



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Facultad de Química

**"MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
CAROTENOIDES"**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN.

Mauricio Iván Reyes Hernández

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

" METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES "

I N D I C E

I.- INTRODUCCION.

II.- ASPECTOS GENERALES DE LOS CAROTENOIDES.

II.1.- ISOPRENOIDES, PRECURSORES DE LOS CAROTENOIDES.

II.2.- NOMENCLATURA DE LOS CAROTENOIDES.

II.3.- ESTADO NATURAL.

II.4.- CLOROPLASTOS.

III.- PROPIEDADES DE LOS CAROTENOIDES.

III.1.- CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS CAROTENOIDES.

III.2.- VITAMINA "A" Y LOS CAROTENOIDES COMO PRECURSORES.

III.3.- EVALUACION DEL PODER PIGMENTANTE DE LOS CAROTENOIDES.

IV.- DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES.

V.- METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES.

V.1.- METODOS GENERALES.

V.1.1.- METODO DE WALL Y KSLLEY (A.O.A.C.).

V.1.2.- METODO DE LA A.O.A.C. MODIFICADO.

V.1.3.- METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

V.1.4.- METODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (H.P.L.C.).

V.2.- METODOS ESPECIFICOS PARA ALIMENTOS Y OTROS PRODUCTOS.

V.2.1.- METODO PARA DETERMINAR LUTEINA.

V.2.2.- METODO PARA LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN MATERIALES VEGETALES FRESCOS O SECOS.

V.2.3.- DETERMINACION DE CAROTENOS Y XANTOFILAS EN MATERIALES VEGETALES SECOS Y MEZCLADOS CON ALIMENTOS. METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

V.2.4.- DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN YEMA DE HUEVO.

V.2.5.- DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN PASTAS Y MACARRONES.

V.2.6.- DETERMINACION DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EN --
HARINAS.

V.2.7.- METODO DE RESONANCIA EN EL ESPECTRO DE RAMAN,
PARA DETERMINACION DE XANTOFILAS EN PLASMA -
SANGUINEO.

V.2.8.- IDENTIFICACION DE XANTOFILAS ESTERIFICADAS CON
ACIDOS GRASOS. METODO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSION.

VII.- CONCLUSIONES.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

I.- I N T R O D U C C I O N .

I.- INTRODUCCION .

La industrialización de los alimentos se fundamenta en el desarrollo científico de los métodos de elaboración. La cantidad de nutrientes y sustancias activas que se pierden durante la preparación casera es muy elevada. En cambio, la industria alimentaria mediante procedimientos técnicos puede tratar con mayor cuidado las materias primas, controlar la influencia desfavorable de la luz, del aire, de la humedad, etc., y compensar las inevitables pérdidas mediante la adición de sustancias preservativas, y además hacer que los productos alimenticios presenten una forma agradable y apetitosa, evitando en lo posible la pérdida de los colorantes naturales, y/o complementándolos con aditivos a base de pigmentos naturales.

Aparte de elaborar suficientes alimentos y de la preparación de productos de alto valor nutritivo y estables, la industria se preocupa por que sean agradables al consumidor.

El color de los alimentos es un factor significativo en su aceptación; al mostrar el alimento un color agradable, su apariencia natural lo presenta más aceptable. Cuando los alimentos muestran un color no esperado, se comienza a tener sospecha por el alimento, interpretándolo como posible señal de contaminación microbiológica, de un procesamiento ineficaz, o como una indicación de adulteración. La asociación de color y su aceptabilidad es universal, pero pueden existir diferencias significativas dependiendo de factores geográficos, étnicos, históricos y sociales, en que los alimentos pueden ser atractivos para un grupo y pueden ser no apetecibles o repulsivos para otros.

En la manufactura de productos alimenticios, la adición de colorantes es parte determinante en esta industria, aún cuando en los procesos

existentes se haya evitado en lo posible la pérdida de los colorantes naturales, ya que la coloración de los alimentos está relacionada directamente con el grado de aceptación, lo que se refleja en una mayor comercialización de los productos, tanto en el mercado interno como en el exterior. En la actualidad, el consumidor se ha acostumbrado tanto al aspecto de determinados productos coloreados, que algunos ya no se consumirían en su estado natural sin colorear. En estas circunstancias es comprensible que los productores de alimentos tiendan más y más al uso de las coloraciones artificiales, ya sea con productos naturales o sintéticos que tengan certificados sin evidencia toxicológica.

