hidrolasas específicas (REH) dando lugar a ROL. Además del generado intracelularmente, el RA puede ser tomado de la circulación, donde se encuentra unido a albúmina. Retinoides (RA, Rald), otros productos de conversión de carotenoides o incluso moléculas de carotenoides intactas ejercen efectos genómicos al modular la actividad de receptores nucleares (NRs) y factores de transcripción relacionados con la respuesta inflamatoria y la defensa frente al estrés oxidativo (NF-κB, Nrf2), mediante interacción directa o por mecanismos más indirectos, y tienen asimismo efectos no genómicos, incluyendo, en algunos casos, la neutralización directa de especies reactivas del oxígeno (ROS). Finalmente, el RA, y probablemente otros derivados de los carotenoides, son catabolizados por las enzimas citocromo P450 (CYP) a productos de oxidación que son excretados. En la figura se representa en gris el metabolismo de la vitamina A y en negro, el de los carotenoides; las líneas continuas se corresponden con conversiones enzimáticas, y las discontinuas, con transporte o acción sobre procesos (efectos).

por ácido retinoico 6) es un receptor de alta afinidad para la RBP que ha sido implicado en la absorción de retinol a partir de complejos holo-RBP en tejidos como los del ojo (Berry *et al.*, 2013; Kawaguchi *et al.*, 2007), así como en la mediación de respuestas celulares a la holo-RBP relacionadas con la activación de la vía JAK-STAT (Berry *et al.*, 2011, 2013). Un parálogo de STRA6, el RBPR2 (receptor 2 de RBP), se expresa de manera característica en el hígado y el intestino, y en condiciones de obesidad resulta inducido en el tejido adiposo blanco (TAB) de ratones (Alapatt *et al.*, 2013).

En el medio intracelular, el retinol puede ser esterificado a ácido graso en reacción catalizada por la lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT) y posiblemente otras aciltransferasas, o puede ser metabolizado de forma reversible a retinaldehído por acción de alcohol deshidrogenasas (ADH) o retinol deshidrogenasas (RDH). El retinaldehído también se puede obtener del BC intracelular. El ácido retinoico es producido por oxidación irreversible del retinaldehído catalizada por la familia de enzimas aldehído deshidrogenasa-1 (ALDH1, también llamadas RALDH). Los retinoides se metabolizan intracelularmente unidos a proteínas de unión más o menos específicas, que ayudan a su solubilización y permiten dirigir los diferentes retinoides hacia las enzimas que los metabolizan y a dianas intracelulares particulares. Estas proteínas incluyen las proteínas celulares de unión a retinol (CRBP), que actúan como chaperonas en la biosíntesis de éster de retinilo catalizada por LRAT, y las proteínas celulares de unión a ácido retinoico (CRABP) y la proteína 5 de unión de ácidos grasos (FABP5), que están involucradas en el transporte del ácido retinoico al núcleo y en su transferencia a receptores nucleares específicos. En la figura 1 se muestra un esquema general del metabolismo celular de carotenoides y retinoides.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS CAROTENOIDES Y SUS METABOLITOS

Considerados en su conjunto, los carotenoides y sus productos de conversión modulan la expresión génica y las funciones celulares a través de múltiples mecanismos, en particular: *a*) interactuando con factores de transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares, tales como los receptores de ácido retinoico (RAR canónicos), los receptores de retinoides X (RXR) y los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR), entre otros; *b*) interfiriendo con la actividad de otros factores de transcripción, como el activador de la proteína-1 (AP-1) o las proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBP); *c*) modulando vías de señalización como la del factor nuclear kB (NF-kB) y la del factor nuclear 2 relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf2) que están asociadas, respectivamente, con respuestas inflamatorias y al estrés oxidativo, y *d*) a través de acciones extragenómicas incluyendo la actuación frente a especies reactivas del oxígeno (ROS), la retinoilación (acilación por ácido retinoico) de proteínas específicas y la activación de cascadas de proteína quinasas (Al Tanoury, Piskunov y Rochette-Egly, 2013; Blomhoff y Blomhoff, 2006; Bonet, Ribot y Palou, 2012; Breitman y Takahashi, 1996; Eroglu y Harrison, 2013; Kaulmann y Bohn, 2014). Todos estos mecanismos contribuyen a la acción de estos compuestos en los adipocitos, como veremos con más detalle.

El control de la expresión génica por ácido retinoico ha sido muy estudiado (Bastien y Rochette-Egly, 2004). Los isómeros del ácido retinoico son ligandos agonistas de los RAR (receptores de ácido retinoico, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ ) y los RXR (receptores de retinoides X, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  y RXR $\gamma$ ). El

ácido retinoico todo-*trans* (ATRA) se une a los RAR, y el ácido retinoico 9-*cis*, tanto a los RAR como a los RXR. La expresión de la mayoría de los genes diana de retinoides está controlada por heterodímeros RAR:RXR. Estos dímeros se unen a secuencias de nucleótidos definidas (elementos de respuesta) situadas en el promotor del gen, desde donde reclutan cofactores transcripcionales de manera dependiente de la unión del ATRA a la mitad RAR (Bastien y Rochette-Egly, 2004). Los RXR son socios de dimerización obligados para muchos otros receptores nucleares además de los RAR, incluyendo los PPAR, el receptor X de hígado, el receptor X de farnesoides, el receptor X de pregnano, el receptor de la hormona tiroidea y el receptor de vitamina D. Algunos heterodímeros RXR —incluyendo PPAR:RXR— se activan en respuesta a los respectivos ligandos de ambos monómeros constituyentes, lo que proporciona un mecanismo para efectos generalizados de los retinoides sobre la expresión génica (Aranda y Pascual, 2001). Además de activar los RAR canónicos, el ATRA (pero no el ácido retinoico 9-*cis*) puede comportarse como un ligando agonista activador de PPAR $\beta/\delta$  (pero no de las otras isoformas de PPAR, a saber, PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ ) (Shaw, Elholm y Noy, 2003), aunque existen resultados contradictorios (Rieck *et al.*, 2008). La partición del ATRA entre los RAR y el PPAR $\beta/\delta$  parece depender de los niveles de expresión relativos de las proteínas transportadoras intracelulares CRABP-II, que *entrega* el ATRA a los RAR y FABP5, que lo *entrega* al PPAR $\beta/\delta$  (Schug *et al.*, 2007).

Además del ácido retinoico, otros retinoides así como derivados de carotenoides diferentes de los retinoides interaccionan con receptores nucleares, ya sea para promover o antagonizar, según el caso, la acción de estos factores de transcripción sobre sus genes diana en las células. Aquí, introduciremos únicamente aquellas interacciones de posible relevancia para la biología del tejido adiposo (que se

abordarán con más detalle más adelante). El precursor de ATRA y producto directo de la BCO1, el retinaldehído, puede al igual que el ATRA funcionar como ligando activador de los RAR sobre genes diana en los adipocitos (Kiefer *et al.*, 2012); además, hay resultados que sugieren que el retinaldehído puede comportarse como un ligando antagonista del PPAR $\gamma$ , ya que inhibió la actividad transcripcional del PPAR $\gamma$  en ensayos de transfección celular y desplazó a agonistas de alta afinidad del PPAR $\gamma$  en ensayos *in vitro* de unión competitiva de radioligandos (Ziouzenkova *et al.*, 2007). Ciertos apocarotenoides resultantes de la escisión excéntrica del BC, como el  $\beta$ -apo-14'-carotenal, el ácido  $\beta$ -apo-14'-carotenoico y la  $\beta$ -apo-13-carotenona, se unen a los RAR con alta afinidad y antagonizan la transactivación dependiente de RAR e inducida por ATRA de genes diana en células de origen hepático (HepG2) (Eroglu *et al.*, 2012); puesto que algunos de estos apocarotenoides podrían estar presentes en los alimentos y en el plasma humano, se ha propuesto que podrían actuar como antagonistas naturales de los retinoides (Eroglu y Harrison, 2013). El  $\beta$ -apo-14'-carotenal (Ziouzenkova *et al.*, 2007a) y la  $\beta$ -apo-13-carotenona (Eroglu *et al.*, 2010) también reprimen la activación de RXR inducida por agonista, probablemente al funcionar como ligandos antagonistas de RXR. El  $\beta$ -apo-14'-carotenal antagoniza asimismo la actividad transcripcional de las diferentes isoformas de PPAR, especialmente PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$ , de modo que reprime respuestas celulares a los agonistas de estos receptores nucleares, incluyendo la diferenciación adipocitaria dependiente de la activación del PPAR $\gamma$  (Ziouzenkova *et al.*, 2007a). El ácido apo-10'-licopenoico, un producto de la escisión excéntrica del licopeno, puede activar a RAR *in vivo* e *in vitro* y su administración en ratones afecta la transcripción de ciertos genes diana de RAR (pero no todos) en el tejido adiposo (Gouranton *et al.*, 2011). Incluso moléculas intactas de carotenoides parecen ser

capaces de interactuar físicamente con receptores nucleares afectando su actividad transcripcional: los resultados indican que, en adipocitos en vías de diferenciación, la astaxantina puede comportarse como un ligando antagonista del PPAR $\gamma$  (Inoue *et al.*, 2012) y la  $\beta$ -criptoxantina, como un ligando agonista de RAR (Shirakura *et al.*, 2011).

## METABOLISMO Y FUNCIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN EL TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo es un importante almacén de carotenoides (Kaplan, Lau y Stein, 1990; Parker, 1989). En los adipocitos, los carotenoides se localizan principalmente con los triacilgliceroles en las gotas lipídicas, aunque también se encuentran en las membranas celulares (Gouranton *et al.*, 2008). En humanos, los niveles de carotenoides en los depósitos grasos abdominales muestran una estrecha correlación con la ingesta dietética y con los niveles circulantes de carotenoides (Chung *et al.*, 2009; El-Soheily *et al.*, 2002; Kohlmeier y Kohlmeier, 1995). También en humanos, la concentración total de carotenoides es mayor en el tejido adiposo abdominal que en el tejido adiposo de la nalga y el muslo (Chung *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos implicados en esta captación de carotenoides depósito-específica son desconocidos. Un trabajo reciente concluyó que la cantidad total de BC almacenado en los adipocitos de todo el cuerpo humano es más o menos constante ( $130 \pm 70$  [media  $\pm$  DE]  $\mu$ moles por persona) independientemente del índice de masa corporal (IMC) y de la ingesta de BC, lo que plantea preguntas acerca de para qué sirve y cómo se logra esta constancia (Osth *et al.*, 2014). El tejido adiposo es también un importante almacén de retinol. Un estudio pionero

estimó que, en ratas, 15-20% de todo el retinol corporal se encuentra en los tejidos adiposos, en particular en los adipocitos (y no en células de la fracción estromal-vascular) y mayoritariamente en forma de retinol libre, no esterificado (en oposición al almacenamiento preferente como éster de retinilo del hígado) (Tsutsumi *et al.*, 1992). En el tejido adiposo se han podido detectar otros retinoides incluyendo ATRA y retinaldehído, además de retinol (Kane, Folias y Napoli, 2008; Kane *et al.*, 2008). Es importante destacar que el tejido adiposo expresa todas las enzimas y proteínas intracelulares de unión involucradas en la producción y el metabolismo de retinol y ácido retinoico, incluyendo la BCO1 y la BCO2 (Hessel *et al.*, 2007; Landrier, Marcotorchino y Tourniaire, 2012; Tourniaire *et al.*, 2009). El tejido adiposo también produce RBP, lo que lo capacita para la exportación de retinol a la circulación (Tsutsumi *et al.*, 1992).

El retinol y los carotenoides provitamínicos almacenados en los adipocitos pueden servir para regular la homeostasis de la vitamina A en el organismo, a nivel sistémico. De hecho, se ha demostrado que las reservas de retinol y ésteres de retinilo del tejido adiposo se movilizan fácilmente en condiciones de deficiencia de vitamina A en la dieta (Frey y Vogel, 2011). Además, los carotenoides, la vitamina A y sus derivados pueden ejercer funciones específicas dentro de los adipocitos maduros, incluyendo el control del metabolismo (capacidades relativas para el almacenamiento y la oxidación de grasa), el estrés oxidativo y la secreción de señales endocrinas y mediadores inflamatorios. Estos aspectos podrían ser de especial relevancia en la obesidad, dado que la obesidad implica el desarrollo de adipocitos hipertróficos, en los que se exagera el estrés oxidativo (Le Lay *et al.*, 2014), y una inflamación de bajo grado del tejido adiposo (Wisse, 2004).

Aunque faltan análisis sistemáticos de los niveles de carotenoides, vitamina A y sus metabolitos en diferentes depósitos grasos en relación con el desarrollo de obesidad, diferentes líneas de evidencia indican que los carotenoides y los retinoides pueden jugar un papel relevante en la biología del tejido adiposo.

En primer lugar, hay estudios que sugieren una interacción entre el metabolismo intracelular de los retinoides y la dinámica de las gotas lipídicas. Éstas son consideradas hoy día orgánulos complejos con múltiples funciones, más allá de simples depósitos de almacenamiento de triglicéridos (Ducharme y Bickel, 2008). Estructuralmente, las gotas lipídicas consisten en un núcleo de lípidos neutros rodeado de una monocapa de fosfolípidos y proteínas, incrustadas en o próximas a la capa de fosfolípidos, que son cruciales para la estructura y la dinámica de la gota. El proteoma de las gotas lipídicas incluye enzimas del metabolismo de los retinoides, como la retinol deshidrogenasa Rdh10, que cataliza la conversión de retinol en retinaldehído, y la reductasa de retinaldehído Dhhr3, que cataliza preferentemente la reacción opuesta (Jiang y Napoli, 2013). Curiosamente, la asociación de enzimas del metabolismo de retinoides a la superficie de las gotas lipídicas parece depender de la biosíntesis activa de acil ésteres (Jiang y Napoli, 2012, 2013). Por ejemplo, en células COS7, la Rdh10 se localiza en las mitocondrias o membranas asociadas a las mitocondrias y pasa a la superficie de las gotas lipídicas cuando se activa la biosíntesis de acil ésteres (Jiang y Napoli, 2013). Es concebible, por tanto, que la síntesis de retinaldehído y ATRA se incrementa en condiciones que propician la expansión de las gotas lipídicas en los adipocitos. Sería interesante comprobar esta hipótesis, y si las enzimas de escisión del BC también se trasladan a las gotas de lípidos (que contienen carotenoides) de manera regulada.

Una segunda línea de evidencia de un probable papel de carotenoides y retinoides en el control de la función y dinámica del tejido adiposo es que genes que codifican para enzimas de su metabolismo exhiben una expresión diferencial en el tejido adiposo visceral (VAT) y el subcutáneo (SAT). Estos dos tipos de depósitos grasos presentan diferencias importantes entre ellos en cuanto a su origen genético, metabolismo, endocrinología, capacidad para la adipogénesis y riesgo para la salud que entrañan cuando están en exceso. El VAT se considera generalmente más fuertemente correlacionado con un riesgo elevado de disfunción metabólica y enfermedad cardiovascular que el SAT, que incluso podría tener un efecto protector (Hamdy, Porramatikul y Al-Ozairi, 2006; Lee, Wu y Fried, 2013). Un estudio transcriptómico reciente analizó la expresión génica en VAT omental en comparación con la de la grasa subcutánea en pacientes con obesidad extrema (IMC medio: 56.8 kg/m<sup>2</sup>) sometidos a un bypass gástrico Roux-en-Y abierto, y reveló el gen que codifica para BCO2 como uno de los 66 de expresión exclusiva en el VAT omental (Gerhard *et al.*, 2014). Puesto que, como se ha indicado antes, los productos de escisión de carotenoides por BCO2 pueden antagonizar la activación de RAR (Eroglu *et al.*, 2012), RXR (Eroglu *et al.*, 2010; Ziouzenkova *et al.*, 2007a) y PPAR (Ziouzenkova *et al.*, 2007a), la actividad de BCO2 sobre los carotenoides almacenados en el VAT omental podría resultar en una señalización por RAR:RXR y PPAR:RXR reducida en este tejido en comparación con tejidos que no expresan BCO2, como sería el SAT. Esto podría favorecer cambios en la secreción de adipocinas y una capacidad relativamente reducida para la adipogénesis y el metabolismo oxidativo en el VAT que podrían ser de importancia fisiopatológica.

La actividad BCO2 en VAT podría acompañar un metabolismo de retinoides más activo en general en la grasa visceral que

en la subcutánea. En roedores se han encontrado niveles comparables de retinol en VAT y SAT (Sima, Manolescu y Bhat, 2011; Tsutsumi *et al.*, 1992), pero mayores niveles de expresión de varios genes implicados en el metabolismo de retinoides en VAT (Sima, Manolescu y Bhat, 2011). Varios estudios en humanos (incluidos dos análisis proteómicos no dirigidos) han revelado una mayor expresión de ALDH1A1 (también conocida como Raldh1), la principal enzima para la conversión del retinaldehído en ácido retinoico, en VAT en comparación con SAT (Kiefer *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2010; Pérez-Pérez *et al.*, 2009). Uno de estos estudios reveló asimismo una asociación directa entre la expresión de ALDH1A1 en VAT y el IMC (Kiefer *et al.*, 2012), lo que podría estar en consonancia con el fenotipo magro y resistente al desarrollo de obesidad dietética que presentan los ratones *knockout* *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> (Kiefer *et al.*, 2012; Reichert *et al.*, 2011; Ziouzenkova *et al.*, 2007). En conjunto, estos resultados apuntarían a un efecto perjudicial de la actividad ALDH1A1 en el tejido adiposo en el contexto de la obesidad y sus secuelas. Sin embargo, otro estudio proteómico en humanos reportó niveles reducidos de la ALDH1A1 citosólica en VAT de sujetos pre-obesos diabéticos en comparación con sus controles no diabéticos (Murri *et al.*, 2013), lo que apuntaría a un efecto beneficioso de la actividad ALDH1A1.

La eliminación genética de diversas enzimas y proteínas de transporte implicadas en el metabolismo de carotenoides-retinoides —como BCO1, ALDH1A1, RDH1, retinol saturasa y CRBPs I y III— resulta en ratones con un fenotipo adiposo alterado (Hessel *et al.*, 2007; Kiefer *et al.*, 2012; Schupp *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007; Ziouzenkova *et al.*, 2007; Zizola *et al.*, 2010; Zizola, Schwartz y Vogel, 2008). Esta es una tercera línea de evidencia que apoya un papel del metabolismo endógeno de carotenoides-retinoides en el control del desarrollo y la

función del tejido adiposo, aunque hay que tener en cuenta que la especificidad de sustrato de algunas de estas enzimas (ALDH1A1, RDH1 y retinol saturasa) es amplia, por lo que no puede descartarse que sea su falta de acción sobre dianas moleculares distintas de los retinoides la que contribuya o incluso sea responsable del fenotipo adiposo observado. El fenotipo de la mayoría de estos modelos mutantes ha sido revisado recientemente (Frey y Vogel, 2011). Cabe destacar aquí que los ratones *BCO1*<sup>-/-</sup> son más susceptibles a la obesidad inducida por la dieta y tienen una expresión aumentada de genes inducidos por PPAR $\gamma$  en TAB visceral en comparación con sus controles de genotipo salvaje (Hessel *et al.*, 2007); este fenotipo estaría en consonancia con una acción anti-adiposidad de los productos de escisión de carotenoides generados por la actividad de la BCO1.

Por último, la conexión entre carotenoides y retinoides y la biología del tejido adiposo está sustentada por estudios de tratamiento o suplementación dietética, la mayoría de ellos en animales, que indican que estos compuestos afectan la adiposidad corporal y la salud metabólica principalmente vía efectos sobre la capacidad del tejido adiposo para el almacenamiento de grasa, la disipación de energía y la secreción de señales, si bien también pueden afectar al metabolismo energético y lipídico en tejidos no adiposos, como el músculo esquelético (Amengual *et al.*, 2008; Berry and Noy, 2009; Felipe *et al.*, 2003) o el hígado (Amengual *et al.*, 2012, 2010; Sheng *et al.*, 2008).

## CAROTENOIDES Y VITAMINA A EN EL CONTROL DE LA ADIPOSIDAD CORPORAL

### Estudios de intervención en animales

La suplementación dietética con BC (~35 mg/kg de peso corporal/día, 14 semanas) reduce la adiposidad corporal sin afectar el peso corporal ni la ingesta de energía en ratones (Amengual *et al.*, 2011). Esta reducción de la adiposidad corporal depende de la conversión del BC en retinoides a través de la BCO1, ya que no se observa en ratones deficientes en esta enzima (BCO1<sup>-/-</sup>), a pesar de que estos mutantes acumularon grandes cantidades de BC en el TAB después de la suplementación (así como de β-10'-apocarotenol, un derivado del BC producido por la actividad BCO2) (Amengual *et al.*, 2011). También se ha propuesto un efecto anti-obesidad para la β-criptoxantina, un carotenoide provitamina A que muestra similitudes estructurales y funcionales con el BC. En un modelo de obesidad genética en ratón (ratones Tsumura Suzuki obesos diabéticos, TSOD), la suplementación por vía oral con β-criptoxantina (0.8 mg/kg de peso corporal/día, contenidos en 400 mg de un polvo derivado de mandarinas Satsuma, *Citrus unshiu* Marc., durante ocho semanas) redujo el peso corporal, la masa de tejido adiposo visceral, la hipertrofia de los adipocitos y las concentraciones séricas de lípidos, sin afectar la ingesta energética (Takayanagi *et al.*, 2011). La suplementación de una dieta obesogénica alta en grasa con pulpa de mango (10% p/p; *Mangifera indica* L.) —que es rico en BC, β-criptoxantina y violaxantina (Cano y De Ancos, 1994)— redujo la ganancia de grasa corporal y mejoró la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones (Lucas *et al.*, 2011). Estos resultados *in vivo* están

en consonancia con resultados que muestran una reducción del contenido en lípidos intracelulares tras el tratamiento de adipocitos blancos murinos 3T3-L1 con BC (2 μM) o β-criptoxantina (1-10 μM) (Goto *et al.*, 2013; Lobo *et al.*, 2010a; Shirakura *et al.*, 2011). En hurones, en cambio, nuestro grupo ha descrito que una suplementación durante seis meses con BC (3.2 mg/kg de peso corporal/día) aumenta el peso corporal (en 14%) y la masa de grasa subcutánea (inguinal) (en 16%) (Murano *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2009). Dado que la acción anti-obesidad del BC requiere su conversión en retinoides (Amengual *et al.*, 2011a), la diferencia puede estar relacionada con que los hurones no son tan eficientes como los seres humanos y los roedores en la conversión de BC en vitamina A (Lederman *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999); de hecho, en el mismo estudio en hurones, el tratamiento con ATRA redujo la grasa corporal y el tamaño de los adipocitos (Sánchez *et al.*, 2009).

Una acción anti-obesidad de retinoides derivados del BC estaría de acuerdo con resultados, de nuestro grupo y otros, que indican que el tratamiento con ATRA (a dosis de 0.25 a 100 μg/g de peso corporal/día, durante periodos variables y a través de diversas rutas de administración) puede reducir la adiposidad corporal y mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en animales (roedores) delgados y obesos (Amengual *et al.*, 2010; Berry y Noy, 2009; Bonet *et al.*, 2000; Felipe *et al.*, 2004, 2005; Manolescu, Sima y Bhat, 2010; Mercader *et al.*, 2008, 2006; Puigserver *et al.*, 1996; Ribot *et al.*, 2001; Strom *et al.*, 2009). El tratamiento con ATRA contrarresta asimismo el desarrollo de obesidad inducida por la dieta en ratones propensos a la obesidad (Berry *et al.*, 2012). La acción anti-obesidad del ATRA se ha asociado a sus efectos aumentando el metabolismo oxidativo y el gasto energético en diferentes tejidos, incluido el TAB, y reduciendo la expresión y actividad pro-lipogénica del PPARγ en los depósitos de TAB,

subsiguiente a la activación de RAR y PPAR $\beta/\delta$ . El precursor inmediato del ATRA, el retinaldehído, también parece tener *per se* una acción anti-obesidad ya que: a) los ratones que carecen de ALDH1A1 presentan niveles aumentados de retinaldehído en el tejido adiposo y resistencia al desarrollo de obesidad inducida por la dieta (Ziouzenkova *et al.*, 2007); b) el silenciamiento *in vivo* (mediante oligonucleótidos antisentido) de la ALDH1A1 en el tejido adiposo limita el desarrollo de obesidad inducida por la dieta (Kiefer *et al.*, 2012), y c) la administración de retinaldehído o de un inhibidor de la ALDH1A1 reduce la masa grasa subcutánea en ratones obesos ob/ob (Ziouzenkova *et al.*, 2007). La ALDH1A1 es la principal aldehído deshidrogenasa para la producción de ATRA a partir de retinaldehído en los adipocitos (Reichert *et al.*, 2011; Sima, Manolescu y Bhat, 2011). Como en el caso del ATRA, el efecto anti-obesidad de la eliminación o silenciamiento de la ALDH1A1 se ha relacionado con la estimulación del gasto energético en el TAB (Kiefer *et al.*, 2012).

Las dietas pobres en carotenoides y vitamina A se utilizan tradicionalmente para favorecer el desarrollo del tejido adiposo y la formación de grasa intramuscular en el ganado (Gorocica-Buenfil *et al.*, 2007; Kawada, Kamei y Sugimoto, 1996), el llamado *marbling* bovino. También estudios experimentales en animales indican una relación entre el estatus de vitamina A y la adiposidad corporal. En roedores, la alimentación crónica con una dieta deficiente en vitamina A conlleva un aumento de la adiposidad corporal y de la expresión adiposa de PPAR $\gamma$  (Esteban-Pretel *et al.*, 2010; Ribot *et al.*, 2001). Recíprocamente, la alimentación crónica con una dieta suplementada en vitamina A (en forma de retinol o retinol palmitato, a dosis de 40 a 50 veces la de control) conlleva una reducción de la adiposidad corporal, tanto en ratas delgadas (Kumar, Sunvold y Scarpace, 1999) como genéticamente

obesas WNIN/Ob (Jeyakumar *et al.*, 2006, 2008; Sakamuri *et al.*, 2011) —aunque, en uno de los estudios, a expensas de un aumento de los lípidos en suero e hígado (Jeyakumar *et al.*, 2008)—. En cambio, la suplementación con vitamina A contrarrestó sólo de manera modesta el desarrollo de obesidad dietética en ratones propensos a la obesidad (Felipe *et al.*, 2003), y no redujo la ganancia de peso y adiposidad corporal en ratas expuestas a una dieta de cafetería (Bairras *et al.*, 2005). De hecho, hay estudios que apuntan a un efecto pro-obesogénico de una sobre-ingesta moderada de vitamina A preformada (retinol) en periodos tempranos de la vida, a través de mecanismos que estarían relacionados con cambios en el desarrollo del tejido adiposo (Granados *et al.*, 2013; Redonnet *et al.*, 2008).

