

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

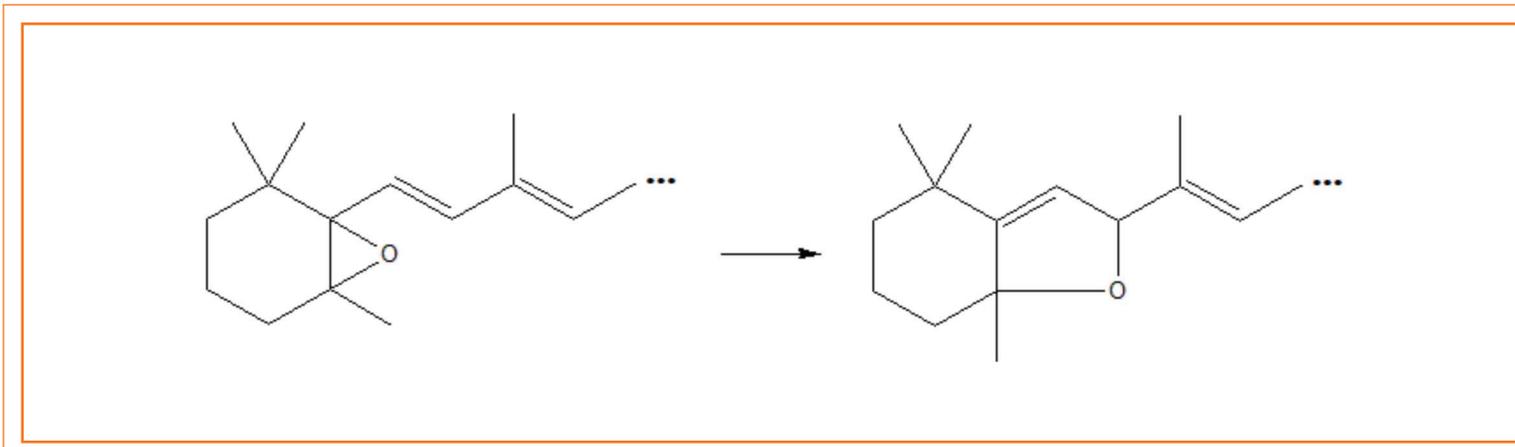


FIGURA 1. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

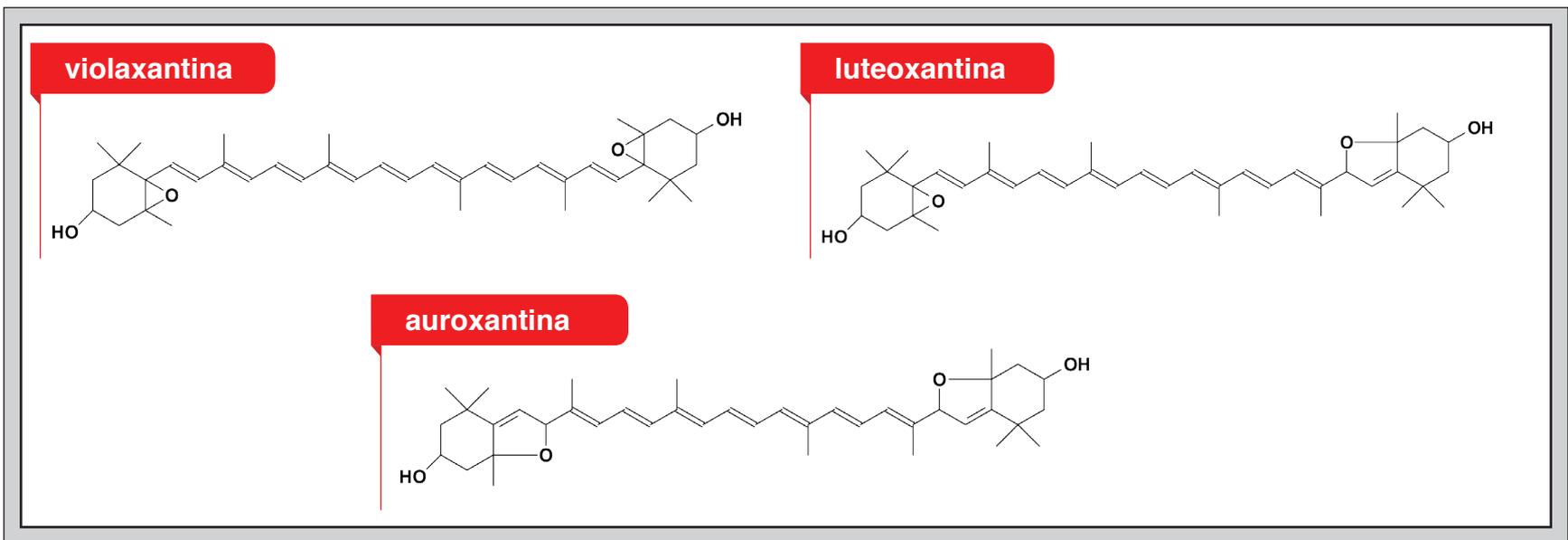


FIGURA 2. Estructuras químicas de la violaxantina (carotenoide con grupos 5,6-epóxidos) y sus derivados con grupos 5,8-furanoides (luteoxantina y auroxantina).

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 NaHCO_3 , MgCO_3 o 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 β -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.

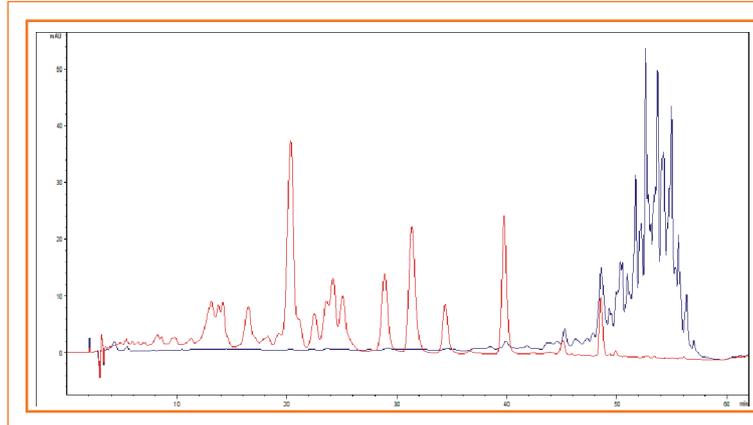


FIGURA 3. Cromatogramas a 450 nm correspondientes a un extracto de jugo de naranja antes (azul) y después de saponificar (rojo).

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.

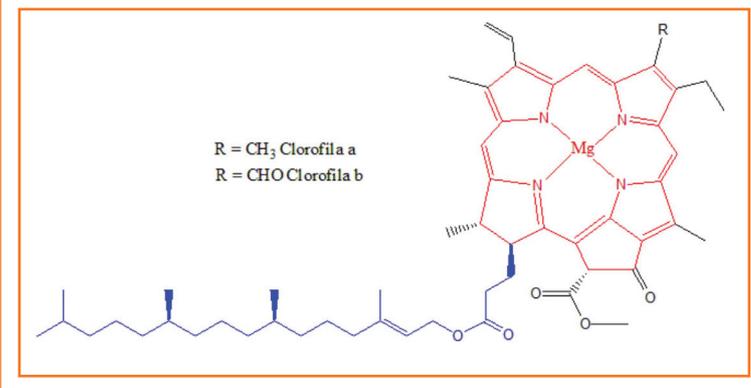


FIGURA 4. Estructuras de las clorofilas a y b.

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°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 μm 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 μL 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 inyectores 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.