Los carotenoides tienen gran importancia como colorantes naturales en la industrialización de los alimentos, principalmente como agentes para impartir, estandarizar o resaltar los colores naturales, su aspecto legal y su valor fisiológico.

Siendo ampliamente difundida la utilización de los carotenoides como colorantes en productos alimenticios, la determinación analítica de dichos pigmentos es importante, sobre todo para evitar adulteraciones o la adición en cantidades superiores a las establecidas, ya que el contenido de dichos pigmentos en productos naturales se ve afectado cuando éstos últimos son procesados, por lo cual existe la tendencia a incrementar los niveles, siendo esto más frecuente en aquellos productos en los cuales el color es determinante para su cotización en el mercado, como es el caso de algunos jugos de frutas que son industrializados; carnes de aves, como la del pollo, así como los huevos de éstos animales, cuya pigmentación deficiente disminuye considerablemente su precio al público. Así, en las últimas décadas, y como consecuencia de la utilización de colorantes de todo tipo en productos alimenticios, las autoridades competentes e instituciones oficiales, han establecido que el uso de carotenoides en alimentos debe estar sujeto a ciertas normas de calidad .:

cantidad, que para efectos legales, no deben excederse.

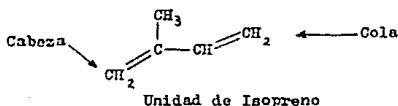
Como una derivación de éstas medidas, tanto las industrias, como las instituciones oficiales encargadas del control de las mismas, han adoptado el empleo de técnicas o métodos analíticos para determinar la presencia y cuantificar el contenido de carotenoides en productos destinados a la alimentación, tanto animal como humana.

Si bien, los niveles muy bajos de carotenoides en ciertos productos alimenticios repercuten en una apariencia indeseable de éstos últimos para el público consumidor, el contenido elevado de éstos pigmentos en los mismos productos, además de impartirles características excesivamente artificiales y elevar implícitamente el valor económico, puede resultar en la mayoría de los casos totalmente innecesario (excepto, desde el punto de vista nutricional, en aquéllos casos en los que se adicionen carotenoides precursores de la vitamina A). Así, por éstas razones, y para efectos de investigación, se justifica el desarrollo y la creación de métodos analíticos para la determinación de carotenoides.

II .- ASPECTOS GENERALES DE LOS CAROTENOIDES.

II.1.- ISOPRENOIDES, PRECURSORES DE LOS CAROTENOIDES .

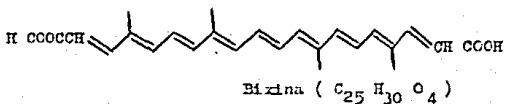
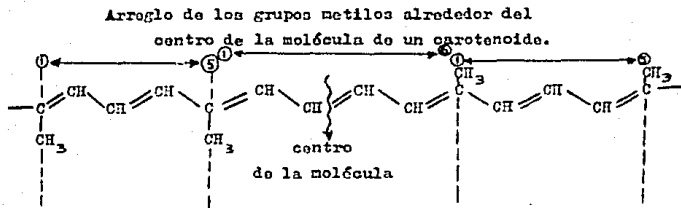
Los isoprenoides son compuestos naturales, estructuralmente formados por una o más unidades de isopreno ó 2 metil-1, 3 butadieno. Los tetraterpenos se forman con ocho de estas unidades. Por lo general, la cabeza de una unidad de isopreno se une a la cola de la más próxima para formar los isoprenoides, aunque existen también uniones cabeza-cabeza o cola-cola.



Los ejemplos más comunes de los tetraterpenos son los carotenoides (carotenos y xantofilas), compuestos de largos sistemas con dobles enlaces conjugados que son los responsables del color en flores y frutos.