También se ha propuesto una acción anti-obesidad para varios carotenoides no provitamina A. Es el caso de la astaxantina y la crocetina, carotenoides naturales con propiedades antioxidantes abundantes, respectivamente, en animales marinos y el azafrán (*Crocus sativus* Linn). En estudios con roedores, ambos carotenoides previnieron la acumulación de grasa visceral, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa, sin afectar a la ingesta de alimentos (la astaxantina a dosis de 6-30 mg/kg de peso corporal/día y la crocetina, de 50 mg/kg de peso corporal/día) (Arunkumar, Bhuvaneshwari y Anuradha, 2012; Ikeuchi *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2008). Estos efectos se han relacionado con una mayor utilización de los ácidos grasos al nivel sistémico en los animales tratados con astaxantina (como indica su cociente respiratorio relativamente reducido en los análisis de calorimetría indirecta) (Ikeuchi *et al.*, 2007) y con una mayor tasa de oxidación hepática de ácidos grasos, en los tratados con crocetina (Sheng *et al.*, 2008); en estos dos estudios no se abordaron posibles efectos metabólicos en los

tejidos adiposos. La suplementación con tilacoides crudos preparados a partir de hojas de espinaca, ricos en violaxantina, también redujo la ganancia de peso y adiposidad corporal en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, sin afectar el consumo de energía (Emek *et al.*, 2010). Por último, diversos estudios indican un efecto anti-obesidad de la fucoxantina, un carotenoide alénico presente en algas marrones comestibles que se ha demostrado capaz de contrarrestar el desarrollo de obesidad dietética en ratones propensos a la obesidad (cuando se añade a la dieta obesógena al 0.05-2%, p/p) y de reducir la masa grasa abdominal en ratones genéticamente obesos KK-A<sup>y</sup> (cuando se añade a 0.2% a la dieta estándar) al favorecer la oxidación de ácidos grasos en el TAB (Miyashita *et al.*, 2011).

## Estudios epidemiológicos en humanos

Los niveles séricos de carotenoides, incluido el BC, están reducidos en humanos con sobrepeso u obesidad, como lo indican diversos estudios en adultos y en niños-adolescentes (Burrows *et al.*, 2009; Decsi, Molnar y Koletzko, 1997; Moor de Burgos, Wartanowicz y Ziemlanski, 1992; Sarni *et al.*, 2005; Yeum *et al.*, 1998). Es más, diversos estudios epidemiológicos transversales a gran escala han mostrado una asociación inversa entre la concentración de carotenoides en sangre y el IMC y otros índices de obesidad incluida la adiposidad corporal; en algunos casos, esta asociación persiste incluso tras ajustar por otros factores asociados con la concentración de carotenoides, como la ingesta de frutas y verduras, grasas, fibra, alcohol, el uso de suplementos, el tabaquismo, el sexo y las concentraciones de lípidos circulantes (Andersen *et al.*, 2006; Brady *et al.*, 1996; De Souza Valente da Silva, Valeria da Veiga y Ramalho, 2007; Ford *et al.*, 2002; Gunanti *et al.*,

2014; Kimmons *et al.*, 2006; Neuhouser *et al.*, 2001; Strauss, 1999; Suzuki *et al.*, 2006; Wallstrom *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). Estudios transversales indican asimismo menores concentraciones de carotenoides en suero de adultos y niños con síndrome metabólico (Beydoun *et al.*, 2011, 2012). De hecho, bajos niveles de carotenoides en sangre se han asociado con toda una serie de factores de riesgo o biomarcadores de síndrome metabólico —e.g., elevados índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), insulinemia en ayunas, LDL oxidadas, hemoglobina glicosilada y niveles circulantes de marcadores inflamatorios como la proteína-C reactiva— incluso después de ajustar por factores de confusión incluyendo el IMC y otros parámetros relacionados con la obesidad (Beck *et al.*, 2008; Erlinger *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 1999, 2003; Hozawa *et al.*, 2007; Kritchevsky *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 2006; Van Herpen-Broekmans *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Estas asociaciones se atribuyen generalmente a una posible actividad antioxidante y antiinflamatoria de los carotenoides, de las que hablaremos más adelante.

Una asociación inversa entre los niveles de carotenoides en sangre y el IMC o la adiposidad corporal puede tener diferentes explicaciones. En primer lugar, el IMC y los niveles circulantes de carotenoides pueden estar correlacionados debido a factores dietéticos y otros factores de estilo de vida que afecten a ambos. En segundo lugar, dado que los carotenoides son parcialmente solubles en grasa, el tejido adiposo puede actuar como sumidero, por lo que se encontrarían relativamente menos en circulación en los individuos obesos (Brady *et al.*, 1996; Wallstrom *et al.*, 2001). Sin embargo, la concentración de carotenoides en el tejido adiposo también es menor en las personas obesas (Chung *et al.*, 2009; Kabagambe *et al.*, 2005; Osth *et al.*, 2014; Virtanen *et al.*, 1996); un trabajo reciente mostró que la concentración de BC es 50% menor en los

adipocitos aislados de sujetos obesos que en los de sujetos delgados o no obesos (Osth *et al.*, 2014). Por último, el tejido adiposo en la obesidad genera estrés oxidativo (Higdon y Frei, 2003), y los carotenoides podrían estar reducidos como reflejo de su papel en la defensa frente a este estrés, puesto que se consumen en su acción como antioxidantes (Andersen *et al.*, 2006).

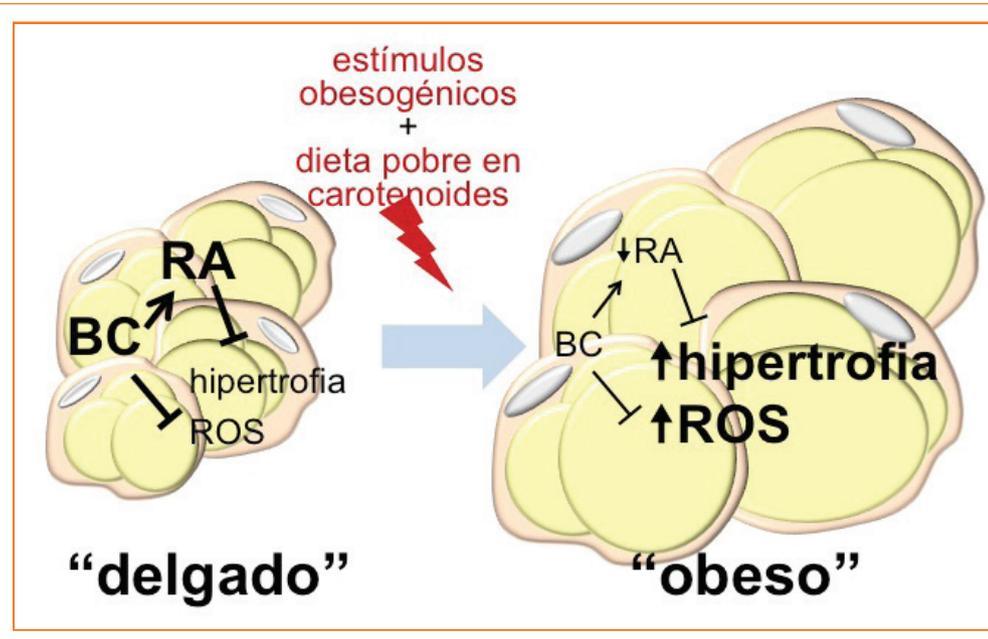
Sin menoscabo de las explicaciones anteriores, creemos que no se puede descartar un enlace mecanicista a la vista de resultados que indican que, en los adipocitos, el BC más que el retinol funcionaría como precursor para la síntesis local de retinoides capaces de ejercer una acción anti-adiposidad (Lobo *et al.*, 2010; Shirakura *et al.*, 2011). La menor concentración de BC en los adipocitos en la obesidad podría reflejar un mayor consumo de BC en reacciones antioxidantes, y quizá también un intento de contrarrestar la hipertrofia de los adipocitos aumentando la producción de retinoides a partir del BC almacenado. Sea cual fuere su origen, si no se corrige a través de la dieta, una vez establecida la depleción de BC en los adipocitos podría contribuir al mantenimiento y desarrollo ulterior de una obesidad patológica, al quedar suprimida la señalización anti-obesidad por retinoides derivados del BC (figura 2). Además, hay estudios que sugieren que los humanos obesos podrían tener una menor capacidad de conversión del BC en retinoides (Tang *et al.*, 2003; Wise *et al.*, 2009), y esta característica también podría contribuir al desarrollo y mantenimiento del estado obeso.

Mientras que la asociación inversa entre carotenoides en sangre e índices de obesidad está bien establecida, una posible asociación entre estatus de vitamina A medido como niveles de retinol sérico y obesidad humana es menos clara a la luz de los datos epidemiológicos. Varios

de los estudios que reportan la asociación inversa para los carotenoides encuentran que los niveles de retinol en suero se mantienen constantes a través de los valores de IMC o entre grupos de obesos y no obesos (De Souza Valente da Silva, Valeria da Veiga y Ramalho, 2007; Decsi, Molnar y Koletzko, 1997; Neuhouser *et al.*, 2001; Sarni *et al.*, 2005), reflejando probablemente la regulación homeostática que se consigue mediante el control del almacenamiento y la liberación de retinol por el hígado. En un estudio reciente, mayores concentraciones de retinol en suero (y menores de carotenoides) se asociaron con una mayor probabilidad de sobrepeso y obesidad en niños (Gunanti *et al.*, 2014). Por el contrario, dos estudios en adultos con sobrepeso y obesidad reportan la asociación inversa, es decir, menores niveles de retinol sérico asociados a un mayor IMC (Botella-Carretero *et al.*, 2010; Viroonudomphol *et al.*, 2003).

También se ha investigado la relación entre ingesta dietética de vitamina A o carotenoides (evaluada a través de cuestionarios) e índices de adiposidad. Estudios iniciales apuntaron a la vitamina A como uno de los pocos micronutrientes deficitarios en la dieta de muestras de población con una alta prevalencia de obesidad (Vaughan, Benyshek y Martin, 1997; Wolfe y Sanjur, 1988). Además, en adultos jóvenes sanos se ha descrito una asociación inversa entre la ingesta de vitamina A preformada y varias medidas de adiposidad, como el peso corporal, el índice de masa corporal, la circunferencia de la cintura o el índice cintura-cadera, después de ajustar por la ingesta total de energía (Zulet *et al.*, 2008). En un estudio transversal en varones de mediana y avanzada edad (n = 374), ingestas elevadas de carotenoides totales, principalmente BC y licopeno, se asociaron con una menor circunferencia de la cintura, menos masa grasa visceral y subcutánea y menor prevalencia de síndrome metabólico (Sluijs *et al.*, 2009). En otro

**FIGURA 2.** Papel propuesto para el  $\beta$ -caroteno almacenado en el tejido adiposo contrarrestando la “adiposopatía”. En los adipocitos, el BC almacenado (y posiblemente otros carotenoides provitamina A) puede servir para secuestrar especies reactivas del oxígeno (ROS) y como precursor de retinoides como el ácido retinoico (RA) capaces de reprimir la hipertrofia de los adipocitos, mediante la supresión del PPAR $\gamma$  y la estimulación del metabolismo oxidativo y energético. Estas actividades pueden ayudar a contrarrestar la expansión patológica del tejido adiposo en condiciones obesogénicas y a mantener al individuo delgado. Sin embargo, el BC es consumido en el transcurso de estas actividades. Si las condiciones obesogénicas persisten y la dieta es deficitaria en carotenoides, el agotamiento de los depósitos adiposos de BC daría lugar a una reducción de la capacidad para eliminar las ROS y para mantener la señalización anti-adiposidad de los retinoides, contribuyendo así al desarrollo de una obesidad patológica.



estudio, este prospectivo y con  $n = 3\ 232$  sujetos, ingestas altas de carotenoides consecuencia de un alto consumo de frutas y verduras, como en la dieta mediterránea, se asociaron con un menor desarrollo, a lo largo del tiempo, de características patológicas propias del síndrome metabólico, incluyendo el aumento de la circunferencia de la cintura (Kesse-Guyot *et al.*, 2013). En conjunto, los resultados de estos estudios asocian ingestas dietéticas altas de vitamina A y carotenoides con una menor adiposidad corporal.

### Estudios de intervención en humanos

A pesar de los muchos estudios experimentales y epidemiológicos que avalan una relación, son pocos los estudios de intervención específicamente diseñados

para evaluar el efecto de la suplementación dietética de carotenoides sobre parámetros relacionados con la adiposidad corporal realizados hasta la fecha. Este tipo de estudios se han hecho principalmente para BC,  $\beta$ -criptoxantina y fucoxantina.

Dos estudios piloto recientes doble ciego controlados con placebo en niños con sobrepeso y obesidad han utilizado dosis similares de BC (3 a 4 mg/día, como parte de suplementos) y mostrado cambios significativos en la adiposidad abdominal tras seis meses de suplementación (Canas *et al.*, 2012, 2014). En el primero de estos dos estudios, niños delgados y con sobrepeso recibieron diariamente un suplemento de concentrado de jugo de frutas y vegetales encapsulado (que proporcionaba aproximadamente 3.75 mg de BC, 117 mg de vitamina C, 22.5 UI de vitamina E, 210 mg de ácido fólico y 30 mg de calcio)

o placebo, junto con asesoramiento nutricional; la toma del suplemento condujo a un aumento de los niveles séricos de BC y resultó en una reducción de la masa grasa abdominal y una mejora de la resistencia a la insulina en los niños con sobrepeso (Canas *et al.*, 2012). En el segundo estudio, niños obesos completaron un programa intensivo de intervención sobre el estilo de vida de dos semanas de duración, seguido de seis meses de suplementación con Jarrow CaroteneAll® (cápsulas que proporcionaban 5000IU de  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno, 20 mg de luteína, 4 mg de zeaxantina, 20 mg de licopeno, 1 mg de astaxantina y 20 mg de vitamina E al día) o placebo; en el grupo de tratamiento, la adiposidad visceral y subcutánea se redujo respecto de los valores basales (al inicio del estudio) a la vez que aumentaron los niveles de adiponectina en suero, mientras que estos parámetros cambiaron en sentido opuesto en el grupo placebo (Canas *et al.*, 2014).

En varones japoneses moderadamente obesos, la suplementación con  $\beta$ -criptoxantina obtenida de la mandarina Satsuma (0.5 mg/día, en forma de bebida) conllevó un aumento de los niveles de  $\beta$ -criptoxantina en suero y una reducción del peso corporal, la grasa visceral y la circunferencia de la cintura (Takayanagi y Mukai, 2014; Tsuchida *et al.*, 2008). En otro estudio, este en 17 mujeres obesas posmenopáusicas suplementadas durante tres semanas con una bebida que contenía  $\beta$ -criptoxantina (4.7 mg/día), la toma del suplemento no supuso cambios del peso corporal o el IMC, pero aumentó los niveles séricos de adiponectina por un factor de cuatro, lo que sugiere una reducción efectiva de la adiposidad corporal (que no fue medida directamente en este estudio) (Iwamoto *et al.*, 2012).

Un ensayo piloto aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo evaluó los efectos del consumo de 6 g/día de algas

marrones ricas en fucoxantina durante dos meses en adultos ecuatorianos no consumidores de algas y con al menos uno de los síntomas del síndrome metabólico; la suplementación mejoró la presión arterial sistólica y disminuyó la circunferencia de la cintura en las mujeres (Teas *et al.*, 2009). Otro estudio investigó los efectos del Xanthigen™, que es una fuente de fucoxantina de alga marrón y extracto de aceite de semilla de granada rico en un ácido linolénico conjugado, el ácido púnicico. El suplemento fue administrado durante 16 semanas a mujeres obesas no diabéticas, unas con hígado graso de origen no alcohólico y otras sin hígado graso; en ambos grupos, produjo una reducción estadísticamente significativa del peso corporal, la circunferencia de la cintura, el contenido de grasa corporal y los triglicéridos séricos respecto de los valores iniciales (Abidov *et al.*, 2010).

## CAROTENOIDES Y DERIVADOS COMO MODULADORES DE LA ADIPOGÉNESIS

El tejido adiposo es muy plástico: tiene una gran capacidad de expandirse para facilitar el almacenamiento del excedente energético, si es el caso, mediante el aumento de tamaño (hipertrofia) de los adipocitos maduros y el incremento del número de adipocitos (hiperplasia). La hiperplasia implica la proliferación de células precursoras residentes en los depósitos grasos y la subsiguiente diferenciación adiposa de la progenie, o adipogénesis. Este proceso es estimulado por señales nutricionales y hormonales que desencadenan la activación de una cascada de factores de transcripción que incluye varios miembros de la familia de los C/EBPs y el PPAR $\gamma$ , que es considerado el regulador maestro de la adipogénesis (Farmer, 2006). Incluso en el tejido adiposo (humano) adulto,

aproximadamente 10% de los adipocitos se renueva cada año (Spalding *et al.*, 2008), y la adipogénesis puede inducirse por el consumo de una dieta rica en grasa, tanto en roedores (Klyde y Hirsch, 1979) como en humanos (Tchoukalova *et al.*, 2010). La adipogénesis es necesaria: defectos en la adipogénesis, especialmente si el balance energético es positivo (es decir, si se ingiere más energía de la que se gasta), pueden favorecer la deposición de grasa en sitios ectópicos y con ello fenómenos de lipotoxicidad que conllevan el desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes y complicaciones vasculares (Virtue y Vidal-Puig, 2010). No obstante, muchos humanos obesos tienen un número de adipocitos superior al valor promedio, y la pérdida de peso disminuye el volumen pero no el número de adipocitos, lo que podría facilitar la recuperación del peso perdido (Arner y Spalding, 2010). De hecho, estudios experimentales en roedores sugieren que un aumento del número de adipocitos puede *per se* conducir al desarrollo de obesidad (Naaz *et al.*, 2004). En este contexto, el control de la adipogénesis emerge como una diana terapéutica potencial en la obesidad, como coadyuvante de las estrategias convencionales que persiguen establecer un balance energético negativo. Los agentes capaces de afectar el equilibrio entre génesis y muerte de adipocitos favoreciendo la reducción del número de células grasas son de potencial interés (Arner y Spalding, 2010).

El BC (50  $\mu$ M) inhibe la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3-L1, el modelo prototipo para los estudios de la adipogénesis (Kawada *et al.*, 2000). Este efecto probablemente es debido a la conversión del BC en ATRA, cuyo efecto inhibitorio sobre la adipogénesis —cuando se aplica a dosis relativamente altas (0.1-10  $\mu$ M) y desde las primeras etapas del proceso— es bien conocido (Kuri-Harcuch, 1982; Murray y Russell, 1980; Xue *et al.*, 1996). A la

inhibición de la adipogénesis por ATRA contribuyen diversos mecanismos no excluyentes. El RAR con ligando (ATRA) unido interfiere con la actividad de un factor de transcripción temprano en la cascada adipogénica, el C/EBP $\beta$  (Schwarz *et al.*, 1997), a través de la inducción dependiente de RAR de una proteína inhibidora del C/EBP $\beta$ , la Smad3 (Marchildon *et al.*, 2010). Además, a través de la vía CRABP II-RAR, el ATRA induce la expresión en los preadipocitos de proteínas específicas que inhiben la adipogénesis, como Pref-1, Sox9 y KLF2 (Berry *et al.*, 2012). La retinoilación de proteínas reguladoras que rigen la disponibilidad de PPAR $\gamma$  también jugaría un papel en la inhibición de la adipogénesis por ATRA, éste independiente de RAR (Dave *et al.*, 2014). Además, el ATRA promueve la apoptosis de preadipocitos primarios de rata y de preadipocitos clonales (Chawla y Lazar, 1994; Kim *et al.*, 2000). Está probado que la inhibición de la adipogénesis es uno de los mecanismos mediante los cuales el tratamiento crónico con ATRA contrarresta el desarrollo, de obesidad inducida por alimentación con dieta rica en grasa en ratones (Berry *et al.*, 2012). Un segundo mecanismo implicado es la activación de la oxidación de grasas y el gasto energético (Berry *et al.*, 2012), que también parece ser el principal mecanismo responsable de la reducción de grasa corporal que experimentan animales bajo dieta estándar cuando son tratados de manera aguda con ATRA.

Metabolitos del BC distintos de ATRA también reprimen la adipogénesis de líneas celulares de preadipocitos, en particular el retinaldehído (Kawada *et al.*, 2000; Ziouzenkova *et al.*, 2007) y dos **b**-apo-carotenales resultantes de la escisión asimétrica del BC, el **b**-apo-8'-carotenal (Kawada *et al.*, 2000) y el **b**-apo-14'-carotenal (Ziouzenkova *et al.*, 2007a). Retinaldehído y **b**-apo-14'-carotenal parecen ser agonistas

RAR débiles (Ziouzenkova *et al.*, 2007, 2007a), pero su efecto inhibitor de la adipogénesis no depende de los RAR, sino que ha sido relacionado con la capacidad que muestran ambos compuestos de suprimir respuestas mediadas por PPAR $\gamma$  y RXR, posiblemente después de unirse físicamente a estos receptores (Ziouzenkova *et al.*, 2007, 2007a).

Mientras que dosis relativamente altas de ATRA (0.1-10  $\mu$ M) suprimen la adipogénesis, el ATRA induce el efecto contrario, es decir, promueve la adipogénesis, cuando se aplica en dosis bajas (1 pM a 10 nM) (Safonova *et al.*, 1994). Es más, el compromiso de las células madre al linaje adipocitario requiere su exposición a ATRA durante un periodo determinado (Bost *et al.*, 2002; Dani *et al.*, 1997), y la producción endógena de ATRA parece ser necesaria para una adipogénesis eficiente en las líneas celulares de fibroblastos 3T3-L1 (Reichert *et al.*, 2011). Cabe, por tanto, la posibilidad de que el exceso de adiposidad que caracteriza a los animales alimentados de manera crónica con dietas deficientes en vitamina A (Kawada, Kamei y Sugimoto, 1996; Ribot *et al.*, 2001) esté relacionado con los efectos proadipogénicos de las dosis bajas de ATRA. Estudios realizados en ratones *knockout* carentes de la lipasa sensible a hormonas (HSL) apoyan la idea de que el ATRA puede tener *in vivo* efectos proadipogénicos o antiadipogénicos dependiendo de la dosis. La HSL hidroliza ésteres de retinilo, además de triacilgliceroles (Strom *et al.*, 2009). Los ratones sin HSL presentan niveles reducidos de ATRA en el TAB y una adipogénesis defectuosa en respuesta a una dieta rica en grasas; la suplementación de dicha dieta con ATRA restauró parcialmente el TAB en los mutantes faltos de HSL, en los que habría servido para aumentar los niveles de ATRA hasta niveles normales, y en cambio redujo el TAB en los animales control de genotipo salvaje (Strom *et al.*, 2009).

Factores nutricionales en estadios tempranos del desarrollo vital pueden afectar la susceptibilidad a padecer alteraciones y enfermedades metabólicas como la obesidad más adelante, en la vida adulta (Pico y Palou, 2013). En este contexto, hay resultados que sugieren que el efecto último de los suplementos de vitamina A sobre la adiposidad corporal puede ser dependiente de la etapa del desarrollo en que se ingieren. Por ejemplo, la administración por vía oral de una dosis diaria moderada de vitamina A (~x3 veces la recibida a través de la leche materna) a crías de rata durante el periodo de lactancia —un periodo crítico en el desarrollo del TAB en la rata (Cryer y Jones, 1979)— no afectó el peso ni la adiposidad en el momento del destete, pero favoreció el desarrollo de adipocitos inmaduros, más pequeños y con una menor expresión de PPAR $\gamma$  y mayor de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), este último un marcador clásico del estado proliferativo (Granados *et al.*, 2013). Estos cambios estarían de acuerdo con la conocida actividad antiadipogénica de los retinoides pero, aparentemente, favorecieron el componente hiperplásico de la expansión del tejido adiposo bajo un estímulo obesogénico, ya que los animales tratados con vitamina A ganaron el mismo peso corporal pero más adiposidad que sus controles, especialmente grasa subcutánea, cuando, con posterioridad al destete, fueron alimentados con una dieta rica en grasas, en paralelo con un mayor incremento del contenido de ADN en su TAB (Granados *et al.*, 2013). Un trabajo anterior ya reveló un efecto sinérgico de un exceso moderado (x4 veces) de vitamina A añadido a una dieta rica en grasas sobre el desarrollo del TAB en ratas jóvenes (tres semanas de edad), que pudo relacionarse con una competencia proliferativa aumentada de las células precursoras aisladas de los depósitos grasos (Redonnet *et al.*, 2008). En conjunto, estos estudios sugieren que un exceso de ingesta de vitamina A en forma de retinol o éster de retinilo en

etapas tempranas de la vida, incluso si es moderado, puede tener un efecto pro-obesogénico, posiblemente al afectar el desarrollo del TAB y en particular el estatus proliferativo de los adipocitos. Curiosamente, a diferencia de la suplementación con vitamina A preformada, el mismo exceso de ingesta de vitamina A (x3) en forma de BC no tuvo efecto sobre el desarrollo del TAB en las ratas lactantes, a pesar de que éstas absorbieron y metabolizaron parcialmente el BC administrado, como lo prueba la acumulación de BC en suero e hígado y la activación de respuestas transcripcionales al ATRA en intestino e hígado (Musinovic *et al.*, 2014). Este trabajo establece las ratas lactantes como un nuevo modelo para los estudios sobre la acción del BC, y sugiere que los suplementos de BC pueden servir para reponer las reservas de retinol hepático en bebés-niños, evitando eventuales efectos no deseados de la suplementación temprana con vitamina A preformada sobre la susceptibilidad a la obesidad (Musinovic *et al.*, 2014).

Otros carotenoides además del BC podrían afectar la adipogénesis. La exposición a  $\beta$ -criptoxantina, un carotenoide provitamínico, suprimió la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 en vías de diferenciación a través de la activación del RAR, del que la  $\beta$ -criptoxantina sería un ligando agonista, y subsiguiente represión del PPAR $\gamma$  (Shirakura *et al.*, 2011), aunque existen resultados contradictorios (Okada *et al.*, 2008). La astaxantina, un carotenoide no provitamina A, puede actuar como un ligando antagonista del PPAR $\gamma$  y se ha descrito que inhibe la adipogénesis de células 3T3-L1 inducida por rosiglitazona (un ligando activador de PPAR $\gamma$ ) (Inoue *et al.*, 2012). Para la fucoxantina y su metabolito, el fucoxantínol, se han descrito efectos sobre la adipogénesis de células 3T3-L1 complejos: supresión por represión del PPAR $\gamma$  cuando se aplican en fases intermedias y tardías del proceso adipogénico (Maeda *et al.*, 2006) y estimulación cuando se

aplican en una etapa temprana del mismo (coincidiendo con la expansión clonal de los preadipocitos) (Kang *et al.*, 2011). Más recientemente, se ha descrito que Xanthigen™, un producto rico en fucoxantina, inhibe la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a través de la represión de PPAR $\gamma$  y C/EBP, la inducción de la Sirtuina 1, la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y la modulación de vías FoxO (Lai *et al.*, 2012). En un estudio en el que se ensayó la capacidad de diversos carotenoides de suprimir la adipogénesis de fibroblastos murinos 3T3-L1, sólo la neoxantina, además de la fucoxantina y el fucoxantínol, fue efectiva; otros carotenoides ensayados (luteína, violaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno 5,6-epóxido, capsorrubina, tres carotenoides con un grupo ceto y dos carotenoides epoxi-hidroxi) no mostraron efectos (Okada *et al.*, 2008). A partir de estos resultados, se ha sugerido que el efecto supresor de la adipogénesis puede requerir un enlace aleno y un sustituyente hidroxilo adicional en el grupo lateral, ya que estas son características compartidas por la neoxantina y el fucoxantínol. Por último, el licopeno y su metabolito, el ácido apo-10'-licopenoico, no son efectivos como moduladores de la adipogénesis, a pesar de que el ácido apo-10'-licopenoico ha sido descrito como un activador del RAR capaz de afectar la expresión de algunos genes diana de RAR en los adipocitos (Gouranton *et al.*, 2011; Landrier *et al.*, 2012).