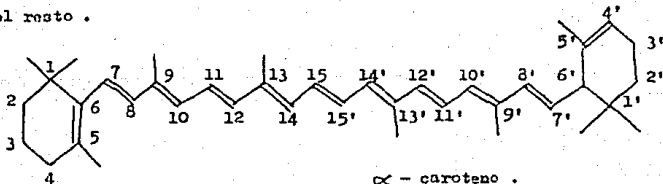
La definición de Carotenoides, propuesta por Karrer y aceptada por la Unión Internacional de Química establece que, "los Carotenoides son pigmentos amarillos y rojos de estructura alifática o alicíclica, compuestos de unidades de isopreno (generalmente 8), unidas de tal manera, que los dos grupos metilos más cercanos al centro de la molécula están en posiciones 1:6, mientras que los otros grupos metilos laterales están en posiciones 1:5. La serie de dobles ligaduras conjugadas constituye el sistema cromofórico de los carotenoides".

Esta definición incluye compuestos naturales como la vitamina "A", la azafranina, y otros productos, que se obtienen del fraccionamiento de los carotenoides conteniendo 40 átomos de carbono, como son los apo-carotenoides; así como aquéllos que tienen menos de 40 (8 residuos de isopreno), como la bixina.



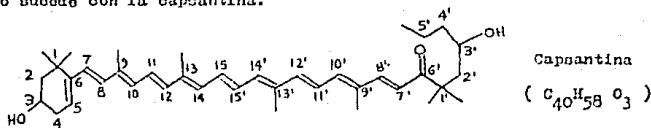
II.2.-NOMENCLATURA DE LOS CAROTENOIDES .

Los átomos de carbono de una molécula de carotenoides se numeran de acuerdo con el método propuesto por Karrer, considerando la molécula dividida en dos partes. Se numera empleando tanto números sencillos como números con apóstrofo; con los primeros se designa la parte que contenga el residuo ióna, mientras que los segundos son utilizados para el resto .



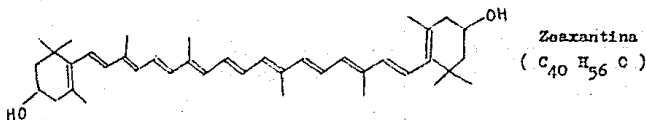
Si el caroteno es asimétrico, como el caso del β -caroteno; el residuo de β -ionona tiene preferencia sobre la mitad que contiene la

cadena abierta. Se sigue la misma regla para los carotenoides que estén abiertos en la posición 1 ó en otro punto de la molécula , como sucede con la capsantina.



Los carotenoides hidrocarburos son llamados por el término Carotenos, mientras los carotenoides conteniendo oxígeno en alguna función química son considerados como derivados de los Carotenos, teniendo así alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos, caracterizándolos por los prefijos hidroxí, ceto, aldo y carboxi, seguidos del nombre del caroteno patrón; por ejemplo: criptoxantina ó 3-hidroxí - β - caroteno.

En la actualidad se han empleado nombres triviales para identificar a los nuevos carotenoides, adicionando un prefijo apropiado que indique su fuente de origen; por ejemplo la zeaxantina, o xantofila del maíz , ó 3:3' - dihidroxí - β - caroteno, ó β - caroteno - 3:3' diol.



II.3.- ESTADO NATURAL.

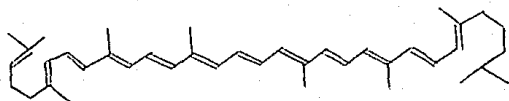
Los carotenoides (carotenos y xantofilas) no se encuentran libres en estado natural en plantas, sino formando complejos con proteínas, transformándoseles la propiedad de solubilidad en agua, presentándose así en el fluido celular. Sin embargo, dicha ocurrencia se hace más general-

zada en el reino animal. De los pigmentos vegetales ingeridos en la dieta por organismos animales; una parte es absorbida y otra es excretada. Los carotenoides absorbidos son distribuidos a diferentes partes del organismo, tejido graso, órganos internos, etc., localizándose en grasas o en la fase acuosa en forma de complejos. En la retina aparecen en estado coloidal.

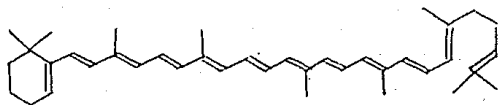
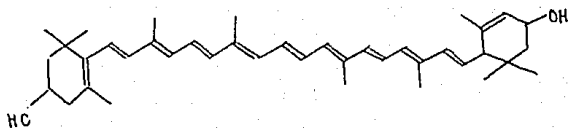
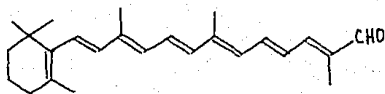
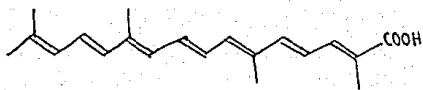
Se conocen cerca de 400 carotenoides naturales y se ha determinado la estructura química de más de 35. La característica química que los relaciona es la presencia en su molécula de un gran número de dobles ligaduras. También se conoce la fórmula empírica de alrededor de 50 carotenoides, de los cuales 45 contienen 40 átomos de carbono, y solamente 5 un número diferente.