## CAROTENOIDES Y DERIVADOS COMO MODULADORES DEL PERFIL METABÓLICO DEL TEJIDO ADIPOSO

### Efecto sobre la capacidad de almacenamiento de grasa

Las pruebas acumuladas vinculan el BC y sus metabolitos con el control de la capacidad de almacenamiento de grasa en los adipocitos maduros a través de la supresión del PPAR $\gamma$ . Este receptor nuclear es necesario para el mantenimiento del fenotipo del adipocito maduro (Tamori *et al.*, 2002) y para la hipertrofia de los adipocitos inducida por una dieta rica en grasa (Kubota *et al.*, 1999), aparte de ser esencial para la diferenciación adiposa. Genes diana de PPAR $\gamma$  codifican para proteínas lipogénicas que facilitan la captación y activación de los ácidos grasos para la síntesis de triacilgliceroles y la formación y el mantenimiento de las gotas lipídicas (Dalen *et al.*, 2004). La reducción de la actividad del PPAR $\gamma$  en los adipocitos resulta en la movilización de las reservas grasas de estas células (Tamori *et al.*, 2002).

En ratones, los cambios de la adiposidad corporal dependientes del estatus de vitamina A se correlacionan con cambios en los niveles de expresión del PPAR $\gamma$  en TAB: ambos parámetros, adiposidad y niveles adiposos de PPAR $\gamma$ , se reducen después del tratamiento con ATRA y aumentan después de una alimentación crónica con una dieta deficiente en vitamina A (Ribot *et al.*, 2001). En adipocitos 3T3-L1 maduros, la exposición a BC (2  $\mu$ M) reduce la expresión de PPAR $\gamma$  y genes diana de PPAR $\gamma$  y el contenido de lípidos, al tiempo que da lugar a un incremento en la producción de ATRA; estos efectos del BC son dependientes de BCO1 y RAR, puesto que resultaron contrarrestados por un inhibidor de la

BCO1 y por un antagonista de los RAR (Lobo *et al.*, 2010). De manera similar, la reducción de la adiposidad corporal después de la suplementación dietética con BC descrita en ratones está ligada a la represión del PPAR $\gamma$  y sus genes diana en el TAB, como lo indican distintos tipos de análisis incluido el transcriptómico, y es dependiente de BCO1, ya que no ocurre en ratones BCO1<sup>-/-</sup>, carentes de esta enzima (Amengual *et al.*, 2011; Van Helden *et al.*, 2011). Es importante destacar que el efecto del BC de reducir el contenido en lípidos en los adipocitos 3T3-L1 no fue reproducido cuando éstos se incubaron con vitamina A (retinol), lo que sugiere que el BC puede ser un precursor clave para la producción de retinoides en los adipocitos (Lobo *et al.*, 2010). Además, en el estudio *in vivo* pudo constatar, mediante análisis por HPLC, la acumulación de BC en TAB (y suero) de todos los animales suplementados con BC (a mayor nivel en los ratones BCO1<sup>-/-</sup>, pero también en los BCO1<sup>+/+</sup>) (Amengual *et al.*, 2011). En conjunto, pues, estos resultados apoyan la idea de que la producción local de retinoides a partir de BC en los adipocitos, dependiente de BCO1, contribuiría a la regulación de la capacidad de almacenamiento de grasa (figura 2). Curiosamente, mientras que los productos de la BCO1 reprimen al PPAR $\gamma$ , el propio gen para la BCO1 es un gen diana del PPAR $\gamma$  (Boulanger *et al.*, 2003) que es inducido durante la diferenciación de los adipocitos (Lobo *et al.*, 2010a), lo que sugiere la existencia de un bucle de realimentación negativa para mantener bajo control el PPAR $\gamma$  en los adipocitos. RAR activado por retinoides podría inhibir el PPAR $\gamma$  en los adipocitos maduros por mecanismos similares a los que operan en la inhibición de la adipogénesis por ATRA.

Los adipocitos blancos son células especializadas en el almacenamiento del exceso de energía alimentaria en forma de triglicéridos. Los agentes que reprimen la adipogénesis

o reducen la capacidad de almacenamiento de grasa en los adipocitos blancos maduros no son necesariamente beneficiosos; por el contrario, podrían ser perjudiciales, especialmente en condiciones de equilibrio energético positivo, porque pueden favorecer la deposición de grasa ectópica en tejidos no adiposos y fenómenos de lipotoxicidad asociados a ella. No es este el caso para varios carotenoides y metabolitos derivados con acción anti-adiposidad que, además de reprimir al PPAR $\gamma$ , son capaces de promover la oxidación de lípidos en los adipocitos blancos y otros tejidos.

### Efecto sobre el metabolismo oxidativo y la capacidad termogénica

Los mamíferos poseemos diferentes tipos de adipocitos, con diferencias importantes entre ellos en relación con el metabolismo energético. Los adipocitos marrones de los depósitos de tejido adiposo marrón (TAM) típicos son células ricas en mitocondrias, con una alta capacidad oxidativa, especializadas en la oxidación ineficiente regulada de combustibles acoplada a la producción de calor (termogénesis adaptativa) mediada por la proteína desacoplante 1 (UCP1); ésta es una proteína de la membrana mitocondrial interna que constituye un paso para los protones alternativo a la ATP sintasa, de modo que su actividad conduce a la disipación como calor del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria (Cannon y Nedergaard, 2004). Los adipocitos blancos de los depósitos de TAB son pobres en mitocondrias, tienen una baja capacidad oxidativa, no expresan la UCP1 y están especializados en el almacenamiento y liberación de energía de acuerdo con las necesidades biológicas. Un tercer tipo de adipocitos son los llamados *brite* (del inglés, marrón-en-blanco) o *beige*: estos son parecidos a los marrones, expresan UCP1 y pueden ser inducidos en los depósitos de

TAB en respuesta al frío y a toda una variedad de factores nutricionales y farmacológicos, en un proceso conocido como “marronización” (*browning*) o remodelación de TAB a TAM (Bonet *et al.*, 2013; Giralt y Villarroya, 2013).

Hasta hace poco, se pensaba que el TAM sólo está presente en los humanos recién nacidos, se asumía que este tejido juega un papel insignificante en el ser humano adulto. No obstante, el interés en este tejido ha aumentado desde que se ha demostrado que hay TAM activo en los humanos adultos y que la actividad del TAM en humanos es mayor cuanto menor es el IMC y la adiposidad corporal (Saito, 2013). La estimulación de la actividad del TAM y la inducción de los adipocitos *beige* en el TAB constituyen dos estrategias atractivas para contrarrestar la obesidad (Palou y Bonet, 2013; Palou *et al.*, 2013). Además, aunque la contribución del TAB al metabolismo energético se considere habitualmente insignificante, la estimulación farmacológica y por nutrientes de la capacidad oxidativa mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos en TAB no ligada a la inducción de UCP1 está demostrada, y también puede contribuir a un fenotipo delgado (Flachs *et al.*, 2013). Los carotenoides y los retinoides impactan la función termogénica del TAM, y modulan la capacidad oxidativa, la expresión de genes mitocondriales y la “marronización” (*browning*) del TAB.

La interacción de carotenoides y retinoides con la función del TAM es conocida desde hace tiempo. El BC y otros carotenoides provitamina A pueden inducir la expresión de UCP1 en adipocitos marrones en cultivo primario (Serra *et al.*, 1999), quizá secundariamente a su conversión en ATRA, que es una potente señal para la transcripción del gen de la UCP1 en adipocitos marrones (Álvarez *et al.*, 1995; Del Mar Gonzalez-Barroso *et al.*, 2000; Puigserver *et al.*, 1996). La capacidad de respuesta a retinoides del gen de la UCP1 se explica por

la presencia en su promotor de un elemento de respuesta (no canónico) al ácido retinoico y un elemento de respuesta a PPAR (Larose *et al.*, 1996; Rabelo *et al.*, 1996; Sears *et al.*, 1996), y está mediada por los RAR y los RXR (Álvarez *et al.*, 2000) y también por la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38 MAPK) (Teruel *et al.*, 2003). El tratamiento con ATRA en roedores produce la activación de la termogénesis en el TAM con inducción de la UCP1, acompañando una reducción del peso y la grasa corporal (Bonet *et al.*, 2000; Kumar y Scarpace, 1998; Puigserver *et al.*, 1996). Además, estudios nutricionales en roedores mostraron que la capacidad termogénica del TAM es dependiente del estatus en vitamina A, de manera que se reduce después de una alimentación con una dieta deficiente en vitamina A y aumenta después de una suplementación dietética con vitamina A (en forma de éster de retinilo) (Bonet *et al.*, 2000; Felipe *et al.*, 2003; Kumar, Sunvold y Scarpace, 1999). Hay, por tanto, pruebas del papel de la vitamina A como regulador fisiológico del sistema termogénico del TAM.

Más recientemente se ha demostrado que los retinoides pueden estimular la adquisición de características del adipocito marrón en los adipocitos blancos y la “marronización” (*browning*) del TAB. Trabajos pioneros de nuestro grupo demostraron esta actividad para el ATRA *in vivo* en ratones (Mercader *et al.*, 2006) y en adipocitos blancos murinos 3T3-L1 (Mercader *et al.*, 2007). En el modelo celular, la exposición a ATRA conllevó un aumento de las tasas basales de lipólisis y de oxidación de ácidos grasos, cambios en la expresión génica relacionados con la movilización, la oxidación y el *turnover* de ácidos grasos, y la reducción del contenido de lípidos (Mercader *et al.*, 2007). Aunque no en adipocitos murinos 3T3-L1 (Mercader, Palou y Bonet, 2010; Murholm *et al.*, 2013) ni en líneas celulares ni cultivos primarios de adipocitos blancos humanos (Murholm *et al.*, 2013), en algunos modelos

murinos de adipocitos blancos —en concreto, adipocitos derivados de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF del inglés) y adipocitos C3H10T1/2 (Mercader, Palou y Bonet, 2010; Murholm *et al.*, 2013)— el ATRA se ha demostrado eficaz en la inducción de la UCP1, por mecanismos dependientes de p38 MAPK (Mercader, Palou y Bonet, 2010) y de RAR (Murholm *et al.*, 2013) e independientes del coactivador del PPAR $\gamma$  (PGC) 1 $\alpha$  (Mercader, Palou y Bonet, 2010; Murholm *et al.*, 2013). *In vivo*, el tratamiento con ATRA en ratones dio lugar a un aumento de la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial, la capacidad termogénica y la oxidación de ácidos grasos en el TAB —incluyendo la inducción de la UCP1 en el depósito subcutáneo (inguinal)— y al incremento de la presencia en el TAB de adipocitos con distribución multilocular de la grasa intracelular (Mercader *et al.*, 2006), que también es una característica propia de los adipocitos marrones. Se han descrito efectos comparables en hurones, en los que el tratamiento agudo con ATRA redujo la adiposidad y aumentó la multilocularidad y el contenido en UCP1 en el depósito adiposo retroperitoneal (Sánchez *et al.*, 2009).

El precursor directo del ATRA, el retinaldehído, también se ha descrito como un agente promotor de “marronización” (*browning*) del TAB. En un trabajo en el que se compararon ATRA y retinaldehído, ambos retinoides indujeron la expresión de la UCP1 en adipocitos derivados de MEF, pero las dosis efectivas de retinaldehído fueron ~ 10 veces mayores que las de ATRA (10  $\mu$ M vs 1  $\mu$ M), como se esperaría para un efecto después de su conversión en ATRA (Mercader, Palou y Bonet, 2010). Más recientemente, el retinaldehído *per se* ha sido propuesto como agente “marronizador” sobre la base de resultados obtenidos en el modelo de ratones Aldh1a1<sup>-/-</sup>. En estos animales, la deficiencia de ALDH1A1 mejora la termogénesis inducida por el frío e induce un

programa transcripcional típico de TAM en el TAB visceral, sin cambios en el TAM (Kiefer *et al.*, 2012). Previamente ya se había demostrado que los ratones *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> resistían el desarrollo de obesidad dietética debido a un hipermetabolismo (Ziouzenkova *et al.*, 2007). Además, la eliminación selectiva de *Aldh1a1* en el TAB de ratones adultos obesos desencadena el *browning* del tejido, al tiempo que limita el aumento de peso y mejora el control sobre la homeostasis de la glucosa (Kiefer *et al.*, 2012). El efecto “marronizador” de la deficiencia de ALDH1A1 se ha atribuido al aumento concomitante de su sustrato, el retinaldehído, en el TAB de los ratones *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> (Ziouzenkova *et al.*, 2007), ya que hay resultados que indican que el retinaldehído puede inducir la expresión de UCP1 en adipocitos blancos en cultivo independientemente de su conversión en ATRA, vía activación directa del RAR (Kiefer *et al.*, 2012).

La similitud entre el fenotipo de los ratones tratados con ATRA y el de los ratones *Aldh1a1*<sup>-/-</sup>, deficientes en la principal enzima generadora de ATRA, llama la atención y puede parecer incongruente (Yasmeen *et al.*, 2012). Son pertinentes algunas consideraciones al respecto. En primer lugar, no se puede descartar que al fenotipo de los ratones *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> contribuyan cambios en los niveles de metabolitos distintos del retinaldehído (Kiefer *et al.*, 2012), dado que la ALDH1A1 puede usar otros sustratos (Collard *et al.*, 2007). En segundo lugar, no hay constancia de que los niveles aumentados de retinaldehído observados en el TAB de ratones *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> se correspondan con niveles reducidos de ATRA, ya que estos últimos no fueron reportados en los estudios de Ziouzenkova *et al.* (2007) y Kiefer *et al.* (2012). Y esta correspondencia no puede darse por sentada porque, además de que en los adipocitos hay enzimas alternativas a la ALDH1A1 para la generación de ATRA (Reichert *et al.*, 2011), es de esperar que

enzimas implicadas en la degradación de ATRA tales como CYP26A1 estén inhibidas en condiciones de deficiencia de ALDH1A1 (Loudig *et al.*, 2000). Sin perjuicio de otras posibles explicaciones (Yasmeen *et al.*, 2012), cabe la posibilidad de que ATRA y retinaldehído tengan efectos redundantes sobre el metabolismo del tejido adiposo, probablemente debido a la capacidad compartida de ambos retinoides de activar los RAR.

Mientras que los efectos “marronizadores” de los retinoides han sido repetidamente demostrados (en adipocitos blancos murinos en cultivo, roedores y hurones; véase más arriba), no hay evidencia al respecto para el BC. En adipocitos murinos 3T3-L1 expuestos a BC, el ATRA derivado de éste reduce el contenido de lípidos y la actividad del PPAR $\gamma$  (Lobo *et al.*, 2010), pero en este trabajo no se investigaron posibles efectos sobre genes relacionados con el *browning*. En ratones suplementados con BC, la conversión de éste en retinoides conlleva una reducción de la adiposidad corporal y de la actividad del PPAR $\gamma$  en TAB, pero ni el análisis transcriptómico ni el examen morfológico del TAB inguinal de los animales suplementados revelaron indicios de *browning* (Amengual *et al.*, 2011). Es más, en hurones, una ingesta crónica de BC (3.2 mg/kg de peso corporal/día, durante seis meses) tuvo efectos opuestos al tratamiento agudo con ATRA, de manera que condujo a una disminución de la presencia de adipocitos multiloculares y de la expresión de UCP1 en el depósito graso retroperitoneal (Sánchez *et al.*, 2009). Este efecto inhibitorio no se puede explicar únicamente sobre la base de una conversión ineficiente del BC en vitamina A en el hurón (Lederman *et al.*, 1998), que habría dado lugar a un efecto neutro. Las diferencias en el potencial de los retinoides y el BC como agentes de *browning* y los mecanismos implicados merecen ser objeto de más investigación.

El carotenoide alénico fucoxantina se ha descrito como un agente “marronizador”. Estudios en roedores muestran que la suplementación con fucoxantina o un extracto de algas marinas rico en fucoxantina puede contrarrestar el desarrollo de obesidad dietética y reducir la grasa abdominal en animales obesos mediante mecanismos que incluyen la inducción de UCP1 y de genes relacionados con el catabolismo de lípidos en el TAB abdominal, y el incremento del metabolismo oxidativo y la producción de calor (Hu *et al.*, 2012; Jeon *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2005, 2007; Okada *et al.*, 2011). Es de destacar que la ingesta de fucoxantina promueve el *browning* del TAB a dosis a las que no afecta la expresión de UCP1 en el TAM, lo que sugiere un efecto selectivo en el TAB (Maeda *et al.*, 2005). Las dianas moleculares con las que interactúan la fucoxantina y sus metabolitos en los adipocitos no se conocen bien, pero incluirían un incremento de la sensibilidad de los adipocitos a la estimulación nerviosa simpática (que favorece la activación de la termogénesis) (Maeda *et al.*, 2009) y la activación de la AMPK (Kang *et al.*, 2012). Sin embargo, la fucoxantina (hasta 10  $\mu$ M) no afectó la lipólisis basal en adipocitos 3T3-L1 maduros (Kang *et al.*, 2011). En humanos, la reducción del peso y la adiposidad corporal ligada al consumo de fucoxantina o Xanthigen™ (que contiene fucoxantina entre sus principios activos) ha sido relacionada con un aumento del gasto energético en reposo, lo que podría estar de acuerdo con la inducción de *browning* demostrada en los roedores tratados con fucoxantina (Abidov *et al.*, 2010).

## LOS CAROTENOIDES COMO MODULADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TEJIDO ADIPOSO

El estrés oxidativo en el TAB por acumulación de ROS es un importante componente patogénico del síndrome metabólico asociado a la obesidad (Furukawa *et al.*, 2004; Le Lay *et al.*, 2014), y está estrechamente vinculado a la inflamación del tejido adiposo y la secreción por éste de mediadores inflamatorios sistémicos, ya que las ROS activan vías inflamatorias (véase más adelante). Para diversos carotenoides se ha propuesto una actividad antioxidante que se explicaría por su capacidad de neutralizar directamente especies reactivas (ROS) o su capacidad de interactuar con componentes de la vía del Nrf2, para favorecer la translocación al núcleo de este factor de transcripción, con la subsiguiente inducción al nivel transcripcional de una colección de enzimas antioxidantes y citoprotectoras (Kaulmann y Bohn, 2014). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides han sido demostradas en diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo los adipocitos y el tejido adiposo. Carotenoides como la crocetina (Xi *et al.*, 2007) y el BC (Kameji *et al.*, 2010) se ha visto que pueden reducir la producción de ROS en adipocitos en cultivo expuestos a agentes estresantes, como el palmitato o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). En ratones alimentados con una dieta rica en grasa, el tratamiento con astaxantina (6 mg/kg de peso corporal/día) contrarrestó el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina y redujo los niveles de lípidos y los marcadores de estrés oxidativo en TAB y músculo esquelético (Arunkumar *et al.*, 2012). En otro estudio en ratones alimentados con una dieta rica en grasa, el tratamiento con fucoxantina (0.4-0.6%) redujo la ganancia de peso y suprimió la producción de malealdehído (un indicador de estrés oxidativo) y la hipertrofia de los adipocitos en la glándula mamaria (este

trabajo se centró en este tejido, y no en depósitos clásicos de TAB) (Tan y Hou, 2014).

Es conocido que los carotenoides pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes en función de su concentración en las células, el ambiente oxidativo celular y otros factores (Fuster *et al.*, 2008; Palozza, 1998; Rodríguez *et al.*, 2005; Van Helden *et al.*, 2009). Por ejemplo, productos de degradación de los carotenoides, incluyendo ciertos aldehídos altamente reactivos (como el retinaldehído) y epóxidos formados en el transcurso de la acción antioxidante, aumentan el estrés oxidativo y alteran la función respiratoria en mitocondrias de hígado de rata (Siems *et al.*, 2005). Asimismo, estudios en el modelo de ratones deficientes en BCO2 indican que los carotenoides en exceso, si no son detoxificados adecuadamente por la actividad de la BCO2, se acumulan en las mitocondrias e inducen estrés oxidativo que conduce a la disfunción mitocondrial (Amengual *et al.*, 2011a) y la activación de la vía apoptótica intrínseca (Lobo *et al.*, 2012). Estos estudios se han centrado en hígado y células hepáticas. Hasta donde sabemos, no se ha estudiado si un exceso de carotenoides o sus metabolitos puede contribuir al estrés oxidativo en el tejido adiposo. No obstante, en preadipocitos humanos inmortalizados (Chub-S7) la exposición a BC (10-30  $\mu$ M) resultó en reducciones del potencial de membrana mitocondrial, la respiración mitocondrial y el contenido celular de ATP, todo ello indicativo de una función mitocondrial alterada (Sliwa *et al.*, 2012). Lo más probable es que, como en otros tipos celulares y tejidos, en los adipocitos-tejido adiposo los carotenoides puedan proteger frente al estrés oxidativo o contribuir al mismo, dependiendo de la dosis y de factores celulares-tisulares.

## CAROTENOIDES Y DERIVADOS COMO MODULADORES DEL PERFIL SECRETOR E INFLAMATORIO DEL TEJIDO ADIPOSO

Además de servir como almacén de energía, el TAB tiene una segunda función muy importante, la endocrina. Mediante la secreción de una colección de moléculas señal, el TAB participa en el control del equilibrio energético, la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a la insulina, la respuesta inflamatoria y la hemostasia vascular, entre otros procesos. Las moléculas señal de origen adiposo incluyen numerosas proteínas (adipoquinas y citoquinas) que son producidas por los adipocitos y por células de la fracción estromal-vascular, a menudo de manera coordinada. Las dos funciones del TAB están estrechamente relacionadas entre sí, de modo que la producción de muchos de los productos de secreción del TAB, incluyendo factores relacionados con la inflamación, está alterada en la obesidad. De hecho, la obesidad es considerada hoy día un estado de inflamación crónica de bajo grado, del propio TAB y sistémica, que conecta la obesidad visceral con muchas de las alteraciones clínicas propias del síndrome metabólico (Wellen y Hotamisligil, 2005; Wisse, 2004). Tanto los adipocitos hipertrofiados como los macrófagos que infiltran el TAB en condiciones de obesidad son una fuente de mediadores inflamatorios.

Estudios transversales y prospectivos muestran de manera consistente que una mayor ingesta y estatus en carotenoides se asocia a menores niveles de inflamación de bajo grado en relación con el sobrepeso, la obesidad y el síndrome metabólico (Calder *et al.*, 2011). En diferentes contextos y tejidos-tipos celulares se han demostrado propiedades antiinflamatorias del BC y de carotenoides no provitamina A

como el licopeno, la astaxantina y la fucoxantina, entre otros, que tendrían su origen en la capacidad de estos compuestos de reducir el estrés oxidativo y potenciar la activación de Nrf2, por un lado, y de suprimir la activación del NF- $\kappa$ B y así la producción de citoquinas proinflamatorias controlada por este factor de transcripción, por otro (Kaulmann y Bohn, 2014). En general, los carotenoides y sus derivados pueden afectar el perfil secretor del TAB: *a*) interaccionando activamente con las vías del Nrf2 y el NF- $\kappa$ B en adipocitos y macrófagos residentes; *b*) controlando la expresión de adipoquinas vía efectos sobre otros factores de transcripción, y *c*) de una manera pasiva, secundaria a su efecto reductor de la carga lipídica de los adipocitos y el contenido en grasa corporal.

Niveles elevados de las adipoquinas resistina (Steppan *et al.*, 2001; Stofkova), leptina (Huang *et al.*, 2004; Stofkova, 2009) y RBP4 (Esteve, Ricart y Fernandez-Real, 2009; Yang *et al.*, 2005) han sido asociados a inflamación y resistencia a la insulina en humanos y roedores. Nuestro grupo, entre otros, ha mostrado que el tratamiento con ATRA suprime la producción adiposa de leptina (Bonet *et al.*, 2000; Hollung *et al.*, 2004; Kumar y Scarpace, 1998; Menéndez *et al.*, 2001), resistina (Felipe *et al.*, 2004) y RBP4 (Mercader *et al.*, 2008) tanto *in vivo* como en adipocitos en cultivo, mediante mecanismos transcripcionales que implican a RAR y RXR (Felipe *et al.*, 2004, 2005; Mercader *et al.*, 2008). En el caso de la leptina, la regulación a la baja por ATRA se ha demostrado también en humanos (Hollung *et al.*, 2004; Menéndez *et al.*, 2001). La reducción de estas adipoquinas se acompaña de una mejora de la sensibilidad a la insulina en los ratones tratados con ATRA (Felipe *et al.*, 2004; Mercader *et al.*, 2008). Curiosamente, la expresión hepática de RBP4 no se ve afectada por el tratamiento con ATRA, lo que apunta a un efecto específico en los adipocitos (Mercader *et al.*, 2008): esta especificidad es de interés, ya

que es la RBP4 de origen adipocitario la que se ha relacionado con efectos metabólicos adversos (si bien no se ha descrito, que sepamos, diferencia física alguna entre la RBP4 hepática y la adiposa). De manera similar al tratamiento con ATRA, la suplementación dietética con vitamina A reduce la expresión adiposa y niveles circulantes de leptina y resistina en roedores de una manera que no es proporcional, sino que excede, a la reducción de la adiposidad corporal (Felipe *et al.*, 2004, 2005; Kumar, Sunvold y Scarpace, 1999). Ratones alimentados con una dieta deficiente en vitamina A muestran cambios opuestos en la leptina, es decir, al alza (Bonet *et al.*, 2000). Es más, un análisis transcriptómico reveló que los genes para leptina, RBP4 y resistina están entre los 50 genes más reprimidos en el TAB subcutáneo de ratones suplementados con BC, y estos cambios son dependientes de la actividad de provitamina A del BC, ya que no ocurren en ratones suplementados con BC de genotipo BCO1<sup>-/-</sup>, deficientes en la enzima clave en la producción de vitamina A a partir de BC (Amengual *et al.*, 2011).