Willstätter y Nieg fueron los primeros en reconocer la relación de los carotenoides con la unidad de isopreno. Dicha asociación dió origen a la hipótesis de que, la molécula de carotenoides podía ser formada dentro de la planta por la combinación de dos residuos de fitilo; al enlazarse los dos átomos de carbono terminales, por deshidrogenación. Así, todos los carotenoides pueden ser derivados de una sustancia original común, el Licopeno, el cual, por procedimientos de simples cambios químicos tales como ciclización, migración de doble ligadura, hidrogenación parcial, introducción de radicales (hidroxilo, cetónico, o grupos metoxilos), o la formación de un puente oxigenado, dan como resultado una serie de compuestos cuya absorción se encuentra dentro de la zona visible del espectro.

Esta consideración puede apreciarse observando las siguientes fórmulas de algunos carotenoides naturales.



Lycopeno

 β -carotenoXantofila
6 Luteina β -apo-12'-caroteno

Crocetina

II.4.- CLOROPLASTOS .

En muchas células existen estructuras citoplásmicas vivientes especializadas, denominadas plastidios. Generalmente son esféricos o elipsoidales, y pueden considerarse porciones del citoplasma especialmente diferenciadas para llevar a cabo una función particular en una célula.

Los plastidios son de tres clases, difiriendo en color y en la naturaleza del trabajo que ejecutan. Existen plastidios verdes llamados cloroplastos; otros incoloros denominados leucoplastos; y los cromoplastos, que pueden tener una coloración amarilla, café o roja.

El color verde de los cloroplastos se debe a la presencia de pigmentos (compuestos coloridos) que pueden disolverse en alcohol, éter, acetona y otros solventes orgánicos. Dos de éstos pigmentos (clorofila A y clorofila B) son verdes; los otros dos (Caroteno y Xantofila) son amarillos.

Frecuentemente se aplica al nombre de clorofila, erróneamente, a la mezcla de los cuatro pigmentos que pueden ser disueltos en alcohol. De esta mezcla de pigmentos, es posible separar los cuatro compuestos coloridos diferentes, cuyas fórmulas químicas son:

Clorofila A	C ₅₅	H ₇₂	O ₅	N ₄	MG
Clorofila B	C ₅₅	H ₇₀	O ₆	N ₄	MG
Caroteno	C ₄₀	H ₅₆			
Xantofila	C ₄₀	H ₅₆	O ₂		

La cantidad e intensidad del color en los pigmentos verdes son tales que, en gran parte, ocultan los pigmentos amarillos.

Son los cloroplastos los que dan color a las células verdes de las hojas y de las partes jóvenes de los tallos. Los órganos que no poseen normalmente cloroplastos, como los tubérculos de la papa, pueden desarrollar plastidios verdes cuando son expuestos a la luz; en tales casos los leucoplastos existentes son estimulados para producir pigmentos, transformándose en cloroplastos.

Los cromoplastos son responsables de los colores rojo, amarillo o anaranjado de muchas flores y frutos, los cuales, también deben parte de su color a los pigmentos caroteno y xantofila. Estos dos pigmentos se presentan también en los tejidos de los animales; el color amarillo de la yema del huevo, así como el color de la mantequilla, se deben a ellos, y existen pruebas de que la vitamina A liposoluble se forma a partir del caroteno, dentro de los organismos animales. ⁽⁷²⁾ debiéndose dicho descubrimiento a Steenbock, que en 1919 efectuó experimentos con β -caroteno.

Los carotenoides deben su nombre al término anglosajón "carrot", que significa zanahoria, ya que de ésta fuente se aislaron por primera vez, en 1831. Más de 60 carotenoides han sido aislados de diferentes plantas desde entonces. ⁽⁵⁴⁾

Los carotenoides han sido divididos en dos grupos: Carotenos y Xantofilas (nombradas así por Berzelius, en 1837). ⁽¹⁵⁾

Las Xantofilas son derivados originados de los Carotenos. Son en su mayoría alcoholes, aunque también hay aldehídos y cetonas, y algunos ácidos y ésteres.

Los carotenos, siendo hidrocarburos, son insolubles en agua; las hidroxi xantofilas son altamente solubles; en cambio, las que contienen grupos cetónicos no lo son.

En la naturaleza, el color de un producto vegetal generalmente tiene un pigmento predominante, con una mezcla de varios pigmentos en menores cantidades. Por ejemplo, la yema del huevo, debe su color principalmente a la zeaxantina, $C_{40}H_{56}O_2$, un dihidroxi β -caroteno, el cual también imparte su color amarillo al maíz. El color rosado del camarón es debido a la astaxantina, una xantofila cetónica. El color del cabello, la piel, las plumas, la leche y los huevos de animales, es afectado por los pigmentos de la dieta. Los colores de los flamings y los canarios, palidecen si la dieta no

(54)

contiene los pigmentos adecuados.

Originalmente se creyó que tanto los carotenos como las xantofilas se encontraban sólo en las hojas secas de los árboles, mismas que se desprenden durante el otoño. Más tarde, otras investigaciones demostraron que éstos pigmentos amarillos también se encuentran presentes en las hojas verdes .

Son una mezcla de policromos, lo cual se demostró al separarlos por cromatografía. A dicha mezcla se le denominó con el término de Carotenoides, aunque, por sus características de solubilidad, los pigmentos carotenoides se subclasificaron en Carotenos (que son muy solubles en solventes no-polares) y Xantofilas (menos solubles en solventes no-polares, pero miscibles en etanol). Ambos, son los principales pigmentos amarillos solubles en grasas, tanto vegetales como animales, por lo que reciben el nombre de Lipocromos (grasas colorantes). (115)

En un documento publicado en 1906, Michael Tswett (1872-1919) reportó que, al extraer los pigmentos de una planta con éter de petróleo, y pasando la solución a través de un tubo de vidrio empacado con carbonato de calcio finamente pulverizado, los pigmentos son adsorbidos selectivamente en el polvo. La Clorofila forma una banda verde cercana al tope de la columna, mientras otros pigmentos forman bandas amarillas más alejadas en dicha columna. Tswett llamó al resultado "cromatograma". Los pigmentos, podían ser removidos de la columna con alcohol. (54)

Los Carotenoides, siendo altamente insaturados, son muy susceptibles a la oxidación. En la planta están protegidos por las paredes celulares, pero durante su extracción, y después de ésta, gran parte del color se puede perder.

Son estables a la luz en ausencia de aire, pero se decoloran al exponerse a ambos. (54)

III.- PROPIEDADES DE LOS CAROTENOIDES .

III.1.-CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS CAROTENOIDES.

Los carotenoides puros cristalinos son muy sensibles a la oxidación y deben envasarse en atmósfera de gas inerte o al vacío. Desde que los carotenoides vienen usándose como colorantes alimentarios, el marcado efecto estabilizador de los tocoferoles y de la vitamina C, con sus ésteres de ácidos grasos es de particular importancia.

La oxidación de los carotenoides es acelerada por la luz y por catalizadores metálicos, particularmente cobre, manganeso y hierro. Hidroperóxidos de ácidos grasos, tal como el hidroperóxido linoleico, inician la descomposición radical; en soluciones oleosas pueden atacar directamente al carotenoide. Los rayos gamma causan la destrucción de los carotenoides por reacciones secundarias. También pueden destruirse por oxidación enzimática, que tiene un papel importante en la descomposición de las sustancias vegetales.

Otro problema encontrado durante la aplicación práctica de los carotenoides resulta de la poca solubilidad de éstos pigmentos naturales; completa insolubilidad en medios acuosos, poca solubilidad en aceites, y muy poca solubilidad en general son propiedades características de todos los carotenoides; cuanto más puros son los compuestos, más limitada es su solubilidad. (Tabla III)

En la caracterización de los carotenoides, uno de los más importantes datos es la determinación de los espectros de absorción máxima. Generalmente, éstos compuestos muestran de 2 a 3 bandas nítidas de absorción en el campo visible, entre los 400 y los 600 nm de longitud de onda. La posición y la extinción de éstas bandas pueden determinarse exactamente, y éstos datos, junto con otras constantes físicas, particularmente los resultados de la cromatografía en capa fina, pueden emplearse para la identificación. (Tablas I y II)

Tabla I. ALGUNOS DATOS FISICOS Y QUIMICOS DE LOS CAROTENOIDES SIMPLICIOS UTILIZADOS COMO COLORANTES.