La adiponectina es una adipoquina cuyos niveles están reducidos en la obesidad y que tiene propiedades interesantes, anti-inflamatorias, anti-aterogénicas y de sensibilización a la acción de la insulina (Turer y Scherer, 2012). Para varios carotenoides se ha descrito un efecto estimulador de la producción de adiponectina por los adipocitos, mediante mecanismos todavía por definir. Por ejemplo, la exposición a pigmentos del pimentón, ricos en los carotenoides capsantina y capsorrubina, incrementó la producción de adiponectina en adipocitos murinos 3T3-L1 (Maeda *et al.*, 2013). La crocetina del azafrán indujo la expresión de adiponectina en adipocitos de rata *ex vivo* (Xi *et al.*, 2007). La incubación con BC (20  $\mu$ M) también indujo la expresión de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 en vías de diferenciación (Kameji *et al.*, 2010). Además,

dos estudios epidemiológicos en humanos han descrito una asociación directa independiente entre los niveles circulantes de BC y los de adiponectina, en población general (Suzuki *et al.*, 2010) y en adultos obesos no-diabéticos (Ben Amara *et al.*, 2014); para otros carotenoides analizados en estos estudios, entre ellos el licopeno, no se encontró asociación con la adiponectinemia. El efecto del BC sobre la adiponectina podría ser independiente de su actividad provitamina A, ya que la exposición a ATRA no afectó la expresión de adiponectina en adipocitos en cultivo o TAB de ratones tratados (Bonet, Ribot y Palou, resultados no publicados) e incluso se ha descrito, en ratas, una inhibición de la expresión de adiponectina en TAB tras la administración de una dosis puntual de ATRA (7.5 mg/kg, i.p.) (Zhang *et al.*, 2002).

Retinoides y carotenoides también afectan la producción adipocitaria de citoquinas pro-inflamatorias, en general modulándola a la baja. Por ejemplo, la exposición a ATRA redujo la expresión de las interleuquinas 6 y 1 en adipocitos murinos 3T3-L1 tratados con TNF $\alpha$  (Gouranton *et al.*, 2011). El licopeno y su metabolito, el ácido apo-10'-licopenoico, suprimieron la inducción de citoquinas y quimoquinas (señales atrayentes de macrófagos) en adipocitos murinos y humanos expuestos a TNF $\alpha$  (Gouranton *et al.*, 2011, 2010). Se han descrito resultados similares para el fucoxantol, que es un metabolito que aparece en el TAB tras la ingesta de fucoxantina (Hosokawa *et al.*, 2010). Se ha descrito que el licopeno, la fucoxantina y el fucoxantol atenúan la respuesta de macrófagos RAW 264.7 a agentes pro-inflamatorios como el lipopolisacárido bacteriano o el ácido palmítico (Hosokawa *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Marcotorchino *et al.*, 2012). En la misma línea, pigmentos del pimentón ricos en capsantina y capsorrubina suprimieron factores pro-inflamatorios (como interleuquina 6, TNF $\alpha$ , proteína quimioatrayente de monocitos-1

y resistina) en co-cultivos de adipocitos y macrófagos (Maeda *et al.*, 2013). Estos resultados son de interés porque en la obesidad se establece un círculo vicioso entre adipocitos y macrófagos residentes en el tejido adiposo, que podrían romper estos carotenoides. La acción anti-inflamatoria del licopeno y la fucoxantina en adipocitos y macrófagos se ha relacionado con la inhibición de la vía del NF- $\kappa$ B y de vías de proteína quinasas activadas por mitógenos (como la JNK) (Gouranton *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010).

La acción anti-inflamatoria de la fucoxantina y el licopeno ha sido demostrada también *in vivo*, en el tejido adiposo de animales obesos tratados con estos carotenoides. Ratones genéticamente obesos (KK-A $^y$ ), pero no animales delgados, alimentados con una dieta suplementada con fucoxantina (0.2%) presentaron una expresión reducida de factores pro-inflamatorios y una menor infiltración de macrófagos en TAB visceral en comparación con los no suplementados (Hosokawa *et al.*, 2010). El tratamiento con fucoxantina también redujo la expresión de factores pro-inflamatorios, la actividad mieloperoxidasa (atractor de células sanguíneas polimorfonucleadas) y la infiltración de macrófagos en glándula mamaria de ratones alimentados con una dieta rica en grasa (Tan y Hou, 2014). En ambos trabajos, la exposición a fucoxantina también redujo el peso y la adiposidad corporal, así como la hipertrofia de los adipocitos viscerales o de glándula mamaria (Hosokawa *et al.*, 2010; Tan y Hou, 2014). En lo que respecta al licopeno, un estudio reciente indica efectos anti-inflamatorios sobre el TAB obeso inflamado, aunque no sobre la adiposidad corporal (Luvizotto *et al.*, 2013). En este estudio, ratas Wistar a las que se había inducido obesidad dietética fueron tratadas con licopeno (10 mg/kg peso corporal/día) o vehículo por vía oral durante seis semanas; la suplementación no afectó el peso ni la adiposidad corporal,

pero redujo significativamente la expresión de leptina, resistina, interleuquina 6 y proteína quimioatrayente de monocitos-1 en el tejido adiposo gonadal y los niveles plasmáticos de algunas de estas proteínas (Luvizotto *et al.*, 2013).

## RESUMEN Y COMENTARIOS FINALES

La obesidad y sus comorbilidades, como el síndrome metabólico, constituyen un problema médico de primer orden en muchas sociedades. Para reducir este problema de salud y los grandes costos económicos que conlleva hacen falta estrategias preventivas y de tratamiento efectivas y satisfactorias. La deficiencia en determinados micronutrientes y otros compuestos de interés nutricional, especialmente cuando se da en el contexto de una dieta obesogénica, puede jugar un papel en el desarrollo de la obesidad (García, Long y Rosado, 2009), y aquí hemos presentado datos que indican que carotenoides y vitamina A están entre ellos.

Carotenoides y productos de conversión de los carotenoides parecen tener un papel sustancial en el control de aspectos clave de la biología del tejido adiposo, como la producción de nuevos adipocitos a partir de células precursoras (adipogénesis) y las capacidades metabólicas y secretoras de los adipocitos maduros, a través de mecanismos definidos que se van conociendo. Los resultados de estudios experimentales en animales apoyan una acción anti-obesidad y anti-inflamatoria de carotenoides y productos derivados. Es interesante destacar que algunos de estos compuestos —e.g., fucoxantina, astaxantina, y los retinoides derivados del BC, ATRA y retinaldehído— ejercen efectos supresores sobre la actividad PPAR $\gamma$  y la adipogénesis y efectos estimuladores sobre la oxidación de lípidos y la termogénesis en adipocitos

maduros y otros tipos de células. Tales compuestos podrían, por tanto, ayudar a moderar la formación de nuevos adipocitos en condiciones obesogénicas y reducir el número de adipocitos en las personas obesas, favoreciendo al mismo tiempo la disipación del exceso de energía de la dieta. Diversos estudios epidemiológicos en humanos han asociado ingestas dietéticas y niveles séricos de carotenoides elevados con una adiposidad reducida, y también se ha constatado una pobre ingesta y estatus de carotenoides en personas obesas, incluidos niños y adolescentes obesos, que precisa ser abordada. Aunque todavía son pocos los estudios de intervención en humanos específicamente diseñados para investigar el efecto de carotenoides sobre la adiposidad corporal realizados hasta ahora, los resultados de estudios pioneros al respecto son alentadores, ya que indican un efecto beneficioso de la suplementación moderada con carotenoides para limitar la acumulación de grasa, especialmente grasa abdominal y parámetros de riesgo relacionados con ella. Los resultados sugieren que los requerimientos de carotenoides pueden verse afectados por la composición corporal, aunque los niveles superior e inferior óptimos de carotenoides dietéticos para conseguir un beneficio, dependiendo de la composición corporal y otros factores interactuantes (incluyendo, por ejemplo, polimorfismos génicos), no están todavía bien establecidos y debe avanzarse en ello.

Se han descrito más de 700 carotenoides en la naturaleza, muchos de ellos (más allá de los pocos aquí reseñados) posiblemente capaces de interactuar con maquinarias moleculares y vías celulares de señalización provocando efectos potencialmente beneficiosos. Estos compuestos entrañan un gran potencial como ingredientes funcionales para hacer frente a problemas de salud, como se ha ilustrado aquí para la obesidad y sus comorbilidades. Son necesarios,

no obstante, más estudios, tanto de tipo mecanístico como de intervención en humanos, para verificar este potencial y sus diversas aplicaciones, y establecer las dosis óptimas. Al mismo tiempo, la caracterización e identificación de nuevas fuentes

de carotenoides de interés puede favorecer un desarrollo económico sostenible en regiones en vías de desarrollo con gran diversidad ecológica, a través de la explotación de fuentes de carotenoides autóctonas comestibles y cultivables.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7) bajo los contratos núm. 244995 (Proyecto BIOCLAIMS) y núm. 278373 (Proyecto DIABAT), del Gobierno Español (Ayuda AGL2012-33692), de la Fundación Ramón Areces, y del Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, CIBERobn. Los autores también agradecen a The Nemours Research Foundation y The Players Center for Child Health en el Wolfson Children's Hospital de Jacksonville, Florida (EUA), por su generoso apoyo. El grupo de la UIB es miembro de la Organización Europea de Nutrigenómica y de la red IBERCAROT (CYTED, ref.112RT0445).

## REFERENCIAS

- Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., Grachev, S. 2010. *Diabetes Obesity and Metabolism* 12: 72-81.
- Al Tanoury, Z., Piskunov, A. y Rochette-Egly, C. 2013. *Journal of Lipid Research* 54: 1761-1775.
- Alapatt, P., Guo, F., Komanetsky, S.M., Wang, S., Cai, J., Sargsyan, A., Rodríguez Díaz, E., Bacon, B.T., Aryal, P., Graham, T.E. 2013. *Journal of Biological Chemistry* 288: 1250-1265.
- Álvarez, R., De Andres, J., Yubero, P., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. 1995. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5666-5673.
- Álvarez, R., Checa, M., Brun, S., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. 2000. *Biochemical Journal* 345: 91-97.
- Amengual, J., Ribot, J., Bonet, M.L., Palou, A. 2008. *Obesity* 16: 585-591.
- Amengual, J., Ribot, J., Bonet, M.L., Palou, A. 2010. *Cellular Physiology and Biochemistry* 25: 657-666.
- Amengual, J., Gouranton, E., Van Helden, Y.G., Hessel, S., Ribot, J., Kramer, E., Kiec-Wilk, B., Razny, U., Lietz, G., Wyss, A., Dembinska-Kiec, A., Palou, A., Keijer, J., Landrier, J.F., Bonet, M.L., y von Lintig, J. 2011a. *PLoS One* 6, e20644.
- Amengual, J., Lobo, G.P., Golczak, M., Li, H.N., Klimova, T., Hoppel, C.L., Wyss, A., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2011a. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 25: 948-959.
- Amengual, J., Petrov, P., Bonet, M.L., Ribot, J., y Palou, A. 2012. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44: 2019-2027.
- Amengual, J., Widjaja-Adhi, M.A., Rodríguez-Santiago, S., Hessel, S., Golczak, M., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2013. *Journal of Biological Chemistry* 288: 34081-34096.
- Andersen, L.F., Jacobs, D.R. Jr., Gross, M.D., Schreiner, P.J., Dale Williams, O., Lee, D.H. 2006. *British Journal of Nutrition* 95: 358-365.
- Aranda, A. y Pascual, A. 2001. *Physiological Reviews* 81: 1269-1304.
- Arner, P. y Spalding, K.L. 2010. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 101-104.
- Arunkumar, E., Bhuvanewari, S. y Anuradha, C.V. 2012. *Food and Function* 3: 120-126.
- Bairras, C., Menard, L., Redonnet, A., Ferrand, C., Delage, B., Noel-Suberville, C., Atgie, C., Higuieret, P. 2005. *Journal of Physiology and Biochemistry* 61: 353-361.
- Bastien, J. y Rochette-Egly, C. 2004. *Gene* 328: 1-16.

## REFERENCIAS

- Bays, H.E. 2011. *Journal of the American College of Cardiology* 57: 2461-2473.
- Beck, J., Ferrucci, L., Sun, K., Fried, L.P., Varadhan, R., Walston, J., Guralnik, J.M., Semba, R.D. 2008. *Nutrition* 24: 964-968.
- Ben Amara, N., Tourniaire, F., Maraninchi, M., Attia, N., Amiot-Carlin, M.J., Raccach, D., Valero, R., Landrier, J.F., Darmon, P. 2014. *European Journal of Nutrition* 254: 447-454.
- Berry, D.C. y Noy, N. 2009. *Molecular and Cellular Biology* 29: 3286-3296.
- Berry, D.C., Jin, H., Majumdar, A., Noy, N. 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108: 4340-4345.
- Berry, D.C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C.M., Noy, N. 2012. *Diabetes* 61: 1112-1121.
- Berry, D.C., Jacobs, H., Marwarha, G., Gely-Pernot, A., O'Byrne, S.M., DeSantis, D., Klopfenstein, M., Feret, B., Dennefeld, C., Blaner, W.S., Croniger, C.M., Mark, M., Noy, N., Ghyselinck, N.B. 2013. *Journal of Biological Chemistry* 288: 24528-24539.
- Beydoun, M.A., Shroff, M.R., Chen, X., Beydoun, H.A., Wang, Y., Zonderman, A.B. 2011. *Journal of Nutrition* 141: 903-913.
- Beydoun, M.A., Canas, J.A., Beydoun, H.A., Chen, X., Shroff, M.R., Zonderman, A.B. 2012. *Journal of Nutrition* 142: 1693-1704.
- Blomhoff, R. y Blomhoff, H.K. 2006. *Journal of Neurobiology* 66: 606-630.
- Bonet, M.L., Oliver, J., Pico, C., Felipe, F., Ribot, J., Cinti, S., Palou, A. 2000. *Journal of Endocrinology* 166: 511-517.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A. 2003. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 1311-1321.
- Bonet, M.L., Ribot, J. y Palou, A. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821: 177-189.
- Bonet, M.L., Oliver, P. y Palou, A. 2013. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831: 969-985.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y., Binetruy, B. 2002. *Biochemical Journal* 361: 621-627.
- Botella-Carretero, J.I., Balsa, J.A., Vazquez, C., Peromingo, R., Diaz-Enriquez, M., Escobar-Morreale, H.F. 2010. *Obesity Surgery* 20: 69-76.
- Boulanger, A., McLemore, P., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Yu, S.S., Gentleman, S., Redmond, T.M. 2003. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 17: 1304-1306.

## REFERENCIAS

- Brady, W.E., Mares-Perlman, J.A., Bowen, P., Stacewicz-Sapuntzakis, M. 1996. *Journal of Nutrition* 126: 129-137.
- Breitman, T.R. y Takahashi, N. 1996. *Biochemical Society Transactions* 24: 723-727.
- Brun, P.J., Yang, K.J., Lee, S.A., Yuen, J.J., Blaner, W.S. 2013. *Biofactors* 39: 151-163.
- Burrows, T.L., Warren, J.M., Colyvas, K., Garg, M.L., Collins, C.E. 2009. *Obesity* 17: 162-168.
- Calder, P.C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., Esposito, K., Jonsson, L.S., Kolb, H., Lansink, M., Marcos, A., Margioris, A., Matusheski, N., Nordmann, H., O'Brien, J., Pugliese, G., Rizkalla, S., Schalkwijk, C., Tuomilehto, J., Wärnberg, J., Watzl, B., Winklhofer-Roob, B.M. 2011. *British Journal of Nutrition* 106: S1-S78.
- Canas, J.A., Damaso, L., Altomare, A., Killen, K., Hossain, J., Balagopal, P.B. 2012. *Journal of Pediatrics* 161: 58-64.
- Canas, J., Lochrie, A., Galena McGowan, A., Schettino, C., Hossain, J., Balagopal, P. 2014. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 28: abstract 645-646.
- Cannon, B. y Nedergaard, J. 2004. *Physiological Reviews* 84: 277-359.
- Cano, M.P. y De Ancos, B. 1994. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2737-2742.
- Collard, F., Vertommen, D., Fortpied, J., Duyster, G., Van Schaftingen, E. 2007. *Biochimie* 89: 369-373.
- Cryer, A. y Jones, H.M. 1979. *Biochemical Journal* 178: 711-724.
- Chawla, A y Lazar, M.A. 1994. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 1786-1790.
- Chung, H.Y., Ferreira, A.L., Epstein, S., Paiva, S.A., Castaneda-Sceppa, C., Johnson, E.J. 2009. *American Journal of Clinical Nutrition* 90: 533-539.
- Dalen, K.T., Schoonjans, K., Ulven, S.M., Weedon-Fekjaer, M.S., Bentzen, T.G., Koutnikova, H., Auwerx, J., Nebb, H.I. 2004. *Diabetes* 53: 1243-1252.
- Dani, C., Smith, A.G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., Ailhaud, G. 1997. *Journal of Cell Science* 110: 1279-1285.
- Dave, S., Nanduri, R., Dkhar, H.K., Bhagyaraj, E., Rao, A., Gupta, P. 2014. *PLoS One* 9, e100862.
- De Souza Valente da Silva, L., Valeria da Veiga, G., Ramalho, R.A. 2007. *Nutrition* 23: 392-397.
- Decsi, T., Molnar, D. y Koletzko, B. 1997. *Journal of Pediatrics* 130: 653-655.

## REFERENCIAS

- Del Mar González-Barroso, M., Pecqueur, C., Gelly, C., Sanchis, D., Alves-Guerra, M.C., Bouillaud, F., Ricquier, D., Cassard-Doulcier, A.M. 2000. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31722-31732.
- Ducharme, N.A. y Bickel, P.E. 2008. *Endocrinology* 149: 942-949.
- El-Sohemy, A., Baylin, A., Kabagambe, E., Ascherio, A., Spiegelman, D., Campos, H. 2002. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 172-179.
- Elliott, R. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 147-154.
- Emek, S.C., Szilagyi, A., Akerlund, H.E., Albertsson, P.A., Kohnke, R., Holm, A., Erlanson-Albertsson, C. 2010. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 40: 13-27.
- Erlinger, T.P., Guallar, E., Miller, E.R., Stolzenberg-Solomon, R., Appel, L.J. 2001. *Archives of Internal Medicine* 161: 1903-1908.
- Eroglu, A. y Harrison, E.H. 2013. *Journal of Lipid Research* 54: 1719-1730.
- Eroglu, A., Hruszkewycz, D.P., Curley, R.W., Jr., Harrison, E.H. 2010. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504: 11-16.
- Eroglu, A., Hruszkewycz, D.P., Dela Sena, C., Narayanasamy, S., Riedl, K.M., Kopec, R.E., Schwartz, S.J., Curley, R.W., Jr., Harrison, E.H. 2012. *Journal of Biological Chemistry* 287: 15886-15895.
- Esteban-Pretel, G., Marin, M.P., Cabezuelo, F., Moreno, V., Renau-Piqueras, J., Timoneda, J., Barber, T. 2010. *Journal of Nutrition* 140: 792-798.
- Esteve, E., Ricart, W. y Fernández-Real, J.M. 2009. *Diabetes Care* 32: S362-S367.
- Farmer, S.R. 2006. *Cell Metabolism* 4: 263-273.
- Felipe, F., Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A. 2003. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* 27: 60-69.
- Felipe, F., Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A. 2004. *Diabetes* 53: 882-889.
- Felipe, F., Mercader, J., Ribot, J., Palou, A., Bonet, M.L. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 258-265.
- Fiedor, J. y Burda, K. 2014. *Nutrients* 6: 466-488.
- Flachs, P., Rossmeisl, M., Kuda, O., Kopecky, J. 2013. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831: 986-1003.
- Ford, E.S., Will, J.C., Bowman, B.A., Narayan, K.M. 1999. *American Journal of Epidemiology* 149: 168-176.
- Ford, E.S., Gillespie, C., Ballew, C., Sowell, A., Mannino, D.M. 2002. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 818-827.

## REFERENCIAS

- Ford, E.S., Liu, S., Mannino, D.M., Giles, W.H., Smith, S.J. 2003. *European Journal of Clinical Nutrition* 57: 1157-1163.
- Frey, S.K. y Vogel, S. 2011. *Nutrients* 3: 27-39.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. 2004. *Journal of Clinical Investigation* 114: 1752-1761.
- Fuster, A., Pico, C., Sanchez, J., Oliver, P., Zingaretti, M.C., Murano, I., Morroni, M., Hoeller, U., Goralczyk, R., Cinti, S., Palou, A. 2008. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 295-304.
- García, O.P., Long, K.Z. y Rosado, J.L. 2009. *Nutrition Reviews* 67: 559-572.
- Gerhard, G.S., Styer, A.M., Strodel, W.E., Roesch, S.L., Yavorek, A., Carey, D.J., Wood, G.C., Petrick, A.T., Gabrielsen, J., Ibele, A., Benotti, P., Rolston, D.D., Still, C.D., Argyropoulos, G. 2014. *International Journal of Obesity* 38: 371-378.
- Giralt, M. y Villarroya, F. 2013. *Endocrinology* 154: 2992-3000.
- Gorocica-Buenfil, M.A., Fluharty, F.L., Bohn, T., Schwartz, S.J., Loerch, S.C. 2007. *Journal of Animal Science* 85: 3355-3366.
- Goto, T., Kim, Y.I., Takahashi, N. y Kawada, T. 2013. *Molecular Nutrition & Food Research* 57: 20-33.
- Gouranton, E., Yazidi, C.E., Cardinault, N., Amiot, M.J., Borel, P., Landrier, J.F. 2008. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3832-3836.
- Gouranton, E., Thabuis, C., Riollet, C., Malezet-Desmoulin, C., El Yazidi, C., Amiot, M.J., Borel, P., Landrier, J.F. 2010. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22: 642-648.
- Gouranton, E., Aydemir, G., Reynaud, E., Marcotorchino, J., Malezet, C., Caris-Veyrat, C., Blomhoff, R., Landrier, J.F., Ruhl, R. 2011. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811: 1105-1114.
- Granados, N., Amengual, J., Ribot, J., Musinovic, H., Ceresi, E., von Lintig, J., Palou, A., Bonet, M.L. 2013. *International Journal of Obesity* 37: 1169-1176.
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A.C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S.A., Biesalski, H.K. 2010. *Journal of Nutrition* 140: 2268S-2285S.
- Gunanti, I.R., Marks, G.C., Al-Mamun, A., Long, K.Z. 2014. *Journal of Nutrition* 144: 489-495.
- Hamdy, O., Porramatikul, S. y Al-Ozairi, E. 2006. *Current Diabetes Reviews* 2: 367-373.
- Harrison, E.H. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821: 70-77.

## REFERENCIAS

- Hessel, S., Eichinger, A., Isken, A., Amengual, J., Hunzelmann, S., Hoeller, U., Elste, V., Hunziker, W., Goralczyk, R., Oberhauser, V., Von Lintig, J., Wyss, A. 2007. *Journal of Biological Chemistry* 282: 33553-33561.
- Higdon, J.V. y Frei, B. 2003. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 23: 365-367.
- Hollung, K., Rise, C.P., Drevon, C.A., Reseland, J.E. 2004. *Journal of Cellular Biochemistry* 92: 307-315.
- Hosokawa, M., Miyashita, T., Nishikawa, S., Emi, S., Tsukui, T., Beppu, F., Okada, T., Miyashita, K. 2010. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504: 17-25.
- Hozawa, A., Jacobs, D.R. Jr., Steffes, M.W., Gross, M.D., Steffen, L.M., Lee, D.H. 2007. *Clinical Chemistry* 53: 447-455.
- Hu, X., Li, Y., Li, C., Fu, Y., Cai, F., Chen, Q., Li, D. 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 519: 59-65.
- Huang, K.C., Lin, R.C., Kormas, N., Lee, L.T., Chen, C.Y., Gill, T.P., Caterson, I.D. 2004. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 28: 470-475.
- Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., Yazawa, K. 2007. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71: 893-899.
- Inoue, M., Tanabe, H., Matsumoto, A., Takagi, M., Umegaki, K., Amagaya, S., Takahashi, J. 2012. *Biochemical Pharmacology* 84: 692-700.
- Iwamoto, M., Imai, K., Ohta, H., Shirouchi, B., y Sato, M. 2012. *Lipids in Health and Disease* 11, 52.
- Jeon, S.M., Kim, H.J., Woo, M.N., Lee, M.K., Shin, Y.C., Park, Y.B., Choi, M.S. 2010. *Biotechnology Journal* 5: 961-969.
- Jeyakumar, S.M., Vajreswari, A. y Giridharan, N.V. 2006. *Obesity* 14: 52-59.
- Jeyakumar, S.M., Vajreswari, A. y Giridharan, N.V. 2008. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370: 243-247.
- Jiang, W. y Napoli, J.L. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820: 859-869.
- Jiang, W. y Napoli, J.L. 2013. *Journal of Biological Chemistry* 288: 589-597.
- Johnson, E.J. 2014. *Nutrition Reviews* 72: 605-612.
- Kabagambe, E.K., Furtado, J., Baylin, A., Campos, H. 2005. *Journal of Nutrition* 135: 1763-1769.
- Kameji, H., Mochizuki, K., Miyoshi, N., Goda, T. 2010. *Nutrition* 26: 1151-1156.
- Kane, M.A., Folias, A.E. y Napoli, J.L. 2008. *Analytical Biochemistry* 378: 71-79.

## REFERENCIAS

- Kane, M.A., Folias, A.E., Wang, C., Napoli, J.L. 2008. *Analytical Chemistry* 80: 1702-1708.
- Kang, S.I., Ko, H.C., Shin, H.S., Kim, H.M., Hong, Y.S., Lee, N.H., Kim, S.J. 2011. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409: 769-774.
- Kang, S.I., Shin, H.S., Kim, H.M., Yoon, S.A., Kang, S.W., Kim, J.H., Ko, H.C., Kim, S.J. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3389-3395.
- Kaplan, L.A., Lau, J.M. y Stein, E.A. 1990. *Clinical Physiology and Biochemistry* 8: 1-10.
- Kaulmann, A., y Bohn, T. 2014. *Nutrition Research* 34: 907-929.
- Kawada, T., Kamei, Y. y Sugimoto, E. 1996. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 20 Suppl 3: S52-57.
- Kawada, T., Kamei, Y., Fujita, A., Hida, Y., Takahashi, N., Sugimoto, E., Fushiki, T. 2000. *Biofactors* 13: 103-109.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., Sun, H. 2007. *Science* 315: 820-825.
- Kesse-Guyot, E., Ahluwalia, N., Lassale, C., Hercberg, S., Fezeu, L., Lairon, D. 2013. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 23: 677-683.
- Kiefer, F.W., Vernochet, C., O'Brien, P., Spoerl, S., Brown, J.D., Nallamshetty, S., Zeyda, M., Stulnig, T.M., Cohen, D.E., Kahn, C.R., Plutzky, J. 2012. *Nature Medicine* 18: 918-925.
- Kim, H.S., Jeong, S.Y., Lee, J.H., Kim, B.E., Kim, J.W., Jeong, S.W., Kim, I.K. 2000. *Experimental & Molecular Medicine* 32: 197-203.
- Kim, K.N., Heo, S.J., Yoon, W.J., Kang, S.M., Ahn, G., Yi, T.H., Jeon, Y.J. 2010. *European Journal of Pharmacology* 649: 369-375.
- Kimmons, J.E., Blanck, H.M., Tohill, B.C., Zhang, J., Khan, L.K. 2006. *Journal of Medical Genetics* 8: 59.
- Klyde, B.J. y Hirsch, J. 1979. *Journal of Lipid Research* 20: 705-715.
- Kohlmeier, L. y Kohlmeier, M. 1995. *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl 3: 99-106.
- Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. 2005. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
- Kritchevsky, S.B., Bush, A.J., Pahor, M., Gross, M.D. 2000. *American Journal of Epidemiology* 152: 1065-1071.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Nagai, R., Tobe, K.,

## REFERENCIAS

- Kimura, S., Kadowaki, T. 1999. *Molecular Cell* 4: 597-609.
- Kumar, M.V. y Scarpance, P.J. 1998. *Journal of Endocrinology* 157: 237-243.
  - Kumar, M.V., Sunvold, G.D. y Scarpance, P.J. 1999. *Journal of Lipid Reserarch* 40: 824-829.
- Kuri-Harcuch, W. 1982. *Differentiation* 23: 164-169.
- Lai, C.S., Tsai, M.L., Badmaev, V., Jimenez, M., Ho, C.T., Pan, M.H. 2012. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1094-1101.
  - Landrier, J.F., Marcotorchino, J. y Tourniaire, F. 2012. *Nutrients* 4: 1622-1649.
  - Larose, M., Cassard-Doulier, A.M., Fleury, C., Serra, F., Champigny, O., Bouillaud, F., Ricquier, D. 1996. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31533-31542.
  - Le Lay, S., Simard, G., Martínez, M.C., Andriantsitohaina, R. 2014. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 908539.
  - Lederman, J.D., Overton, K.M., Hofmann, N.E., Moore, B.J., Thornton, J., Erdman, J.W. 1998. *Journal of Nutrition* 128: 271-279.
  - Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman, J.W., Jr. 1999. *Journal of Nutrition* 129: 2271-2277.
  - Lee, M.J., Wu, Y. y Fried, S.K. 2013. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 1-11.
  - Lindqvist, A. y Andersson, S. 2002. *Journal of Biological Chemistry* 277: 23942-23948.
  - Lobo, G.P., Amengual, J., Li, H.N., Golczak, M., Bonet, M.L., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2010. *Journal of Biological Chemistry* 285: 27891-27899.
  - Lobo, G.P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A.R., Wyss, A., Palczewski, K., Von Lintig, J. 2010a. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 24: 1656-1666.
  - Lobo, G.P., Isken, A., Hoff, S., Babino, D., Von Lintig, J. 2012. *Development* 139: 2966-2977.
  - Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C., Petkovich, M. 2000. *Molecular Endocrinology* 14: 1483-1497.
  - Lucas, E.A., Li, W., Peterson, S.K., Brown, A., Kuvibidila, S., Perkins-Veazie, P., Clarke, S.L., Smith, B.J. 2011. *British Journal of Nutrition* 106: 1495-1505.
  - Luvizotto, R. de A., Nascimento, A.F., Imaizumi, E., Pierine, D.T., Conde, S.J., Correa, C.R., Yeum, K.J., Ferreira, A.L. 2013. *British Journal of Nutrition* 110: 1803-1809.
  - Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K. 2005. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332: 392-397.

## REFERENCIAS

- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyashita, K. 2006. *International Journal of Molecular Medicine* 18: 147-152.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K. 2007. *Journal of Oleo Science* 56: 615-621.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., Miyashita, K. 2009. *Molecular Medicine Reports* 2: 897-902.
- Maeda, H., Saito, S., Nakamura, N. y Maoka, T. 2013. *ISRN Inflammation* 2013: 763758.
- Manolescu, D.C., Sima, A. y Bhat, P.V. 2010. *Journal of Nutrition* 140: 311-316.
- Marcotorchino, J., Romier, B., Gouranton, E., Riollet, C., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Landrier, J.F. 2012. *Molecular Nutrition and Food Research* 56: 725-732.
- Marchildon, F., St-Louis, C., Akter, R., Roodman, V., Wiper-Bergeron, N.L. 2010. *Journal of Biological Chemistry* 285: 13274-13284.
- Menéndez, C., Lage, M., Peino, R., Baldelli, R., Concheiro, P., Dieguez, C., Casanueva, F.F. 2001. *Journal of Endocrinology* 170: 425-431.
- Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M.L., Palou, A. 2006. *Endocrinology* 147: 5325-5332.
- Mercader, J., Madsen, L., Felipe, F., Palou, A., Kristiansen, K., Bonet, M.L. 2007. *Cellular Physiology and Biochemistry* 20: 1061-1072.
- Mercader, J., Granados, N., Bonet, M.L., y Palou, A. 2008. *Cellular Physiology and Biochemistry* 22, 363-372.
- Mercader, J., Palou, A. y Bonet, M.L. 2010. *Obesity* 18: 655-662.
- Miyashita, K., Nishikawa, S., Beppu, F., Tsukui, T., Abe, M., Hosokawa, M. 2011. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1166-1174.
- Moor de Burgos, A., Wartanowicz, M. y Ziemiński, S. 1992. *European Journal of Clinical Nutrition* 46: 803-808.
- Moussa, M., Gouranton, E., Gleize, B., Yazidi, C.E., Niot, I., Besnard, P., Borel, P., y Landrier, J.F. 2011. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 578-584.
- Murano, I., Morroni, M., Zingaretti, M.C., Oliver, P., Sánchez, J., Fuster, A., Pico, C., Palou, A., Cinti, S. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 305-312.
- Murholm, M., Isidor, M.S., Basse, A.L., Winther, S., Sorensen, C., Skovgaard-Petersen, J., Nielsen, M.M., Hansen, A.S., Quistorff, B., y Hansen, J.B. 2013. *BMC Cell Biol* 14: 41.
- Murray, T. y Russell, T.R. 1980. *Journal of Supramolecular Structure* 14: 255-266.

## REFERENCIAS

- Murri, M., Insenser, M., Bernal-Lopez, M.R., Pérez-Martínez, P., Escobar-Morreale, H.F., Tinahones, F.J. 2013. *Molecular and Cellular Endocrinology* 376: 99-106.
- Musinovic, H., Bonet, M.L., Granados, N., Amengual, J., Von Lintig, J., Ribot, J., Palou, A. 2014. *Molecular Nutrition and Food Research* 58: 2157-2165.
- Naaz, A., Holsberger, D.R., Iwamoto, G.A., Nelson, A., Kiyokawa, H., Cooke, P.S. 2004. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 18: 1925-1927.
- Neuhausser, M.L., Rock, C.L., Eldridge, A.L., Kristal, A.R., Patterson, R.E., Cooper, D.A., Neumark-Sztainer, D., Cheskin, L.J., Thornquist, M.D. 2001. *Journal of Nutrition* 131: 2184-2191.
- Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. 2008. *Journal of Oleo Science* 57: 345-351.
- Okada, T., Mizuno, Y., Sibayama, S., Hosokawa, M., Miyashita, K. 2011. *Journal of Food Science* 76: H2-6.
- Osth, M., Ost, A., Kjolhede, P. y Stralfors, P. 2014. *PLoS One* 9: e85610.
- Palou, A., y Bonet, M.L. 2013. *Nutrición Hospitalaria* 28 Suppl 5: 144-153.
- Palou, A., Pico, C. y Bonet, M.L. 2013. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16, 650-656.
- Palozza, P. 1998. *Nutrition Reviews* 56: 257-265.
- Parker, R.S. 1989. *Journal of Nutrition* 119: 101-104.
- Peinado, J.R., Jiménez-Gómez, Y., Pulido, M.R., Ortega-Bellido, M., Díaz-López, C., Padillo, F.J., López-Miranda, J., Vázquez-Martínez, R., Malagón, M.M. 2010. *Proteomics* 10: 3356-3366.
- Pérez-Pérez, R., Ortega-Delgado, F.J., García-Santos, E., López, J.A., Camafeita, E., Ricart, W., Fernández-Real, J.M., Peral, B. 2009. *Journal of Proteome Research* 8: 1682-1693.
- Pico, C. y Palou, A. 2013. *Frontiers in Physiology* 4: 255.
- Puigserver, P., Vázquez, F., Bonet, M.L., Pico, C., Palou, A. 1996. *Biochemical Journal* 317: 827-833.
- Rabelo, R., Reyes, C., Schifman, A., Silva, E. 1996. *Endocrinology* 137: 3488-3496.
- Rao, A.V. y Rao, L.G. 2007. *Pharmacological Research* 55: 207-216.
- Reboul, E. 2013. *Nutrients* 5: 3563-3581.
- Redonnet, A., Ferrand, C., Bairras, C., Higuieret, P., Noel-Suberville, C., Cassand, P., Atgie, C. 2008. *British Journal of Nutrition* 100: 722-730.

## REFERENCIAS

- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., Duester, G., Maiseyeu, A., Mihai, G., Harrison, E.H., Rajagopalan, S., Kirkland, J.L., Ziouzenkova, O. 2011. *Molecular Endocrinology* 25: 799-809.
- Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M.L., Palou, A. 2001. *Obesity Research* 9: 500-509.
- Rieck, M., Meissner, W., Ries, S., Muller-Brusselbach, S., Muller, R. 2008. *Molecular Pharmacology* 74: 1269-1277.
- Rodríguez, A.M., Sastre, S., Ribot, J., Palou, A. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 132-138.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., Shroot, B. 1994. *Molecular and Cellular Endocrinology* 104: 201-211.
- Saito, M. 2013. *Diabetes & Metabolism J* 37: 22-29.
- Sakamuri, V.P., Ananthathmakula, P., Veettil, G.N., y Ayyalasomayajula, V. 2011. *Nutrition Journal* 10: 70.
- Sánchez, J., Fuster, A., Oliver, P., Palou, A., Pico, C. 2009. *British Journal of Nutrition* 102: 1686-1694.
- Sarni, R.O., Suano de Souza, F.I., Ramalho, R.A., Schoeps Dde, O., Kochi, C., Catherino, P., Dias, M.C., Pessotti, C.F., Mattoso, L.C., Colugnat, F.A. 2005. *Medical Science Monitor* 11: CR510-514.
- Schug, T.T., Berry, D.C., Shaw, N.S., Travis, S.N., y Noy, N. 2007. *Cell* 129: 723-733.
- Schupp, M., Lefterova, M.I., Janke, J., Leitner, K., Cristancho, A.G., Mullican, S.E., Qatanani, M., Szwegold, N., Steger, D.J., Curtin, J.C., Suh, M.J., Albert, M.R., Engeli, S., Gudas, L.J., Lazar, M.A. 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 1105-1110.
- Schwarz, E.J., Reginato, M.J., Shao, D., Krakow, S.L., yLazar, M.A. 1997. *Molecular and Cellular Biology* 17: 1552-1561.
- Sears, I.B., MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G., Graves, R.A. 1996. *Molecular and Cellular Biology* 16: 3410-3419.
- Serra, F., Bonet, M.L., Puigserver, P., Oliver, J., Palou, A. 1999. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 23: 650-655.
- Shaw, N., Elholm, M. y Noy, N. 2003. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41589-41592.
- Sheng, L., Qian, Z., Shi, Y., Yang, L., Xi, L., Zhao, B., Xu, X., Ji, H. 2008. *British Journal of Pharmacology* 154: 1016-1024.
- Shete, V. y Quadro, L. 2013. *Nutrients* 5: 4849-4868.
- Shirakura, Y., Takayanagi, K., Mukai, K., Tanabe, H., Inoue, M. 2011. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 57: 426-431.

## REFERENCIAS

- Siems, W., Wiswedel, I., Salerno, C., Crifo, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C.D., Sommerburg, O. 2005. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 385-397.
- Sima, A., Manolescu, D.C. y Bhat, P. 2011. *Biochemistry and Cell Biology* 89: 578-584.
- Sliwa, A., Goralska, J., Czech, U., Gruca, A., Polus, A., Zapala, B., Dembinska-Kiec, A. 2012. *Acta Biochimica Polonica* 59: 39-41.
- Sluijjs, I., Beulens, J.W., Grobbee, D.E., Van der Schouw, Y.T. 2009. *Journal of Nutrition* 139: 987-992.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., Arner, P. 2008. *Nature* 453: 783-787.
- Stepan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A. 2001. *Nature* 409: 307-312.
- Stofkova, A. 2009. *Endocrine Regulations* 43: 157-168.
- Stofkova, A. 2010. *Endocrine Regulations* 44: 25-36.
- Strauss, R.S. 1999. *Journal of Pediatrics* 134: 160-165.
- Strom, K., Gundersen, T.E., Hansson, O., Lucas, S., Fernandez, C., Blomhoff, R., Holm, C. 2009. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 23: 2307-2316.
- Sugiura, M., Nakamura, M., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., Matsumoto, H., Kato, M., Ohshima, M., Nagao, A. 2006. *Journal of Epidemiology* 16: 71-78.
- Suzuki, K., Inoue, T., Hioki, R., Ochiai, J., Kusuhara, Y., Ichino, N., Osakabe, K., Hamajima, N., Ito, Y. 2006. *Clinical Nutrition* 25: 780-789.
- Suzuki, K., Inoue, T., Hashimoto, S., Ochiai, J., Kusuhara, Y., Ito, Y., Hamajima, N. 2010. *Clinica Chimica Acta* 411: 1330-1334.
- Takayanagi, K., Morimoto, S., Shirakura, Y., Mukai, K., Sugiyama, T., Tokuji, Y., Ohnishi, M. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12342-12351.
- Takayanagi, K., y Mukai, K. 2014. En R.R. Watson (ed.). *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*, pp. 381-399. San Diego: Elsevier.
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., Kasuga, M. 2002. *Diabetes* 51: 2045-2055.
- Tan, C.P. y Hou, Y.H. 2014. *Inflammation* 37: 443-450.
- Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M. 2003. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 259-266.
- Tchoukalova, Y.D., Votruba, S.B., Tchkonja, T., Giorgadze, N., Kirkland, J.L., Jensen, M.D. 2010. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 18226-18231.

## REFERENCIAS

- Teas, J., Baldeon, M.E., Chiriboga, D.E., Davis, J.R., Sarries, A.J., Braverman, L.E. 2009. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 18: 145-154.
- Teruel, T., Hernandez, R., Benito, M., Lorenzo, M. 2003. *Journal of Biological Chemistry* 278: 263-269.
- Tourniaire, F., Gouranton, E., von Lintig, J., Keijer, J., Bonet, M.L., Amengual, J., Lietz, G., Landrier, J.F. 2009. *Genes & Nutrition* 4: 179-187.
- Tsuchida, T., Mukai, K., Mizuno, Y., Masuko, K., Minagawa, K. 2008. *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 36: 247-253.
- Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L., Piantedosi, R., Allan, M., Goodman, D.S., Blaner, W.S. 1992. *Journal of Biological Chemistry* 267: 1805-1810.
- Turer, A.T. y Scherer, P.E. 2012. *Diabetologia* 55: 2319-2326.
- Van Helden, Y.G., Keijer, J., Heil, S.G., Pico, C., Palou, A., Oliver, P., Munnia, A., Briede, J.J., Peluso, M., Franssen-van Hal, N.L., van Schooten, F.J., Godschalk, R.W. 2009. *Carcinogenesis* 30: 2070-2076.
- Van Helden, Y.G., Godschalk, R.W., von Lintig, J., Lietz, G., Landrier, J.F., Bonet, M.L., van Schooten, F.J., Keijer, J. 2011. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 1466-1474.
- Van Herpen-Broekmans, W.M., Klopping-Ketelaars, I.A., Bots, M.L., Kluit, C., Princen, H., Hendriks, H.F., Tijburg, L.B., van Poppel, G., Kardinaal, A.F. 2004. *European Journal of Epidemiology* 19: 915-921.
- Vaughan, L.A., Benyshek, D.C. y Martin, J.F. 1997. *Journal of the American Dietetics Association* 97: 1275-1282.
- Viroonudomphol, D., Pongpaew, P., Tungtrongchitr, R., Changbumrung, S., Tungtrongchitr, A., Phonrat, B., Vudhivai, N., Schelp, F.P. 2003. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 12: 73-79.
- Virtanen, S.M., Van't Veer, P., Kok, F., Kardinaal, A.F., Aro, A. 1996. *American Journal of Epidemiology* 144: 968-979.
- Virtue, S. y Vidal-Puig, A. 2010. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801: 338-349.
- Von Lintig, J. 2012. *American Journal of Clinical Nutrition* 96: 1234S-1244S.
- Wallstrom, P., Wirfalt, E., Lahmann, P.H., Gullberg, B., Janzon, L., Berglund, G. 2001. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 777-785.
- Wang, L., Gaziano, J.M., Norkus, E.P., Buring, J.E., Sesso, H.D. 2008. *American Journal of Clinical Nutrition* 88: 747-754.
- Wellen, K.E. y Hotamisligil, G.S. 2005. *Journal of Clinical Investigation* 115: 1111-1119.

## REFERENCIAS

- Wise, J.A., Kaats, G.R., Preuss, H.G., Morin, R.J. 2009. *Interntional Journal of Food Science and Nutrition* 60 Suppl 3: 65-75.
- Wisse, B.E. 2004. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 2792-2800.
- Wolfe, W.S. y Sanjur, D. 1988. *Journal of the American Dietetic Association* 88: 822-827.
- Xi, L., Qian, Z., Xu, G., Zhou, C., Sun, S. 2007. *British Journal of Pharmacology* 151: 610-617.
- Xue, J.C., Schwarz, E.J., Chawla, A., Lazar, M.A. 1996. *Molecular and Cellular Biology* 16: 1567-1575.
- Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., Kahn, B.B. 2005. *Nature* 436: 356-362.
- Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Reichert, B., Yang, F., Ziouzenkova, O. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821: 190-197.
- Yeum, K.J., Booth, S.L., Roubenoff, R., Russell, R.M. 1998. *Journal of Nutrition Health and Aging* 2: 79-83.
- Zhang, Y., Matheny, M., Zolotukhin, S., Tumer, N., Scarpace, P.J. 2002. *Biochimica et Biophysica Acta* 1584: 115-122.
- Zhang, M., Hu, P., Krois, C.R., Kane, M.A., Napoli, J.L. 2007. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 21: 2886-2896.
- Ziouzenkova, O., Orasanu, G., Sharlach, M., Akiyama, T.E., Berger, J.P., Viereck, J., Hamilton, J.A., Tang, G., Dolnikowski, G.G., Vogel, S., Duester, G, Plutzky, J. 2007. *Nature Medicine* 13: 695-702.
- Ziouzenkova, O., Orasanu, G., Sukhova, G., Lau, E., Berger, J.P., Tang, G., Krinsky, N.I., Dolnikowski, G.G., Plutzky, J. 2007a. *Molecular Endocrinology* 21: 77-88.
- Zizola, C.F., Schwartz, G.J. y Vogel, S. 2008. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 295: E1358-1368.
- Zizola, C.F., Frey, S.K., Jitngarmkusol, S., Kadereit, B., Yan, N., Vogel, S. 2010. *Molecular and Cellular Biology* 30: 3412-3420.
- Zulet, M.A., Puchau, B., Hermsdorff, H.H., Navarro, C., Martínez, J.A. 2008. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 54: 347-352.

# CONSIDERACIONES PARA EL USO DE LOS CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

Andrés Gavilán Bravo



## INTRODUCCIÓN

El objetivo de este capítulo es proporcionar una panorámica amplia y detallada de los carotenoides de diferentes orígenes naturales, con vistas a una correcta y óptima utilización, para garantizar un desarrollo científico adecuado de alimentos funcionales, compuestos por carotenoides como sustancias bioactivas.

Los carotenoides, empleados en condiciones, dosis de uso y procedimientos de adición adecuados y específicos a determinados tipos de matrices alimentarias, son capaces de impartir efectos beneficiosos muy importantes y útiles.

Conforme a los datos oficiales actualizados disponibles de fuentes seguras y fiables, el crecimiento de la venta de alimentos funcionales en la Unión Europea se sitúa en el rango de 15-20% al año.

## ¿QUÉ SON LOS ALIMENTOS FUNCIONALES?

A falta de una definición concreta de carácter oficial, ampliamente aceptada por la comunidad internacional, podríamos conceptualizar los alimentos funcionales como aquellos alimentos que consumidos diariamente y con regularidad a unas dosis preestablecidas, son capaces de proporcionar efectos saludables que van desde la regulación del metabolismo de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos a mejoras diversas en el organismo humano, hasta la mejora de los aspectos fisiológicos, la disminución del riesgo de ciertas patologías y la mejora, en el caso de los niños, de su desarrollo y su salud.

Sin duda son algo más que un alimento, porque además de alimentar, aportan efectos saludables específicos para el organismo humano. De ahí que en ocasiones se denominen alimentos nutracéuticos (mejora básica de aspectos nutricionales), alimentos cosmeceúticos (mejora de aspectos cosméticos a nivel de, por ejemplo, ojos, piel o cabello), etcétera. Entre las sustancias bioactivas aplicables, se hallan los carotenoides.

### ¿Los ingredientes funcionales (sustancias con propiedades saludables), pueden utilizarse en todo tipo de alimentos?

No, no todos los ingredientes con propiedades saludables pueden emplearse, por varias razones: 1) la posible incompatibilidad química, con uno o varios tipos de componentes de los alimentos, que impediría el efecto saludable; 2) puede existir una prohibición expresa de emplearlos en algunos alimentos en los que no están

permitidos: cereales para desayuno, frutas y hortalizas frescas, alimentos infantiles, alimentos dietéticos y complementos alimenticios, entre otros.

### ¿Qué requisito adicional es imprescindible para poder comercializar los alimentos funcionales?

Que en la etiqueta del alimento funcional figure de manera clara y detallada que, junto con el consumo del alimento, se debe observar una dieta sana, equilibrada y variada, unida al ejercicio físico.

Pero, ¿qué significado real y práctico tienen esas recomendaciones? En primer lugar citamos una *dieta sana*, entendida como aquella que no resulta perjudicial para la salud humana. Así, por ejemplo, tomar pan o cualquier otro tipo de alimento elaborado con ciertos cereales que contienen gluten perjudica la salud de los celíacos (personas que no toleran el gluten), luego para este grupo de población la dieta sana sería aquella que excluye los alimentos con gluten. En el caso de los diabéticos, la presencia de azúcar en un alimento puede causarles diversos trastornos de salud y así sucesivamente.

En segundo lugar citamos una *dieta equilibrada*, aquella que conste de la presencia armónica y compensada de proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra, sodio y otros componentes en dosis equilibradas.

En tercer lugar mencionamos una *dieta variada*, que es aquella que supone el consumo alternante de frutas, verduras, legumbres, pan, cereales y productos de origen animal (leche, huevos, carnes, pescado y mariscos), en dosis equilibradas a lo largo de la semana.

En cuarto y último lugar hacemos referencia a *ejercicio físico*, continuo, pero adaptado en tipo e intensidad a la edad y situación física de cada consumidor específico.

Los efectos beneficiosos se instalan en un conjunto de mejoras que resumimos en las siguientes facetas (según estipulan los artículos 13°, 14° y 15° del Reglamento Europeo (CE) 1924/2006):

### Artículo 13.1°

- Mejoras fisiológicas (crecimiento, desarrollo y funciones corporales).
- Mejoras psicológicas.
- Mejoras comportamentales.
- Reducción de la sensación de apetito.
- Aumento de la saciedad.
- Reducción del aporte energético a la dieta.
- Disminución del peso corporal.

### Artículo 13.5°

Propiedades saludables referidas a datos científicos obtenidos recientemente y para los que se haya solicitado protección de datos, sujetos a los derechos de la propiedad industrial.

### Artículo 14°

- Reducción del riesgo de padecimiento de diversas enfermedades.
- Mejoras en el desarrollo y la salud de los niños.

Funciones que no pueden ser atribuidas a los alimentos funcionales:

- Curar.
- Prevenir.
- Ni tratar enfermedades o cualquier tipo de estado patológico.

Dichas funciones, están encomendadas a los medicamentos en exclusiva.

### Tipos de funciones que sí proporcionan los alimentos funcionales

Entre otras funciones:

- Reduce.
- Incrementa.
- Mejora.
- Facilita.
- Favorece.
- Permite.
- Vehicula.

Referido a las propiedades saludables, que potencialmente pueden conferir los alimentos funcionales con base en los tipos y dosis de uso de los ingredientes con efectos beneficiosos contenidos en dichos alimentos.

### Declaraciones saludables (*health claims*): ¿Qué requisitos deben cumplir los alimentos funcionales en relación con la declaración de los efectos beneficiosos que aportan para poder comercializarlos?

- Que la declaración saludable no sea falsa, ambigua o engañosa.
- Que no dé lugar a dudas sobre la seguridad o la adecuación nutricional de otros alimentos.
- Que no aliente o apruebe el consumo excesivo de un alimento.
- Que no afirme, sugiera o dé a entender que una dieta equilibrada y variada no puede proporcionar cantidades adecuadas de nutrientes.
- Podrán adoptarse excepciones para los nutrientes que no puedan obtenerse en cantidades suficientes mediante una dieta equilibrada y variada, incluso las condiciones para su aplicación, de conformidad con el procedimiento contemplado en el Reglamento (CE) 1924/2006, teniendo en cuenta las condiciones especiales vigentes en los Estados miembros.
- Que se refiera a cambios en las funciones corporales, que pudieran crear alarma en el consumidor o explotar su miedo, tanto textualmente como a través de representaciones pictóricas, gráficas o simbólicas.
- Que haya demostrado de manera fehaciente, que la presencia, ausencia o contenido reducido, en un alimento o una categoría de alimentos, de un nutriente u otra sustancia respecto del cual se efectúa la declaración posee un efecto nutricional o fisiológico beneficioso, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados.
- Que el nutriente u otra sustancia acerca del cual se efectúe la declaración esté contenido en el producto final en una cantidad significativa tal como se define en la legislación comunitaria o en los casos en que no existan normas al respecto, en una cantidad que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados o que no está presente o está presente en una cantidad reducida que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados.
- Que cuando sea pertinente, el nutriente u otra sustancia sobre el cual se efectúa la declaración se encuentra en una forma asimilable por el organismo, es decir sea biodisponible.
- Que la cantidad del producto que cabe razonablemente esperar que se consuma proporciona una cantidad significativa del nutriente u otra sustancia a que hace referencia la declaración, tal como se define en la legislación comunitaria o en los casos en que no existan normas al respecto, una cantidad significativa que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados.
- Que se reúnan las condiciones específicas establecidas por el Reglamento Europeo (CE) 1924/2006.

## ¿Qué criterios deben adoptarse para que se permita el uso de ingredientes nutricionales (en este caso los carotenoides) y sustancias con otras propiedades saludables, destinadas a elaborar los alimentos funcionales?

Básicamente dos:

- Los perfiles nutricionales, que siguen sin haberse definido todavía por la Comisión Europea.
- Utilizar la guía elaborada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), para poder hacer alegaciones funcionales (declaraciones saludables).

Los perfiles nutricionales se hallan todavía inmersos en un curso de estudio y debate para su adopción, ya que no es nada fácil extraer criterios científicos armónicos y representativos de seguridad de los alimentos, para determinar las dietas en la actual Unión Europea, que cuenta con tantos países miembros, lo convierte en una tarea muy compleja.

Los aspectos que se tendrán en cuenta, relativos al perfil nutricional, conforme al Reglamento Europeo (CE) 1924/2006 serán:

- Las cantidades de determinados nutrientes y otras sustancias contenidas en los alimentos como, por ejemplo, grasas, ácidos grasos saturados, ácidos grasos *trans*, azúcares y sal o sodio.
- La función e importancia de los alimentos (o de las categorías de alimentos) en la dieta de la población en general o, en su caso, de determinados grupos sometidos a riesgo, incluidos los niños.

- Que la composición nutricional global de los alimentos y la presencia de nutrientes cuyo efecto en la salud haya sido reconocido científicamente.

Los perfiles nutricionales se basarán en conocimientos científicos sobre dietas y nutrición, así como sobre su relación con la salud.

Al establecer los perfiles nutricionales, la Comisión pedirá a la autoridad que le facilite, dentro de un plazo de 12 meses, el asesoramiento científico pertinente, centrado, en particular, en los siguientes elementos:

- Si deben establecerse perfiles para los alimentos en general o consideración para determinadas categorías de alimentos.
- La gama y el equilibrio de nutrientes que deben tomarse en consideración. La elección de la cantidad de referencia-base para los perfiles.
- La propuesta de cálculo de los perfiles.
- El ensayo del sistema propuesto.

Al establecer los perfiles nutricionales, la Comisión consultará a las partes interesadas, en particular los explotadores de empresas alimentarias y las asociaciones de consumidores.

Los perfiles nutricionales y sus condiciones de utilización se actualizarán a fin de tener en cuenta los progresos científicos pertinentes.

## ¿Qué es preciso para que los ingredientes funcionales (entre ellos los carotenoides) aporten efectos beneficiosos?

Hallarse en dosis mínimas adecuadas, que científicamente haya sido demostrado que aportan efectos saludables, mediante un estudio riguroso y solvente llevado cabo por una institución o centro científico debidamente acreditado, siguiendo procedimientos científicos adecuados y suficientes, que además garanticen la biodisponibilidad de los ingredientes funcionales, entendida como el grado de absorción de los ingredientes con propiedades saludables y su posterior aprovechamiento orgánico en el ser humano. Para lograr una alta biodisponibilidad es aconsejable utilizar sustancias que facilitan el metabolismo, como gluconatos, bis-glicinatos, inosinatos, lactatos, picolinatos, treonatos, etc., en vez de sales inorgánicas: sulfatos, cloruros, bicarbonatos, nitratos, etcétera.

Pero, ¿dónde ubicamos a los carotenoides como sustancias bioactivas? En dos grupos: *a)* los carotenoides provitamínicos (como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) en el grupo de las vitaminas y minerales y *b)* los carotenoides no provitamínicos (como licopeno, luteína, zeaxantina y astaxantina, entre otros) en el grupo de otras sustancias con propiedades saludables (según el Reglamento Europeo (CE) 1924/2006):

Sustancias con otras propiedades saludables. Este grupo de sustancias con otras propiedades saludables está formado por ingredientes funcionales simples o mezclados y también por extractos y preparados funcionales, procedentes de alimentos naturales tanto de origen vegetal como de origen animal. Entre ellos, además de los carotenoides, destacan polifenoles,

pesudo-vitaminas, prebióticos, probióticos, glucanos y enzimas, entre muchos otros.

## HOJA DE RUTA PARA EL USO DE LOS CAROTENOIDES COMO SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Para realizarlo de manera selectiva y eficaz, es preciso adoptar una hoja de ruta, que consta de varias etapas:

- 1) Selección del carotenoide: a partir de un alimento de origen vegetal o a partir de un alimento de origen animal.
- 2) Datos preliminares necesarios
  - Ficha técnica completa (para lo cual se puede consultar el *Food Chemical Codex*/Edición VIII y el libro de Andrés Gavilán, *Guía de elaboración de productos funcionales*, Barcelona, Editorial Ergon, 2009.
  - Estructura molecular de los carotenoides.
  - Métodos de identificación y cuantificación de los carotenoides, en las matrices alimentarias de origen vegetal y de origen animal.

## PROCEDIMIENTO PRELIMINAR PARA DETERMINAR EL USO DE LOS CAROTENOIDES COMO SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Para que un ingrediente funcional pueda ser autorizado para su empleo en alimentos y además se pueda utilizar en el etiquetado una serie de alegaciones de los beneficios

que puede proporcionar, el ingrediente debe ser sometido a una serie de estudios científicos. Dichos estudios deben realizarse en hospitales, clínicas, centros de investigación y otras entidades autorizadas y acreditadas para la evaluación de la eficacia. Sólo si se demuestran de manera fehaciente e inequívoca los efectos beneficiosos, estos ingredientes podrán ser adicionados en los productos alimenticios y en consecuencia se podrán declarar en la etiqueta las propiedades saludables, salvo que exista alguna disposición oficial específica que no permita el empleo de un ingrediente específico.

## PROCEDIMIENTO OFICIAL PARA DETERMINAR EL USO DE LOS CAROTENOIDES COMO SUSTANCIAS BIOACTIVAS

### Etapa inicial

Aplicación de la Guías-Protocolos establecidos por el Panel Científico DNA (*Dietetic Products, Nutrition and Allergies*) de EFSA, relativas a las declaraciones saludables\_nutricionales y las de los artículos 13º y 14º del Reglamento (CE) 1924/2006.

### Etapa final

- Remisión del dossier científico completo, requerido por EFSA.
- Envío de las muestras de sustancias bioactivas (carotenoides) a la sede central de EFSA en Parma (Italia), para la evaluación toxicológica final por el panel científico DNA.

## PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS CAROTENOIDES

### Definición

Es el compendio de efectos impartidos por los carotenoides en las matrices alimentarias de origen vegetal y de origen animal.

### Efectos impartidos

- Donación de coloración a los alimentos.
- Efecto antioxidante.
- Impartición de propiedades saludables (1) a los alimentos, según se definen y explicitan en el Reglamento Europeo (CE)1924/2006, las listas de propiedades saludables autorizadas en determinados tipos de alimentos. Características, efectos sensoriales, especificaciones técnicas, propiedades saludables, dosis de uso y condiciones de aplicación en los alimentos funcionales.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS CAROTENOIDES

### Concepto

Con esta denominación se reflejan los datos básicos o peculiaridades a considerar con base en las propiedades tecnológicas que poseen de colorear los alimentos, adicionales a impartir efectos beneficiosos.

## Clasificación

- Identidad.
- Tonalidad.
- Especificidad.
- Uniformidad.
- Rendimiento.
- Homogeneidad.
- Miscibilidad.
- Estabilidad.
- Durabilidad.
- Aplicabilidad.

## Descriptiva

Identidad: Es aquella característica que permite identificar a un alimento mediante el colorante carotenoide que posee.

Tonalidad: Es aquella característica que expresa la identidad de un alimento, con base en el tipo específico de colorante carotenoide que posee.

Uniformidad: Es aquella característica que define el modo como se distribuye cromáticamente el color del carotenoide en la masa del alimento.

Rendimiento: Es aquella característica que expresa la superficie o volumen de alimento que es capaz de ser cubierta por una cantidad dada de colorante carotenoide.

Homogeneidad: Es aquella característica que expresa la distribución del colorante carotenoide en toda la masa del alimento.

Miscibilidad: Es aquella característica que refleja la facilidad que posee un colorante carotenoide para mezclarse con un alimento.

Estabilidad: Es aquella característica que describe el tipo de alteraciones que puede experimentar un colorante carotenoide en un alimento dado, incluyendo la decoloración parcial o total.

Durabilidad: Es aquella característica que define la vida media de un colorante carotenoide en un alimento, que viene condicionada por las reacciones de interacción química del colorante carotenoide con los componentes del alimento.

Aplicabilidad: Es aquella característica que permite conocer los tipos de alimentos, soportes, otros aditivos, enzimas, aromas y nutrientes en los que está autorizado un colorante carotenoide.

## ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

Concepto: Es el conjunto de parámetros que definen y describen de manera oficial los colorantes carotenoides, conforme al Reglamento Europeo (UE) 231/2012.

Clasificación: a) especificaciones generales, b) especificaciones organolépticas, c) especificaciones fisicoquímicas

## Tipos de carotenoides implicados

- E160a(i) ( $\beta$ -caroteno sintético).
- E160a(ii) ( $\beta$ -caroteno vegetal).
- E160(iii) ( $\beta$ -caroteno de la *Blakeslea trispora*).
- E160(iv) ( $\beta$ -caroteno de algas).

- E160d (licopeno).
- E160d/I (licopeno sintético).
- E160d/II (licopeno de tomates rojos).
- E160d/III (licopeno de *blakeslea trispora*).
- E161 (xantofilas).
- E161b (luteína).
- E161g (cantaxantina).

## Descriptiva

a) Especificaciones generales de los carotenoides

- Definición.
- EINECS (*European Inventory of Existing Chemical Substances*).
- Denominación química.

## Especificaciones organolépticas

Aspecto: Sólido, líquido.

Color: Propio (tipo de cromatismo, tonalidad, intensidad y brillo).

Olor: Propio.

Sabor: Propio.

## Especificaciones fisicoquímicas

Peso molecular.

Estructura molecular.

Identificación analítica.

Pureza.- No inferior a 98%.

Impurezas: *a*) residuos de disolventes, *b*) otras impurezas orgánicas y *c*) metales pesados (As, Pb, Cd, Hg)

Los datos específicos vienen fijados para cada carotenoide en el Reglamento (UE) 231/2012

## PROPIEDADES SALUDABLES

Efectos saludables globales de “las sustancias con otras propiedades saludables”, entre la que se encuentran los carotenoides

- Tonificación, vigorización, revitalización.
- Efectos balsámicos.
- Efectos relajantes.
- Reforzamiento del sistema inmunológico.
- Acción antioxidante.
- Acción hipolipidémica, hipotrigliciridémica.
- Anticariogénesis.
- Reducción de la tensión arterial.
- Efecto bifidogénico.
- Acción bacteristática.
- Efecto virustático.
- Estimulación del SNC (sistema nervioso central).
- Mejoramiento de padecimientos artrítico-reumáticos.
- Favorecimiento del proceso digestivo.
- Eliminación o reducción del apetito.
- Reducción del envejecimiento celular.
- Mejora de la salud de piel, uñas y cabello.
- Disminución del síndrome de Alzheimer.
- Supresión de los radicales libres.
- Mantenimiento del equilibrio electrolítico.
- Reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares.
- Reducción del riesgo de enfermedades

gastrointestinales.

- Reducción del riesgo de trastornos hepáticos y renales.
- Mejora en el desarrollo de la salud fisiológica de los niños.
- Mejora en el desarrollo de la salud biológica de los niños.
- Mejora en el desarrollo mental de los niños.

## DOSIS DE EMPLEO DE LOS CAROTENOIDES

### Dosis de empleo como colorantes naturales

Todos los carotenoides salvo: E160d (12 a 30 ppm) y E161g (cantaxantina).

- *QS (Quantum satis)*, debido a que poseen un IDA de *NS (Not specified)*.

Licopeno y Cantaxantina

- El E160d (licopeno). 20ppm en diversos tipos de alimentos.
- El E161g (cantaxantina).-15ppm (sólo en las salchichas de Estrasburgo), debido a su bajo IDA: 0-0.03mg/kg.p.c. y día.

### Dosis de empleo como sustancias bioactivas

Las cantidades son muy variables, pero en líneas generales están en torno a 10mg/d.

## LISTADO DE DECLARACIONES SALUDABLES AUTORIZADAS

Figuran en el Reglamento Europeo (UE) 432/2012 que se corresponde con el Reglamento Europeo (CE) 1925/2006.

Inicialmente se aprobaron 222 declaraciones saludables, de las cuales 80% correspondían a nutrientes (vitaminas y minerales) y 20% a otras sustancias con propiedades saludables. Actualmente las declaraciones autorizadas son del orden de 250, entre las que no existen todavía declaraciones saludables atribuibles a los carotenoides de manera específica, si bien cabe decir que las declaraciones relativas a la vitamina A autorizadas son seis. Sí existen en cambio declaraciones saludables aprobadas para los polifenoles del aceite de oliva y los del cacao.

En consecuencia, es necesario y urgente desarrollar proyectos tendientes a aportar declaraciones saludables, previos estudios científicos rigurosos, solventes y pormenorizados, para evidenciar que poseen determinadas propiedades saludables. El objetivo es que dichas propiedades puedan ser posteriormente evaluadas positivamente por EFSA, de forma que se pueda lograr la autorización de uso de las declaraciones saludables solicitadas en las matrices alimentarias.

## CONDICIONES DE APLICACIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

La adición de uno o varios carotenoides a los alimentos, para conseguir los efectos beneficiosos, se hará con base en los siguientes factores:

- Estado físico del alimento.
- Presentación del alimento.
- Tipo de tratamiento del alimento.
- Sistema de consumo del alimento.
- Condiciones medioambientales.
- Características reológicas del alimento.
- Miscibilidad del carotenoide.
- Dosis y modo de empleo.
- Destino de consumo del alimento.

## DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES QUE CONTENGAN CAROTENOIDES

Es el proceso de confección de los alimentos funcionales deberán observarse buenas prácticas de elaboración (BPE) y buenas prácticas de higiene alimentaria (BPHA), conforme al Reglamento (CE) 178/2002 (creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), el Reglamento (CE) 852/2004 (Higiene general de los alimentos) y el Reglamento (CE) 853/2004 (Higiene de los alimentos de origen animal). Con eso se pretende conseguir un producto alimenticio funcional con una calidad, estabilidad, durabilidad, seguridad e inocuidad (idealmente conforme a la Norma ISO.22.000) adecuadas, que proporcione efectos saludables a los consumidores.

Al margen de ello se adoptará, siguiendo lo supuesto por el Reglamento (CE) 178/2002 y la aplicación de la Guía Específica APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) para el sector alimentario pertinente, como garantía de higiene y seguridad alimentaria a todos los niveles.

### Requisitos generales

Para que los alimentos funcionales logren el máximo beneficio y seguridad, es preciso que los ingredientes que se adicionen cumplan los siguientes requisitos.

#### Requerimientos generales de los carotenoides:

R. organolépticos: Aspecto, olor, color, sabor, etc.

R. fisicoquímicos: Composición química, porcentaje de ingredientes activos, densidad, pH, viscosidad, índice de refracción, etc.

R. microbiológicos: Recuento de bacterias aerobias, mohos, levaduras, coliformes, etc.

#### Requisitos específicos de los carotenoides:

Requisitos físicos: Solubilidad, miscibilidad, fotoestabilidad, termoestabilidad, etc.

Requisitos químicos: Estabilidad al pH, oxidabilidad, interactividad química y bioquímica (con los componentes del alimento de destino), degradabilidad, etc.

Requisitos toxicológicos: Ingesta diaria admisible (IDA), ficha de datos de seguridad (FDS), etc.

### **Dosis recomendadas de empleo para producir efectos beneficiosos en el alimento:**

Cantidad de carotenoide, evidenciada a nivel científico, que produce efectos saludables sin riesgos para la salud de los consumidores. La dosis está fijada por los estudios científicos clínicos, farmacológicos y de otros tipos que proporcionen la cantidad que adjudica los efectos beneficiosos.

### **Campo potencial de aplicación alimentaria de los carotenoides:**

Categorías de alimentos autorizados en la Unión Europea (Reglamento Europeo (UE) 1129/2011)

- 1) Productos lácteos y sucedáneos.
- 2) Grasa, aceites y sus emulsiones.
- 3) Helados.
- 4) Frutas y hortalizas.
- 5) Productos de confitería.
- 6) Cereales y productos a base de cereales.
- 7) Productos de panadería, bollería, pastelería, repostería y galletería.
- 8) Carne.
- 9) Pescado y productos de la pesca.
- 10) Huevos y ovoproductos.
- 11) Azúcares, jarabes, miel y edulcorantes de mesa.
- 12) Sal, especias, sopas, ensaladas y productos proteínicos.
- 13) Alimentos destinados a una alimentación especial, tal como se definen en la directiva 2009/39/CE.
- 14) Bebidas.
- 15) Productos de aperitivo listos para el consumo.
- 16) Postres, excepto los productos incluidos en las categorías 1, 3 y 4.
- 17) Complementos alimenticios, tal como se definen en la Directiva 2002/46/CE, excepto los destinados a lactantes y niños de corta edad.

18) Alimentos elaborados no incluidos en las categorías 1-17, excepto los alimentos para lactantes y niños de corta edad.

### **Requisitos funcionales para los carotenoides:**

Para que ejerzan su efecto funcional es un requisito que el carotenoide sea biodisponible. Asimismo en algunos casos es importante considerar una sobredosis de seguridad. Este factor refleja la cantidad adicional de ingrediente funcional se debe añadir para conseguir los efectos saludables con plena seguridad, para contrarrestar las interacciones y alteraciones provocadas en contacto con los componentes del alimento, así como para adaptar a los ingredientes funcionales a la naturaleza del alimento, condiciones de elaboración, conservación y consumo.

## **PROCEDIMIENTO DE DISEÑO DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES CON LOS CAROTENOIDES**

### **Protocolo general:**

- Implantación del Comité de Innovación Tecnológica (CIT).
- Adopción de una lista de innovaciones prioritarias (LIP).
- Selección del modelo de alimento funcional (MAF).
- Indagación adicional de los ingredientes funcionales.
- Evaluación organoléptica preliminar del alimento diseñado.
- Elaboración de fórmulas de laboratorio.
- Estudio de la estabilidad del alimento funcional.
- Estudio de la durabilidad del alimento funcional.
- Planificación y realización de un ensayo industrial

confirmativo (EIC).

- Estudio analítico del contenido en ingredientes funcionales.
- Validación final del diseño.
- Etiquetado del alimento funcional. Reglamento (UE)1169/2011 (Información obligatoria ofrecida al consumidor).
- Carotenoide-carotenoides.
- Formulación del alimento funcional.
- Especificaciones de calidad.
- Proceso de elaboración.
- Envase y embalaje.
- Métodos de evaluación y seguimiento del contenido del carotenoide-carotenoides.
- Normas de conservación y almacenamiento del carotenoide-carotenoides y del alimento funcional.
- Se procederá a confeccionar el etiquetado que, al margen de cumplimentar el Reglamento Europeo (UE)1169/2011 sobre información al consumidor, y además el Reglamento Europeo (CE)1924/2006 y el Reglamento Europeo (CE) 1925/2006, sobre dosis y declaraciones de nutrientes y de otras sustancias con propiedades saludables.

#### Protocolo específico:

Selección de las declaraciones de otras propiedades saludables:

- Aplicar lo dispuesto por el Reglamento Europeo (CE)1924/2006 (Artículos 13º, 14º y 15º).
- Adoptar lo establecido por el Reglamento Europeo (UE) 432/2012.

Dado que por el momento no existen adjudicaciones de declaraciones saludables para los carotenoides, se emplearán cuando las futuras declaraciones saludables hayan sido evaluadas por EFSA y halladas satisfactorias y posteriormente sean publicadas por la Comisión Europea.

Frases no permitidas en un alimento funcional, entre otras, para evitar que induzcan a la confusión del consumidor con un medicamento: cura, trata, pronostica, previene de.

Frases permitidas, entre otras: reduce, incrementa, mejora, facilita, favorece, permite, entre otros tipos de declaraciones.

Dosis de empleo: Tanto para lograr los efectos nutricionales (de regulación del metabolismo) como los de propiedades saludables (fisiológicos, biológicos, cognoscitivos, comportamentales, como de reducción de riesgos de enfermedades, de favorecimiento del desarrollo de los niños), las dosis o cantidades a añadir a los alimentos serán aquellas que, mediante evidencia científica acreditada realizada con evaluaciones rigurosas, proporcionen de manera inequívoca efectos beneficiosos en el consumidor.

#### Aspectos preliminares de los alimentos:

- Tipo de alimento (vegetal, animal, mixto).
- Cantidad necesaria para producir el efecto funcional.
- Estado físico del alimento (sólido, líquido, gel, etc.).
- Tratamiento del alimento (deshidratado, liofilizado, emulsionado, congelado, etc.).
- Características organolépticas (aspecto, color, olor, sabor, turbidez, etc.).

### Aspectos fundamentales:

- Características fisicoquímicas del ingrediente funcional (solubilidad, pH, estabilidad, termoestabilidad, fotoestabilidad, etc.).
- Composición microbiana (bacterias, mohos, levaduras, etc.).
- Composición química (nutrientes, actividad de agua, otros ingredientes distintos de los nutrientes, aditivos, aromas, etc.).
- Proceso de elaboración del alimento.
- Tipo y composición del envase del alimento.
- Alterabilidad y degradabilidad del ingrediente funcional.
- Interacciones del ingrediente funcional con el alimento.
- Compatibilidad del ingrediente funcional con el alimento.
- Sistema de consumo del alimento (en frío, caliente, hervido, cocido, frito, etc.).
- Procedimiento de conservación del alimento (en frío, congelado, a temperatura ambiente, templado, en caliente, con atmósfera modificada, etc.).

### Selección del sistema de adición del carotenoide y elaboración del alimento funcional:

- Fijación de fórmulas preliminares.
- Aplicación de buenas prácticas de elaboración (BPE).
- Adopción de buenas prácticas de higiene alimentaria (BPHA), observando el Reglamento Europeo (CE)178/2002 y Reglamento Europeo (CE)852/2004
- Implantación de la Norma ISO-22.000 (Seguridad e inocuidad de los alimentos).

- Puesta en vigor de una Guía APPCC.
- Adición de los carotenoides en las dosis y procedimientos apropiados para garantizar la concentración necesaria en el alimento.

## ASPECTOS PRINCIPALES PARA GARANTIZAR UN DESARROLLO SOSTENIBLE DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN EL CONTEXTO DE LA ALIMENTACIÓN GENERAL

- Determinar con rigor los perfiles nutricionales de los alimentos en la Unión Europea.
- La relación de ingesta de los diferentes tipos de alimentos.
- Listado de alimentos que no se podrán “funcionalizar”, es decir, a los que no se podrán aplicar los ingredientes funcionales, con base en su naturaleza y composición.
- Valores mínimos que producen los efectos saludables y máximos aceptables de uso, para los nutrientes y otras sustancias con propiedades saludables (listado a proporcionar por el Reglamento (CE) 1925/2006).
- Los beneficios a aportar por los alimentos funcionales, que se hallen en las listas de las declaraciones autorizadas.
- Establecer una clara distinción entre alimentos funcionales, nutracéuticos, cosmeceúticos y medicamentos, para evitar la confusión de los consumidores.
- Buenas prácticas industriales en la elaboración de los alimentos funcionales, para garantizar la máxima calidad, estabilidad y durabilidad de los productos a los consumidores.

- Disponer de evidencias científicas solventes, rigurosas y consistentes sobre las propiedades saludables de los ingredientes saludables, para optar a su autorización de empleo en los alimentos.

## UNA HERRAMIENTA BÁSICA PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES: LA INNOVACIÓN

Es un concepto fundamental para el diseño de los alimentos funcionales, para garantizar una mejora sostenible en los mismos, con base en la adición de carotenoides especiales distintos de los existentes en el mercado a los alimentos funcionales y con propiedades saludables diferentes de los comercializados en la actualidad

Los conceptos oficiales aplicables sobre la innovación son tres, y dos de ellos se aplican a los carotenoides: Innovación radical: consecución mediante la adición de uno o más carotenoides de un alimento totalmente original y nuevo, que posea nuevos atributos, prestaciones y funciones distintas de otros alimentos de tipo similar presentes en el mercado. Innovación incremental: consecución mediante la introducción de un o más carotenoides de una mejora significativa y notable de los alimentos ya existentes en el mercado, o bien por cambio de la concentración del carotenoide existente.

Innovación procesal (no aplicable a la adición de carotenoides): Logro de un perfeccionamiento significativo del método de producción, optimizando el rendimiento y la fiabilidad del alimento funcional.

## CONCLUSIONES

- Los carotenoides son excelentes sustancias bioactivas para desarrollar alimentos funcionales.
- Las propiedades saludables expuestas en este libro muestran que los carotenoides poseen muchos beneficios para la salud humana.
- El grado de aplicabilidad de los carotenoides en alimentos funcionales es muy elevado, ya que pueden utilizarse en un gran número de alimentos con toda garantía.
- Es necesario utilizar de preferencia aquellos carotenoides que posean la biodisponibilidad más elevada, para conseguir mejores efectos beneficiosos, ya que el porcentaje de biodisponibilidad de estos compuestos es normalmente bajo (típicamente entre 5-15%).
- Estudios científicos relevantes acreditados, han demostrado que es preferible consumir los carotenoides en alimentos en vez de hacerlo en complementos alimenticios. Así, en algunos casos, a dosis muy altas en algunas poblaciones de riesgo podrían tener efectos negativos para la salud, lo que se comprobó en el caso del  $\beta$ -caroteno.
- El procesamiento previo de los carotenoides puede incrementar su biodisponibilidad.
- Las dosis de empleo para conseguir efectos saludables son bajas, con las consiguientes ventajas económicas que ello supone.
- La estabilidad general de los carotenoides como sustancias bioactivas es aceptable en comparación con otros tipos de ingredientes funcionales.
- La detección analítica de la presencia de carotenoides en los alimentos funcionales es muy buena, a diferencia

de lo que ocurre con otros ingredientes funcionales. El CEN/TC275/WG9 (Centro Europeo de Normalización Horizontal de Alimentos, grupo de trabajo 9, vitaminas y carotenoides) ha desarrollado métodos científicos de análisis de gran confiabilidad, precisión y eficacia, para poder identificar y cuantificar carotenoides de interés.

- Es preciso adoptar un protocolo riguroso para el desarrollo de los alimentos funcionales que asegure la perfecta incorporación de los carotenoides en los alimentos funcionales, tal como el presentado en este capítulo.
- Dado el escaso consumo de frutas, hortalizas y verduras (principales fuentes dietéticas de los carotenoides), el consumo estimado de carotenoides es de unos 9.5mg/día. Esta cantidad parece a todas luces insuficiente para observar efectos saludables, por lo que el desarrollo y

comercialización de alimentos funcionales a base de carotenoides, se convierte en una excelente oportunidad de negocio para las empresas alimentarias.

- En la Estrategia NAOS, establecida en España por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI) y desarrollada por Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentación y Nutrición (AECOSAN), para reducir la Obesidad Infantil y el Sobrepeso, se enfatizó la necesidad de estimular un mayor consumo de frutas, hortalizas y verduras y con ello incrementar la ingesta de carotenoides. La red IBERCAROT entra de lleno en de este escenario, al destinar sus esfuerzos al desarrollo de alimentos funcionales ricos en carotenoides como sustancias bioactivas

## REFERENCIAS

- Directiva 2008/100/CE (Lista del CDR de los Nutrientes [Vitaminas y Minerales]), 2008.
- Reglamento Europeo (CE) 1924/2006 (Declaraciones saludables de nutrientes y de otras sustancias con propiedades saludables).
- Reglamento Europeo (CE) 1925/2006 (Adición de vitaminas, minerales y otras sustancias a los alimentos).
- Reglamento Europeo (UE) 1129/2011 (Lista de aditivos alimentarios autorizados en los alimentos).
- Reglamento Europeo (UE) 1169/2011 (Información alimentaria facilitada al consumidor).
- Reglamento Europeo (UE) 231/2012 (Lista de especificaciones de los aditivos alimentarios).
- Reglamento Europeo (UE) 432/2012 (Lista de declaraciones saludables autorizadas en los alimentos).
- Cadaval, A., Artiach Escauriaza, B., Garina Barrutia, U., Pérez Rodrigo, C. Aranceta, J. 2005. Alimentos Funcionales. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria.
- Gavilán, A. 2009. *Guía de elaboración de productos funcionales*. Barcelona: Ergón Ediciones.
- Stahl, W., Schwartz, W. y Sies, H., 1993. *Journal of Nutrition* 123: 847-851.
- De Pee, S. y West, C.E. 1996. *European Journal of Clinical Nutrition* 50(3): S38-S53.
- Johnson, E, 2002. *Nutrition in Clinical Care* 5(2): 56-65.
- Martínez-González, M.A. y Estruch, R. 2004. *European Journal of Cancer Prevention* 13: 327-335.
- O'Neil, M.E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den Berg, H., Hininger, I., Rousell, A.M., Chopra, M., Southon, S., Thurnham, D.I. 2001. *British Journal of Nutrition* 85: 499-507
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., Bravo, L. 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3342-3347.
- Serrano, J., Goñi, I. y Saura-Calixto, F. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2936-2940.
- Van der Hof, K., Tijburg, L., Pietrzik, K., Westrate, J. 1999. *British Journal of Nutrition* 82: 203-212.

## CAPÍTULO 30

# SEGURIDAD DE LOS CAROTENOIDES: ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS, REACCIONES ADVERSAS E INTERACCIONES CON FÁRMACOS

Liliana Vargas-Murga



### INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son compuestos de gran interés para la industria alimentaria. Aunque tradicionalmente se han empleado como colorantes, su uso como ingredientes de alimentos funcionales y otros productos —como suplementos, alimentos dietéticos y enriquecidos, entre otros— está cada vez más extendido. Es necesario, por tanto, llevar a cabo evaluaciones de su seguridad.

Grupos de expertos han evaluado la seguridad de algunos carotenoides en el ámbito europeo e internacional, con base en la revisión de todos los datos toxicológicos disponibles, que provienen de observaciones realizadas en humanos y animales, y han emitido sus correspondientes opiniones científicas y recomendaciones. Estas evaluaciones establecen las cantidades que se pueden añadir a cada producto, de manera que no represente riesgo alguno para la salud humana. Algunos de los

principales parámetros de evaluación toxicológica son la dosis letal 50 (DL50), el nivel sin efecto observable (NOEL), y el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL), a partir de los cuales se calculan la ingesta diaria admisible (IDA) y la cantidad máxima recomendada (CMR). Los valores de la DL50 se emplean con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. El NOEL es la mayor cantidad de una sustancia que no causa alteraciones en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los animales tratados, en comparación con animales de control. El punto de partida para fijar la IDA es la determinación del NOAEL. Este parámetro se determina en animales y es el máximo nivel dietético de una sustancia con el que no se observa ningún efecto adverso demostrable. La IDA es la cantidad de una sustancia que se puede consumir en la dieta diariamente, durante toda la vida, sin que represente un riesgo apreciable para la salud. Este índice se calcula con un amplio margen de seguridad. Finalmente la CMR o límite seguro de una sustancia es la máxima cantidad de la misma que se puede consumir a diario sin ningún efecto adverso.

Existe abundante evidencia científica que reporta los beneficios de los carotenoides en los diferentes tipos de cánceres, enfermedades cardiovasculares y oculares asociadas a la edad, entre otras. Si bien es cierto que una ingesta moderada o elevada de alimentos ricos en carotenoides no representa ningún riesgo para la salud, no sucede lo mismo con una ingesta excesiva de suplementos a base de carotenoides. En el primer caso, a veces se puede producir una pigmentación excesiva de la piel, conocida como carotenodermia. Mientras que en el segundo caso, el consumo elevado de suplementos puede representar cierto riesgo para la salud de personas susceptibles, como son los fumadores intensos, trabajadores del asbesto, mujeres embarazadas y que estén amamantando, entre otras.

En este capítulo se revisa la información relativa a la seguridad de la astaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina con base en las evaluaciones realizadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios que trabaja bajo los auspicios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS). También se han considerado algunas publicaciones recientes. Estos carotenoides se encuentran entre los más importantes a escala comercial. Para cada uno de ellos se describen estudios toxicológicos, reacciones adversas e interacciones con fármacos. En el primer apartado se incluyen la toxicidad aguda, subaguda, subcrónica, crónica, carcinogénica, genotoxicidad, de la reproducción y el desarrollo, alergenicidad e irritación.

## ASTAXANTINA

La astaxantina es una xantofila de color rojizo, presente en diversos microorganismos y animales. Existen diversos estereoisómeros, que se pueden encontrar de forma libre y esterificada. Se considera que los principales productores de este carotenoide son microorganismos. Desde un punto de vista comercial destaca la microalga *Haematococcus pluvialis*. Los animales (crustáceos, peces y aves) que ingieren grandes cantidades de fuentes ricas en astaxantina adquieren una coloración rojiza característica. Además de su papel como colorante, existe un gran interés por su actividad antioxidante, que podría reducir el riesgo de padecer algunas enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inmunitarias, la diabetes, la degeneración macular y algunos tipos de cáncer (Ranga Rao *et al.*, 2014).

## Estudios toxicológicos

Existen diversos estudios toxicológicos, *in vitro* e *in vivo* que indican que el consumo de astaxantina presente en los alimentos y en suplementos alimenticios a las dosis recomendadas es seguro y no ocasiona efectos tóxicos ni reacciones adversas significativas.

- Toxicidad aguda: La toxicidad aguda de la astaxantina procedente de diferentes fuentes (*Phaffia rhodozyma*, *H. pluvialis*, *Paracoccus carotinifaciens* y de origen sintético) fue evaluada en ratas y ratones. Los valores de la DL50 oscilan entre 23.3 y 252 mg/kg de astaxantina, sin presentar efectos tóxicos, excepto la coloración en las heces y en órganos internos (EFSA, 2005, 2005a, 2007, 2007a, 2014a, 2014b).
- Toxicidad subaguda: La toxicidad subaguda del extracto de *P. rhodozyma* y biomasa de *H. pluvialis* (con contenidos variables de astaxantina) se evaluó en ratas. Las concentraciones a las que no se observaron efectos adversos (NOAEL) fueron superiores a 1000 y 6000 mg/kg, respectivamente (Tago *et al.*, 2014; EFSA, 2014b).
- Toxicidad subcrónica: La astaxantina (*E. superba*, *P. carotinifaciens*, *P. rhodozyma*, *H. pluvialis* y de origen sintético) fue estudiada por vía oral entre dos y 13 semanas. Los valores de NOAEL oscilaron entre 10 y 750 mg/kg/día de astaxantina. Se observaron coloraciones rojizas en las heces, piel y tejido adiposo (Katsumata, Ishibashi y Kyle, 2014; EFSA, 2014a, 2014b, 2009, 2007, 2007a, 2005).
- Toxicidad crónica y carcinogenicidad: No se observaron

efectos tóxicos importantes al evaluar la astaxantina sintética, durante un año. Se establecieron unos NOAEL de entre 200 y 1200 mg/kg/día en ratas y perros. Tampoco mostró ser carcinógena en modelos animales (ratas y ratones). Los valores de NOAEL oscilan entre 14 y 140 mg/kg/día de astaxantina. Sólo se presentaron pigmentaciones de las heces y del tejido adiposo (EFSA, 2007, 2014a).

- Genotoxicidad *in vitro*, *in vivo*: Diversos estudios acerca del potencial mutágeno y genotóxico de varias fuentes de astaxantina (*P. rhodozyma*, *H. pluvialis*, *P. carotinifaciens* y de origen sintético) se llevaron a cabo con ensayos *in vitro* (reversión de la mutación y aberración cromosómica) e *in vivo* (micronúcleos). Las diversas formulaciones de astaxantina demostraron no tener efectos mutagénico ni genotóxico (EFSA, 2005, 2005a, 2007, 2007a, 2014, 2014a).  
Recientemente se ha evaluado la genotoxicidad *in vitro* (reversión de la mutación) e *in vivo* (micronúcleos en médula ósea de ratón) del extracto de *P. rhodozyma*, no observándose efectos mutagénicos ni aberración cromosómica (Tago *et al.*, 2014).
- Toxicidad durante la reproducción y el desarrollo: La astaxantina sintética no demostró tener efectos embriotóxico, fetotóxico, teratogénico ni afectar la normal reproducción, al realizar estudios multigeneraciones y de desarrollo (EFSA, 2005a, 2007, 2014, 2014a).
- Alergenicidad e irritación: En cuanto a la capacidad de desencadenar reacciones alérgicas, a causa de proteínas residuales, la astaxantina (sintética, *E. superba*, *H. pluvialis*) resultó no ser sensibilizante

y moderadamente sensibilizante (*P. rhodozyma*) dermal. La astaxantina proveniente de *P. rhodozyma*, *P. carotinifaciens* y sintética no se consideran irritantes dérmicos. En referencia a la irritación ocular, los resultados han sido variables dependiendo de la procedencia de la astaxantina: sintética (no irritante), *P. rhodozyma* (ligeramente irritante) y *P. carotinifaciens* (irritante) (EFSA, 2005, 2007, 2007a, 2009, 2014a, 2014b).

## Reacciones adversas

La ingesta de cantidades superiores a 4 mg/día de astaxantina, durante periodos prolongados, puede ocasionar alteraciones en la pigmentación de la piel, hormonales, en la función inmune y en el conteo de la sangre, así como disminución de la presión arterial, los niveles de calcio y glucosa en la sangre. Especial consideración se debe tener durante el embarazo y el amamantamiento, debido a que la astaxantina puede inhibir la 5- $\alpha$ -reductasa, a dosis de 800 mg, según estudios realizados en voluntarios sanos (Natural Medicines, 2012).

- Carotenodermia: Un consumo excesivo de astaxantina puede ocasionar cambios en la pigmentación de la piel, se produce una coloración amarillenta a rojiza. Algunas personas pueden notar un ligero color anaranjado en sus heces mientras consumen astaxantina. Es un efecto inofensivo que desaparece después de cesar su consumo (Natural Medicines, 2012).

## Interacciones con fármacos

La astaxantina puede incrementar el riesgo de sangrado cuando se administra conjuntamente con fármacos como: aspirina, anticoagulantes (warfarina, heparina), antiplaquetarios (clopidogrel), anti-inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, naproxeno). Los pacientes diabéticos que reciben tratamiento con insulina o drogas para la diabetes deben ser debidamente monitoreados, debido a la disminución de los niveles sanguíneos de azúcar que ocasiona la astaxantina. La astaxantina también puede disminuir la presión arterial, razón por la cual se debe tener cuidado con la administración conjunta con fármacos hipotensores. En general, la astaxantina puede interferir con el metabolismo de fármacos que empleen el sistema citocromo P450. La concentración sanguínea de estos fármacos puede verse reducida y por lo tanto afectar su eficacia. Finalmente, este carotenoide puede interactuar con los inhibidores de la 5- $\alpha$ -reductasa, sales de calcio, fármacos hormonales, inmunomoduladores, entre otros (Natural Medicines, 2012; EFSA, 2009).

## $\beta$ -CAROTENO

El  $\beta$ -caroteno es un carotenoide ubicuo (IARC, 1998) que se puede transformar en el organismo en retinol (Institute of Medicine y Food and Nutrition Board, 2000). Además de su papel como provitamina A, algunos estudios indican que podría tener otras actividades (por ejemplo antioxidante o inmunoestimuladora, entre otras) que podrían reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades (Di Tomo *et al.*, 2012; Khoo *et al.*, 2011).

## Estudios toxicológicos

Se dispone de un gran número de revisiones, monografías y otros documentos acerca de la seguridad del  $\beta$ -caroteno. A continuación se describen los estudios toxicológicos realizados en sus diferentes fuentes.

- Toxicidad aguda: La DL50 del  $\beta$ -caroteno (*Dunaliella bardawil*, *Blakeslea trispora*, sintético) varía entre 2000 y 20000 mg/kg en ratas, ratones y perros. Estos valores indican la baja toxicidad de este carotenoide (EU, 2000, 2000a; EFSA 2012, 2012a).
  - Toxicidad subaguda: En estudios de toxicidad subaguda, los valores de NOAEL del  $\beta$ -caroteno sintético fueron de 3809 (machos) y 4175 (hembras) mg/kg en ratas (EFSA, 2012a 2012a).
  - Toxicidad subcrónica: En diversas formulaciones de  $\beta$ -caroteno, procedentes de zanahorias, *D. bardawil*, *D. salina*, *B. trispora*, *Yarrowia lipolytica* y sintético, se evaluó por vía oral durante periodos de 28 y 90 días. Los valores de NOAEL oscilan entre 500 y 25000 mg/kg/día en ratas (EFSA, 2012, 2012a; Grenfell-Lee *et al.*, 2014).
  - Toxicidad crónica y carcinogenicidad: Existen muchas investigaciones que ponen de manifiesto la actividad anticarcinogénica de la suplementación de  $\beta$ -caroteno, sólo o en combinación con otros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, selenio, lecitina de soja, entre otros), empleando diferentes modelos animales. Esta actividad se ha probado en piel (ratón), hígado (rata), colon (rata y ratón), páncreas (rata y hámster), estómago (ratón), vejiga (ratón), glándula salival (rata), intestino delgado (rata) y adenocarcinomas y nefroblastomas (rata) (EU, 2000, 2000a; EFSA, 2012, 2012a).
- Por otro lado se han realizado estudios sobre la tumorigénesis (inducida experimentalmente) del tracto respiratorio en ratones y hámsters con resultados contradictorios, habiéndose observado que en algunos casos inhibe y en otros estimula. Esta contradicción se podría explicar por la inestabilidad del  $\beta$ -caroteno. Estos mismos resultados contradictorios se obtuvieron al emplear el hurón como modelo de cáncer de pulmón en humanos. De los resultados obtenidos se ha concluido que el  $\beta$ -caroteno no es carcinógeno a dosis de 6 mg/día, mientras que a dosis de 30 mg/día puede ser carcinógeno, especialmente en fumadores intensos (EFSA, 2012, 2012a).
- Genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*: Varios estudios *in vitro* realizados con pequeñas concentraciones de  $\beta$ -caroteno no mostraron efectos clastogénicos en cultivos celulares de glándula mamaria de ratón, ovario de hámster y hepatoma humano. Sin embargo al comparar diferentes concentraciones de  $\beta$ -caroteno en hepatoma celular, las bajas concentraciones mostraron una protección contra el daño del ácido desoxirribonucleico (ADN), que se perdió a altas concentraciones. El potencial citotóxico y genotóxico del  $\beta$ -caroteno y sus productos de descomposición en condiciones de estrés oxidativo fueron evaluados en hepatocitos de rata, células epiteliales del pigmento de la retina humana y ADN de timo de ternera. No se produjeron efectos citotóxicos, se mejoró el efecto genotóxico y se presentaron lesiones en el ADN de timo de ternera y en las células epiteliales del alvéolo humano. El  $\beta$ -caroteno ocasionó ruptura de las cadenas

ADN a altas presiones de oxígeno (EU, 2000; EFSA, 2012, 2012a).

Recientemente se ha evaluado la genotoxicidad de *Y. lipolytica*, una fuente alternativa de  $\beta$ -caroteno como ingrediente alimentario, mediante ensayos *in vitro* (reversión de la mutación, aberración cromosómica) e *in vivo* (micronúcleos en médula ósea de ratón). El extracto de *Y. lipolytica* no resultó ser mutagénico ni genotóxico (Grenfell-Lee *et al.*, 2014).

- Toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo: El  $\beta$ -caroteno (procedente de *D. bardawil* y sintético) no afecta la normal reproducción según estudios multigeneraciones en ratas. No obstante puede producir coloración rojiza en heces y piel. Tampoco presenta efectos embriotóxicos ni teratogénicos en ratas y conejos (EU, 2000, 2000a; EFSA, 2012, 2012a).
- Alergenicidad e irritación: El  $\beta$ -caroteno no se considera irritante para los ojos ni la piel, según estudios en conejos; tampoco se considera sensibilizante para la piel (EFSA 2012, 2012a).

## Reacciones adversas

Carotenodermia: Un elevado consumo de alimentos ricos en  $\beta$ -caroteno, así como de altas dosis de suplementos alimenticios (30 mg/día o más) pueden ocasionar pigmentación de la piel, especialmente en la palma de las manos y la planta de los pies. Esto se conoce como carotenodermia. Esta coloración es inofensiva y no es un signo de hipervitaminosis A. La carotenodermia desaparece tras limitar o eliminar el consumo de las fuentes carotenoides (EFSA, 2012).

Riesgo de cáncer de pulmón: La relación existente entre la presencia de altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer en general y cáncer en el tracto respiratorio no está bien establecida. Dos estudios: ATBC (Alpha-Tocopherol/Beta-Carotene Study) y CARET (CArotene and RETinol Efficacy Trial) revelaron que la ingesta de 20 y 30 mg/día de  $\beta$ -caroteno, respectivamente, durante largos periodos está asociada a un incremento de la incidencia de cáncer de pulmón en fumadores intensos y trabajadores expuestos al asbesto. Este incremento puede deberse a tres mecanismos de acción, entre otros: efecto en la actividad del citocromo P450, alteración de la señalización de los retinoides y actividad pro-oxidante (EU, 2000, 2000a; EFSA, 2012).

Dado que los resultados no son concluyentes, se recomienda no suplementar con altas dosis de  $\beta$ -caroteno a fumadores y otras poblaciones de alto riesgo. Se considera que la ingesta de cantidades inferiores de 15 mg/día de  $\beta$ -caroteno, como aditivo y suplemento alimenticio no ocasiona efectos adversos para la salud de la población en general, incluyendo los fumadores intensos (EFSA, 2012b).

## Interacciones con fármacos

El  $\beta$ -caroteno puede incrementar el riesgo de sangrado cuando se ingiere conjuntamente con aspirina, anticoagulantes (warfarina, heparina), antiplaquetarios (clopidogrel), y anti-inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, naproxeno). La ingesta conjunta de hipolipemiantes (atorvastatina, simvastatina, lovastatina, pravastatina) y  $\beta$ -caroteno puede reducir los niveles sanguíneos del carotenoide. Lo mismo sucede con la colesteramina y el colestipol, que pueden disminuir la concentración sanguínea del  $\beta$ -caroteno dietario

en 30-40% según un estudio de tres años en Suecia. Otro fármaco que puede reducir la absorción del  $\beta$ -caroteno, en 30%, es el orlistat, empleado en la pérdida de peso. Los medicamentos empleados en pacientes con Alzheimer, asma, cáncer, diabetes, gota, inflamación o úlceras, también pueden interactuar con el  $\beta$ -caroteno. La administración de medicamentos para la piel, los ojos (verteporfin), el estómago, los intestinos, los pulmones y el hígado pueden ocasionar interacciones con el  $\beta$ -caroteno. Por otro lado, un consumo excesivo de alcohol puede impedir la conversión del  $\beta$ -caroteno en retinol. Finalmente, el  $\beta$ -caroteno puede interactuar con antibióticos, antivirales, hormonas tiroideas y agentes que afecten los sistemas inmune, nervioso o musculoesquelético (Hawkins, 2006; Mayo Clinic, 2013).

## LICOPENO

El licopeno es un carotenoide de color rojo que se encuentra en algunos productos vegetales como el tomate, la sandía, la papaya y la guayaba, entre otros. La cantidad de licopeno presente en los productos a base de tomate (ketchup, zumo o jugo, salsas) suele ser mucho mayor que la que se encuentra en los alimentos frescos. Este carotenoide no tiene actividad como vitamina A, pero se considera que es un antioxidante muy eficiente, y puede presentar además otros mecanismos de acción. El consumo de alimentos ricos en licopeno está asociado a una reducción del riesgo de padecer diferentes tipos de cánceres, especialmente de próstata, enfermedades cardiovasculares y oculares asociadas a la edad (Story *et al.*, 2010).

## Estudios toxicológicos

La evaluación de la seguridad de las diferentes formulaciones de licopeno de distintos orígenes se basa en los estudios de toxicidad aguda, subaguda, subcrónica, crónica, carcinogénesis, genotoxicidad, reproductiva y del desarrollo, alergenicidad e irritación que se describen a continuación:

- Toxicidad aguda: La toxicidad de diversas formulaciones de dos fuentes de licopeno (tomate y sintético) es baja. La DL50 es superior a 3000 mg/kg en ratones (vía oral, subcutánea e intraperitoneal), y 5000 mg/kg en ratas (vía oral) (EFSA, 2005, 2005<sup>a</sup>, 2008, 2008a, 2008b, 2008c; Pronk *et al.*, 2007).
- Toxicidad subaguda y subcrónica: La toxicidad subaguda y subcrónica de varias formulaciones y fuentes de licopeno (tomate, *B. trispora* y sintético) se realizó por vía oral y durante períodos de 14 y cien días. Los valores de NOAEL están comprendidos entre 15 y 1000 mg/kg/día en ratas (mayoritariamente), ratones y perros (EFSA, 2005, 2005a, 2008, 2008a, 2008b, 2008c; Pronk *et al.*, 2007).
- Toxicidad crónica y carcinogenicidad: La toxicidad crónica del licopeno sintético en ratas se estudió durante 21 semanas y dos años. No se observaron efectos adversos ni tumores, excepto tasas elevadas de aspartato aminotransferasa (AST) y aspartato alanina transferasa (ALT). La presencia de pigmentación en las heces, hígado y otros órganos no se consideraron de importancia toxicológica (EFSA, 2005, 2008, 2008a, 2008b; 2008c; Pronk *et al.*, 2007).

- Genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*: La genotoxicidad *in vitro* de tres fuentes de licopeno (tomate, sintético y *B. trispora*) se llevó a cabo mediante los ensayos de reversión de la mutación y aberración cromosómica. Las preparaciones de licopeno no presentaron potencial mutagénico ni clastogénico (EFSA, 2005, 2005a, 2008, 2008a, 2008b, 2008c; Pronk *et al.*, 2007).

La genotoxicidad *in vivo* de diferentes preparaciones de licopeno, de origen natural y sintético, se evaluó mediante los ensayos de micronúcleos y cometa. No se observó daño cromosómico en células de médula ósea ni en linfocitos humanos (EFSA, 2005, 2005a, 2008, 2008a, 2008b, 2008c; Pronk *et al.*, 2007).

- Toxicidad reproductiva y del desarrollo: Los estudios multigeneracionales de licopeno sintético en ratas dieron como resultado un NOEL de 500 mg/kg/día. Dichos estudios no mostraron efectos tóxicos en la fertilidad, embarazo, número de crías, crecimiento de las crías o incidencia en la malformación fetal. Por otro lado, estudios de toxicidad del desarrollo con licopeno sintético, reportaron unos NOEL de 300 (ratas) y 200 (conejos) mg/kg/día. De los estudios se deduce que el licopeno sintético no afecta a la reproducción normal ni es teratogénico; sin embargo, en ambos estudios se observaron deposiciones pigmentarias en el hígado, especialmente en las hembras, y pigmentación rojiza en algunos órganos, colas y heces (EFSA, 2005, 2008, 2008a; Pronk *et al.*, 2007).
- Alergenicidad e irritación: Es poco probable que la escasa presencia de profilinas en las preparaciones de licopeno a partir de tomate y de *B. trispora* puedan desencadenar reacciones alérgicas. El licopeno de

tomate y sus productos derivados no se consideran sensibilizantes dérmicos en conejos y conejillos de indias. Las formulaciones de licopeno sintético y de tomate tampoco actúan como irritantes dérmicos ni oculares (EFSA, 2005, 2008a, 2008b, 2008c).

## Reacciones adversas

- Licopenodermia: Una ingesta elevada y continuada de alimentos o suplementos ricos en licopeno podría causar una coloración naranja en la piel (manos y pies), conocida como licopenodermia. También puede ocasionar problemas gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea). La pigmentación y las molestias desaparecen cuando se reduce o cesa el consumo de las fuentes de licopeno. La licopenodermia puede ocurrir a dosis más bajas que la carotenodermia, lo que se atribuye a que la coloración proporcionada por el licopeno es más intensa que la del  $\beta$ -caroteno (EFSA, 2005, 2005a, 2008; Pronk *et al.*, 2007).
- Riesgo de cáncer de pulmón: Se considera que es poco probable que el licopeno pueda tener una incidencia en el cáncer de pulmón en fumadores intensos, debido a las diferencias de estructura química y ruta metabólica existentes con el  $\beta$ -caroteno (EFSA, 2005).

## Interacciones con fármacos

Los fármacos hipocolesterolemiantes pueden disminuir la absorción del licopeno. La administración conjunta de licopeno y fármacos como la aspirina, anticoagulantes, antiplaquetarios y antiinflamatorios no esteroideos, puede ocasionar un incremento del riesgo de sangrado. El licopeno puede causar un descenso de

la presión arterial, razón por la cual se debe tener especial atención con pacientes que reciben medicación para bajar la tensión arterial. La ingesta conjunta de licopeno y los secuestrantes del ácido biliar (colestieramina y colestipol) pueden disminuir la concentración sanguínea del carotenoide. El licopeno también puede interactuar con fármacos que se emplean en el sistema inmune, el sistema nervioso, desórdenes pulmonares y estomacales, así como aquellos que incrementan la sensibilidad a la luz solar. En general el licopeno puede interactuar con los mismos fármacos que el  $\beta$ -caroteno (Mayo Clinic, 2013; Selvan *et al.*, 2011)

## LUTEÍNA

La luteína es una xantofila de color amarillo. Entre sus principales fuentes se encuentran vegetales verdes (espinacas, berros, col, brócoli, etc.), la yema del huevo, el maíz y los pétalos de algunas flores, principalmente *Tagetes erecta* (flores de clavel de moro). La luteína junto con la zeaxantina y un isómero de ésta, la *meso*-zeaxantina, son los principales carotenoides que se encuentran en la mácula lútea de la retina, por lo que es común referirse a estos compuestos conjuntamente como pigmentos o carotenoides maculares. Su capacidad antioxidante y filtrante de la luz solar se ha asociado con la reducción del riesgo de padecer enfermedades oculares relacionadas con la edad (degeneración macular y cataratas) y la salud ocular en general. Tiene un rol importante en el bloqueo de la luz azul y protege contra la luz intensa, de manera que se considera que favorece el rendimiento visual y disminuye la sensibilidad a la luz (Abdel-Aal, *et al.*, 2013).

## Estudios toxicológicos

- Toxicidad aguda: La toxicidad aguda del extracto de las flores de *Tagetes erecta* es baja. La DL50 es superior a 4000 mg/kg en ratas, por vía oral (EFSA, 2010, 2011; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Toxicidad subcrónica: La toxicidad subcrónica del extracto de las flores de *T. erecta* se llevó a cabo durante periodos de cuatro y 52 semanas, por vía oral. Los valores de NOAEL estuvieron comprendidos en el rango de 10 a 600 mg/kg/día en ratas, ratones y monos (EFSA, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Toxicidad crónica y carcinogenicidad: La valoración del efecto carcinogénico de la luteína (*T. erecta*) se llevó a cabo en ratas y ratones durante tres y diez semanas. No se observaron efectos adversos ni formación de tumores. Por el contrario, las preparaciones de luteína demostraron tener propiedades quimiopreventivas (Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*: La evaluación del potencial mutagénico de la luteína, procedente de diferentes fuentes (extracto de *T. erecta*, frutas y verduras) se llevó a cabo mediante dos ensayos *in vitro* (reversión de la mutación y aberración cromosómica). Las preparaciones ricas en luteína no presentaron actividad mutagénica ni tampoco clastogénica (EFSA, 2006, 2010, 2011; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).  
La genotoxicidad *in vivo* de diversos preparados ricos en luteína (extracto de *T. erecta*, polvo seco de espinaca, encapsulado) se estudió en dos tipos de

ensayo (micronúcleos y cometa), sin producir lesión del ADN (EFSA, 2009, 2010, 2011; Archer, Ishiwata y Walker, 2006) y este por el contrario, la luteína procedente de extractos de berenjena, *T. erecta* y alga roja, *Porphyra tenera* tiene la capacidad de modular los efectos genotóxicos de algunos mutágenos (aflatoxina B1, benzopireno, ciclofosfamida, peróxido de hidrógeno, 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina, 3-amino-1-metil-5H-piridol[4,3-b]indol). Esta modulación se comprobó en varios ensayos, tanto *in vitro* (reversión de la mutación, expresión génica) como *in vivo* (micronúcleos y cometa). Este efecto antimutagénico de la luteína se puede deber a la inhibición de la activación metabólica de los mutágenos (Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

- Toxicidad de la reproducción y del desarrollo: Los estudios de toxicidad del desarrollo con diferentes preparaciones de luteína, procedente de *T. erecta*, reportaron valores de NOAEL de 1000 mg/kg/día (ratas). No se presentaron efectos adversos, toxicidad materna ni propiedades teratogénicas o embriotóxicas (EFSA, 2008, 2010, 2011; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Irritación: Los preparados ricos en luteína a partir del extracto de *T. erecta* carecen de efectos irritantes a nivel dérmico y ocular (Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

## Reacciones adversas

Carotenodermia: Una ingesta elevada y continuada de preparaciones a base de extractos de *T. erecta* puede ocasionar una pigmentación naranja en la piel (manos y pies), conocida como carotenodermia. Esta anomalía desaparece cuando se reduce o cesa el consumo de las fuentes de luteína

(EFSA, 2006, 2008, 2009, 2010; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

## Interacciones con fármacos

No se han reportado.

## ZEAXANTINA

La zeaxantina es una xantofila de color amarillo-anaranjado. Entre sus principales fuentes se encuentran el maíz, la yema de huevo, algunas verduras y frutas de color anaranjado y amarillo (alfalfa, pimiento, naranja, mango, melocotón, etc.), pétalos (flores de clavel de moro, etc.) y microorganismos (*Flavobacterium sp*). La luteína, junto con su isómero óptico, la *meso-zeaxantina*, se encuentran en altas concentraciones en la mácula lútea de la retina. A ambos se les conoce como pigmentos o carotenoides maculares, como ya se dijo. No presenta capacidad de convertirse en vitamina A. Tiene propiedades antioxidante y filtrante de la luz solar, razón por la cual se relaciona con la reducción del riesgo de padecer enfermedades oculares asociadas con la edad (degeneración macular y cataratas) y la salud ocular. Desempeña un rol importante en el bloqueo de la luz azul y la protección contra los efectos perjudiciales de la luz intensa, de manera que se considera que favorece el rendimiento visual y disminuye la sensibilidad a la luz (Sajilata, Singhal y Kamat, 2008).

## Estudios toxicológicos

- Toxicidad aguda: La toxicidad aguda de la zeaxantina (de origen sintético y natural, *T. erecta*) fue evaluada por vía oral e intraperitoneal. Los valores de DL50, por vía

oral, fueron superiores a 8000 (ratones) y 4000 mg/kg (ratas); mientras que por vía intraperitoneal 840 (ratones) y 1100 (ratas) mg/kg. Estos valores indican una baja toxicidad de la zeaxantina (EFSA, 2008, 2009, 2012; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

La dosis máxima tolerada (MTD) de la meso-zeaxantina y la zeaxantina es de 10000 mg/kg (ratas y ratones) y la DL50 superior a 2000 mg/kg (ratones), lo que indica una baja toxicidad (Xu *et al.*, 2013; Ravi *et al.*, 2014).

- Toxicidad subcrónica: La toxicidad subcrónica de diferentes formulaciones de zeaxantina (sintética y de *T. erecta*) se llevaron a cabo por vía oral durante periodos de 13 y 52 semanas. Los valores de NOAEL se encuentran entre 20 y 1000 mg/kg/día en ratas, ratones, perros y monos. No se observaron efectos adversos significativos excepto la pigmentación de las heces y el tejido adiposo, así como un incremento de la concentración de zeaxantina en plasma e hígado (EFSA, 2008, 2009; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

Recientemente se ha evaluado la toxicidad subcrónica de la meso-zeaxantina y la zeaxantina en ratas durante 13 semanas. Los valores de NOAEL fueron de 300 (meso-zeaxantina) y 400 (zeaxantina) mg/kg (Xu *et al.*, 2013; Thurnham y Howard, 2013; Ravi *et al.*, 2014).

- Genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*: Varias formulaciones de zeaxantina (*T. erecta* y sintética) no mostraron tener efecto mutagénico ni genotóxico mediante ensayos *in vitro* (reversión de la mutación y aberración cromosómica) e *in vivo* (micronúcleos) (EFSA, 2008, 2009, 2012; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

Estudios recientes han demostrado la ausencia del efecto genotóxico de la meso-zeaxantina (*T. erecta*)

y zeaxantina empleando ensayos *in vitro* (reversión mutagénica) e *in vivo* (micronúcleos y daño al ADN espermático) (Ravi *et al.*, 2014; Thurnham y Howard, 2013).

- Toxicidad de la reproducción y del desarrollo: La zeaxantina sintética no presentó efectos sobre la reproducción y el desarrollo, con valores de NOAEL de entre 150 y 1000 (ratas) y 400 (conejas) mg/kg/día (EFSA, 2008, 2009, 2012; Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Alergenicidad e irritación: La zeaxantina no se considera un sensibilizante de la piel en conejillos de indias ni un irritante ocular en conejos (Archer, Ishiwata y Walker, 2006).

## Reacciones adversas

- Carotenodermia: Una ingesta elevada y continuada de preparaciones a base de extractos de *T. erecta* puede ocasionar una pigmentación naranja en la piel (palmas de las manos y plantas de los pies), conocida como carotenodermia. Esta anomalía desaparece cuando se reduce o cesa el consumo de las fuentes de luteína (Archer, Ishiwata y Walker, 2006).
- Riesgo de cáncer de pulmón: La zeaxantina tiene semejanzas estructurales con el  $\beta$ -caroteno que, a dosis muy altas de suplementos, puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en fumadores intensos y otros grupos de riesgo, como ya se ha comentado. Los datos disponibles indican que el consumo de alimentos ricos en zeaxantina no produciría este riesgo. No se

dispone de evidencia científica para afirmar que la ingesta de suplementos de zeaxantina no ocasione este riesgo en fumadores intensos (Archer, Ishiwata y Walker, 2006 ).

## Interacciones con fármacos

No se han reportado.

## CONCLUSIONES

Con base en la información toxicológica disponible, de estudios *in vitro*, *in vivo* y en humanos, se ha demostrado que, en general, los cinco carotenoides seleccionados: astaxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, no presentan efectos tóxicos significativos, con ingestas de entre 2-20 mg/día, según se indica más adelante para cada uno de ellos. Tampoco tienen propiedades carcinogénicas, mutagénicas, genotóxicas, reprotóxicas, embriotóxicas, fetotóxicas, teratogénicas, alergénicas ni irritantes, salvo algunas excepciones.

Las reacciones adversas de estos carotenoides casi siempre se refieren a la pigmentación de la piel (sobre todo las palmas de las manos y las plantas de los pies) tras ingestas elevadas de los mismos. Esta pigmentación conocida, en general, como carotenodermia, y específicamente como licopenodermia, en el caso del licopeno; no es nociva y desaparece cuando se disminuye o elimina el consumo. El aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón sólo se ha observado en el  $\beta$ -caroteno, cuando el consumo de suplementos a base de este carotenoide ha sido superior a 20 mg/día en fumadores intensos y trabajadores expuestos al asbesto.

En relación con las interacciones con fármacos de estos carotenoides, no existen estudios específicos, sino aquellos derivados de las observaciones y análisis de los estudios de toxicocinética y toxicidad crónica. En los casos de astaxantina,  $\beta$ -caroteno y licopeno se reportan interacciones con fármacos, especialmente los anticoagulantes, hipoglucémicos, hipotensores e hipocolesterolemiantes, entre otros.

En conclusión se puede decir que la ingesta de los carotenoides referidos en este capítulo es segura, siempre y cuando se tenga en cuenta la cantidad máxima recomendada (CMR), así como la ingesta diaria admisible (IDA) establecidas por los expertos y que se indican a continuación:

### Astaxantina

La utilización de las diferentes formulaciones de astaxantina de origen natural (camarón *E. superba*, microalga *H. pluvialis*, bacteria *P. carotinifaciens*, levadura *P. rhodozyma*) y sintético, como aditivo alimentario (E161j) e ingrediente alimentario es segura, si se usa teniendo en cuenta la CMR de 4 mg/día y la IDA de 0.034 mg/kg.

### $\beta$ -Caroteno

El  $\beta$ -caroteno, proveniente del hongo *B. trispora*, las microalgas *D. bardawil* y *D. salina*, de la zanahoria y de síntesis química, se emplea como aditivo alimentario (E160a (i), E160a (ii)) e ingrediente alimentario. La ingesta de los productos a base de  $\beta$ -caroteno no constituye riesgo alguno si se consume en cantidades inferiores a 15 mg/día, considerando una IDA de 0-5 mg/kg.

## Licopeno

El consumo de las distintas formulaciones de licopeno, procedentes del hongo *B. trispora*, de tomate y sintético, empleadas como aditivo alimentario (E161d) e ingrediente alimentario, es seguro si es inferior a la IDA de 0.5 mg/kg y se tiene en cuenta la CMR de 6-20 mg/día.

## Luteína y zeaxantina

La ingesta de las diferentes formulaciones de luteína y zeaxantina de origen natural (pétalos de *T. erecta*) y sintético, para su utilización como aditivo alimentario (E160b, E161h)

e ingrediente alimentario no representa ningún riesgo si es inferior a la CMR de 2 mg/día y teniendo como referencia una IDA de 0.5-2 mg/kg.

Por último, es importante resaltar, debido al gran interés que hay en encontrar fuentes alternativas y novedosas de estos carotenoides, la necesidad de realizar estudios específicos en humanos para establecer sus condiciones de seguridad (dosis, tipo de preparado, concentración, tipo de consumidor, etc.). Esto es necesario para establecer la IDA específica y no asumirla con base en su uso establecido como aditivo alimentario.

## REFERENCIAS

### Astaxantina

- EFSA. European Food Safety Authority. 2005. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 320: 1-19.
- EFSA. 2005a. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 291: 1-40.
- EFSA. 2007. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 574: 1-25.
- EFSA. 2007a. Panel on additives and products or substances used in animal feed. *European Food Safety Authority Journal* 546: 1-30.
- EFSA. 2009. Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 938: 1-17.
- EFSA. 2010. Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 8: 1428.
- EFSA. 2014. Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 12: 3724.
- EFSA. 2014a. Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed., *European Food Safety Authority Journal* 12: 3725.
- EFSA. 2014b. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 12: 3757.
- Katsumata, T., Ishibashi, T. y Kyle, D. 2014. *Toxicology Reports* 1: 582-588.
- Natural Medicines. 2012. *Natural Medicine Journal* 4(2). Disponible en: <http://naturalmedicinejournal.com/journal/2012-02/astaxanthin-review-literature> [consulta: 1 de abril de 2015].
- Ranga Rao, A., Phang, S.M., Sarada, R., Ravishankar, G.A. 2014. *Marine Drugs* 12: 128-152.
- Tago, Y., Fujii, T., Wada, J., Kato, M., Wei, M., Wanibuchi, H., Kitano, M. 2014. *Journal of Toxicological Sciences* 39(3): 373-82.

### β-caroteno

- Di Tomo, P., Canali, R., Ciavardelli, D., Di Silvestre, S., De Marco, A., Giardinelli, A., Pipino, C., Di Pietro, N., Virgili, F., Pandolfi, A. 2012. *Molecular Nutrition and Food Research* 56: 217-227.
- European Commission (EU) Directorate-General for Health and Consumer Protection Scientific Committee on Food. 2000. 159 Final: 1-28.

## REFERENCIAS

- EU, Directorate-General for Health and Consumer Protection, Scientific Committee on Food (SCF), 2000a. 37 Final: 1-21.
- EFSA. 2012. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. *European Food Safety Authority Journal* 10: 2593.
- EFSA. 2012a. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 10: 2737.
- EFSA. 2012b. Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. *European Food Safety Authority Journal* 10: 2953.
- Grenfell-Lee, D., Zeller, S., Cardoso, R., Pucaj, K. 2014. *Food and Chemical Toxicology* 65: 1-11.
- Hawkins, E.B. 2006. University of Maryland Medical Center. Disponible en: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement-interaction/possible-interactions-with-betacarotene> [consulta 24 de junio de 2015].
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 1998. *Handbooks of Cancer Prevention: Carotenoids*. Vol 2. Lyon: IARC.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. 2000. *β-carotene and Other Carotenoids. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington, D.C.: National Academy Press. 325-400.
- Khoo, H.E., Prasad, K.N.; Kong, K.W., Jiang, Y., Ismail, A. 2011. *Molecules* 16: 1710-1738.
- Mayo Clinic. 2013. Disponible en: <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/β-carotene/background/hrb-20058836> (consultada 01/04/2015).

## Licopeno

- EFSA. 2005. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 212: 1-29.
- EFSA. 2005a. Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contacts with Foods. *European Food Safety Authority Journal* 257: 1-17.
- EFSA. 2008. Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contacts with Foods. *European Food Safety Authority Journal* 677: 1-22.
- EFSA. 2008a. Panel on Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 676: 1-25.
- EFSA. 2008b. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 675: 1-22.
- EFSA. 2008c. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 893: 1-15.

## REFERENCIAS

- Pronk, M.E.J., Pelgrom, S.M.G.J., Knaap, A.G.A.C., DiNovi, M., Olempska-BerSixty, Z. 2007. Seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Ginebra: World Health Organization (WHO) *Food Additives Series* 58: 15-101.
- Selvan, V.K., Vijayakumar, A., Kumar, K.S., Singh, G.N. 2011. *Natural Medicine Journal* 3(3). Disponible en: <http://naturalmedicinejournal.com/journal/2011-03/lycopenes-effects-health-and-diseases> [consulta 25 de junio de 2015].
- Story, E.N., Kopec, R.E., Schwartz, S.J., Harris, G.K. 2010. *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 189-210.

### Luteína

- Abdel-Aal, E.S. M., Akhtar, H., Zaheer, K., Ali, R. 2013. *Nutrients* 5: 1169–1185.
- Archer, M.C., Ishiwata, H. y Walker, R. 2006. Sixty-third Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Ginebra: World Health Organization (WHO) *Food Additives Series* 54: 49-86.
- EFSA. 2006. Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *European Food Safety Authority Journal* 315, 1-12.
- EFSA. 2008. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 823: 1-24.

- EFSA. 2009. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 1098: 1-48.
- EFSA. 2010. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. *European Food Safety Authority Journal* 1678: 1-57.
- EFSA. 2011. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. *European Food Safety Authority Journal* 2144: 1-25.

### Zeaxantina

- Archer, M.C., Ishiwata, H. y Walker, R. 2006. Sixty-third Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Ginebra: World Health Organization (WHO) *Food Additives Series* 54: 159-190.
- EFSA. 2008. Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 728: 1-27.
- EFSA. 2009. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *European Food Safety Authority Journal* 1098: 1-48.
- EFSA. 2012. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *European Food Safety Authority Journal* 10(10): 2891.
- Ravi, K.B., Raghunatha Reddy, K.R., Shankaranarayanan, J., Deshpande, J.V., Juturu, V., Soni, M.G. 2014. *Food and Chemical Toxicology* 72: 30–39.

## REFERENCIAS

- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. y Kamat, M.Y. 2008. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7: 29- 49.
- Thurnham, D.I. y Howard, A.N. 2013. *Food and Chemical Toxicology* 59: 455–463.
- Xu, X., Zhang, L., Shao, B., Sun, X., Ho, C.T., Li, S. 2013. *Food Control* 32: 678-686.

# SOBRE LOS AUTORES

## **AGUILAR-ESPINOSA, MARGARITA**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán.

## **ALCALDE, MARÍA JESÚS**

Departamento de Ciencias Agroforestales  
Área de Producción Animal  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

## **ALONSO, GONZALO L.**

Cátedra de Química Agrícola  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

## **ÁLVAREZ, ROCÍO**

Departamento de Ciencias Agroforestales  
Área de Producción Animal  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

## **ANGAMAN, DJÉDOUX MAXIME**

UFR Agroforesterie  
Université Jean Lorougnon Guédé  
Daloa, Côte d'Ivoire

## **ARHAZEM, OUSSAMA**

Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

## **ÁVALOS, JAVIER**

Departamento de Genética  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

## **BAGUR, MARÍA JOSÉ**

Cátedra de Química Agrícola  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

## **BENÍTEZ-GONZÁLEZ, ANA**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos,  
Área de Nutrición y Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

## **BERMAN, JUDIT**

Departamento Producción Vegetal y Ciencia Forestal  
Universitat de Lleida – Agrotecnio  
Lleida, España

## **BONET, MARÍA LUISA**

Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología  
Nutrigenómica, Universitat de les Illes Balears y CIBER  
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn)  
Palma de Mallorca, España

**BORONAT, ALBERT**

Centre de Recerca en Agrogenòmica  
Consorti CSIC-IRTA-UAB (CRAG)  
Cerdanyola del Vallès, España  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona  
Barcelona, España

**CANAS, JOSÉ A.**

Metabolism and Diabetes, Nemours Children's Clinic  
Jacksonville, Estados Unidos de América

**CAPELL, TERESA**

Departamento Producción Vegetal y Ciencia Forestal  
Universitat de Lleida – Agrotecnio  
Lleida, España

**CÁRDENAS-CONEJO, YAIR**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán

**CARLE, REINHOLD**

Institute of Food Science and Biotechnology  
Hohenheim University  
Stuttgart, Alemania  
Biological Science Department  
King Abdulaziz University  
Arabia Saudí

**CERDA, ARIEL**

Centro de Biología Molecular Vegetal, Departamento de Biología  
Universidad de Chile  
Santiago, Chile

**CHACÓN-ORDÓÑEZ, TANIA**

Escuela de Tecnología de Alimentos  
Universidad de Costa Rica  
San Pedro, Costa Rica

**CHRISTOU, PAUL**

Departamento Producción Vegetal y Ciencia Forestal  
Universitat de Lleida – Agrotecnio  
Lleida, España  
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)  
Barcelona, España

**CUÉLLAR, FABIO A.**

Dpto. Ciencia de los Alimentos  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)  
Valencia, España

**DE POURCQ, KAREL**

Centre de Recerca en Agrogenòmica  
Consorti CSIC-IRTA-UAB (CRAG)  
Cerdanyola del Vallès, España

**DIAS, MARIA DA GRAÇA**

INSA- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
Lisboa, Portugal

**ESQUIVEL, PATRICIA**

Escuela de Tecnología de Alimentos  
Universidad de Costa Rica  
San Pedro, Costa Rica

**ESTÉVEZ-SANTIAGO, ROCÍO**

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC)  
Madrid, España

**FARRE, GEMMA**

Departamento de Biología Metabólica  
John Innes Centre  
Norwich, Reino Unido

**GALLARDO-GUERRERO, LOURDES**

Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**GÁMBARO, ADRIANA**

Sección Evaluación Sensorial, Departamento de Alimentos  
Universidad de la República  
Montevideo, Uruguay

**GANDUL-ROJAS, BEATRIZ**

Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**GARCÍA ROMERO, JOSEFA**

Grupo de Investigación en Acuicultura  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Telde, España

**GARCÍA-RODRÍGUEZ, MARÍA DEL VALLE**

Cátedra de Química Agrícola  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

**GARRIDO-FERNÁNDEZ, JUAN**

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos,  
Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**GARZA-CALIGARIS, LUZ ELENA**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán

**GAVILÁN BRAVO, ANDRÉS**

Asociación de Fabricantes y Comercializadores  
de Aditivos y Complementos Alimentarios (AFCA)  
Barcelona, España

**GINÉS, RAFAEL**

Grupo de Investigación en Acuicultura  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Telde, España

**GODOY-HERNÁNDEZ, GREGORIO**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán

**GÓMEZ-GÓMEZ, LOURDES**

Instituto Botánico. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

**HEMPEL, JUDITH**

Institute of Food Science and Biotechnology  
Hohenheim University  
Stuttgart, Alemania

**HEREDIA, FRANCISCO J.**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos,  
Área de Nutrición y Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**HERNÁNDEZ-GRAS, FRANCESC**

Centre de Recerca en Agrogenòmica  
Consorti CSIC-IRTA-UAB (CRAG)  
Cerdanyola del Vallès, España

**HORNERO MÉNDEZ, DÁMASO**

Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**IZQUIERDO, MARISOL**

Grupo de Investigación en Acuicultura  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Telde, España

**JARÉN-GALÁN, MANUEL**

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos,  
Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**JIMÉNEZ, VÍCTOR M.**

CIGRAS  
Universidad de Costa Rica  
San Pedro, Costa Rica  
Food Security Center  
University of Hohenheim  
Stuttgart, Alemania

**LADO, JOANNA**

Dpto. Ciencia de los Alimentos  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)  
Valencia, España  
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)  
Salto, Uruguay

**LIMÓN, M. CARMEN**

Departamento de Genética  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**LUGO-CERVANTES, EUGENIA**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán

**LUQUE DE CASTRO, MARÍA DOLORES**

Departamento de Química Analítica  
Universidad de Córdoba  
Córdoba, España

**MALDONADO, ELIANA M.**

Centro de Tecnología Agroindustrial  
Universidad Mayor de San Simón  
Cochabamba, Bolivia

**MAPELLI-BRAHM, PAULA**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos,  
Área de Nutrición y Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**MARTÍNEZ VÁZQUEZ, ANA**

Instituto de Investigaciones en Materiales  
Universidad Nacional Autónoma de México  
México D.F., México

**MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, ANTONIO J.**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos,  
Área de Nutrición y Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**MELLADO-ORTEGA, ELENA**

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos,  
Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**MERCADANTE, ADRIANA Z.**

Departamento de Ciencia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Campinas, Brasil

**MOLINA-CALLE, MARÍA**

Departamento de Química Analítica  
Universidad de Córdoba,  
Córdoba, España

**MURILLO, ENRIQUE**

Departamento de Bioquímica  
Universidad de Panamá  
Panamá, Panamá

**ODORISSI, ANA A.**

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos,  
Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**OLMEDILLA-ALONSO, BEGOÑA**

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC)  
Madrid, España

**ORNELAS-PAZ, JOSÉ DE JESÚS**

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.-Unidad  
Cauhtémoc  
Cd. Cauhtémoc, México.



---

---

**OSORIO, CORALIA**

Departamento de Química  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, Colombia

**PALOU, ANDREU**

Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología  
Nutrigenómica, Universitat de les Illes Balears y CIBER  
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn)  
Palma de Mallorca, España

**PÉREZ-GÁLVEZ, ANTONIO**

Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos,  
Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**RIBOT, JOAN**

Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología  
Nutrigenómica, Universitat de les Illes Balears y CIBER  
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn)  
Palma de Mallorca, España

**RIVERA-MADRID, RENATA**

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas  
Centro de Investigación Científica de Yucatán  
Mérida, Yucatán

**ROBAINA, LIDIA**

Grupo de Investigación en Acuicultura  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Telde, España

**ROCA, MARÍA**

Departamento de Fitoquímica de los Alimentos  
Instituto de la Grasa (CSIC)  
Sevilla, España

**RODRIGO, MARIA JESÚS**

Dpto. Ciencia de los Alimentos  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)  
Valencia, España

**RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, MANUEL**

Centre de Recerca en Agroquímica  
Consorci CSIC-IRTA-UAB (CRAG)  
Cerdanyola del Vallès, España

**RUBIO-MORAGA, ÁNGELA**

Instituto Botánico. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España

**RUIZ-SOLA, M. ÁGUILA**

Centre de Recerca en Agroquímica  
Consorci CSIC-IRTA-UAB (CRAG)  
Cerdanyola del Vallès, España

**SAAVEDRA, GLORIA F.**

Centro de Tecnología Agroindustrial  
Universidad Mayor de San Simón  
Cochabamba, Bolivia

**SALINAS, M. ROSARIO**

Cátedra de Química Agrícola  
Universidad de Castilla-La Mancha  
Albacete, España



---

**SCHWEIGGERT, RALF M.**

Institute of Food Science and Biotechnology  
Hohenheim University  
Stuttgart, Alemania

**SIMPSON, KEVIN**

Centro de Biología Molecular Vegetal, Departamento de Biología  
Universidad de Chile  
Santiago, Chile

**STANGE, CLAUDIA**

Centro de Biología Molecular Vegetal, Departamento de Biología  
Universidad de Chile  
Santiago, Chile

**STINCO, CARLA M.**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos, Área de Nutrición y  
Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**VARGAS-MURGA, LILIANA**

Biothani Europe S.L  
Sant Feliu de Buixalleu, España

**VICARIO, ISABEL M.**

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos, Área de Nutrición y  
Bromatología  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, España

**ZACARIAS, LORENZO**

Dpto. Ciencia de los Alimentos  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)  
Valencia, España

**ZHU, CHANGFU**

Departamento Producción Vegetal y Ciencia Forestal  
Universitat de Lleida – Agrotecnio.  
Lleida, España

**ZORRILLA-LÓPEZ, UXUE**

Departamento Producción Vegetal y Ciencia Forestal  
Universitat de Lleida – Agrotecnio.  
Lleida, España