Denominación Química	Fórmula empírica y Peso molecular	P.F.	Máximos de espectros de Absorción (*)	Color del producto puro cristalino	Maticos que se pueden conseguir
β - caroteno (trans)	$C_{40}H_{56}$ 536.89	176 - 182° C	Aprox. 456 y 435 nm.	Marrón - rojizo	Amarillo- naranja.
β -Apo-Carotonal (trans)	$C_{30}H_{40}O$	136 - 140° C	Aprox. 461 y 493 nm.	Gris - Violeta	Naranja a rojo.
Ester etílico del ácido - - Apocarotenico (trans)	$C_{32}H_{44}O_2$	134 - 138° C	Aprox. 449 y 475 nm.	Rojo Encendido	Amarillo a amarillo- anaranjado.
Gantaxantina (trans)	$C_{40}H_{52}O_2$	Aprox. 210° C.	Aprox. 470 nm.	Marrón violeta	Rojo

(*) Los carotenoides se isomerizan en solución, al calentarlos; el isómero predominante para obtener una mezcla equilibrada es el compuesto trans.

TABLA II .

PROPIEDADES DE ALGUNOS CAROTENOIDES DE IMPORTANCIA EN AVICULTURA .

Pigmento:	Punto de Fusión:	Forma (a) Cristalina:	Absorción Máxima (b)		
			nm :		
Xantofila o Luteína (1837) ^(c)	193 °C	Prismas violetas (d)	508	473	445
Zeaxantina (1929)	215.5 °C	Láminas amarillas	517	482	450
Criptoxantina (1932)	169 °C	Prismas lustrosos (e)	519	483	452

(a) Disolvente empleado: Metanol, excepto Criptoxantina (Metanol-Benceno)

(b) Disolventes: Disulfuro de Carbono.

(c) Año de su descubrimiento.

(d) Con una molécula de Metanol de cristalización.

(e) Retienen tenazmente algo de Metanol.

TABLA III .

SOLUBILIDAD DE LOS CAROTENOIDES SINTETICOS EMPLEADOS COMO COLORANTES ,
EN DIFERENTES SOLVENTES .

SOLUBILIDAD g/100 ml de solución a 20 °C	β -caroteno	β -Apo-8'- carotenal	Ester etílico del ácido β -apo-8'- carotenoico	Cantaxantina
Grasas, aceites	0.05-0.08	0.7-1.5	Aprox. 0.7	Aprox. 0.004
Agua	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Glicerol	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Etanol	Debajo de 0.01	0.1	Debajo 0.1	Debajo 0.01
Metanol	Debajo de 0.01	0.1	Aprox 0.5	Debajo 0.01
Ciclohexano	Aprox. 0.1	0.8	Aprox 2.0	Debajo 0.01
Eter de Petróleo (30 - 105 °C)	Aprox 0.1	Aprox 0.4	Aprox 0.7	Debajo 0.01
Eter	Aprox 0.1	Aprox 1.5	Aprox 2.5	Aprox 0.03
Cloruro de Metileno	Aprox 0.05	Aprox 25	Aprox 25	Aprox 3.0
Benceno	Aprox 2.0	Aprox 12	Aprox 16	Aprox 0.2
Cloroformo	Aprox 3.0	Aprox 20	Aprox 30	Aprox 10
Acetona	Aprox 0.1	Aprox 1.8	Aprox 1.2	Aprox 0.03
Disulfuro de Carbono	Aprox 0.5	Aprox 1.8	Aprox 15	Aprox 0.4

III.2.-VITAMINA "A" Y LOS CAROTENOIDEOS COMO PRECURSORES.

Entre los años 1913 y 1915 fué demostrada la existencia de un factor de crecimiento liposoluble, denominado vitamina A.

Experimentando, pudo observarse que, animales de laboratorio con deficiencia en vitamina A, podían volver a la normalidad administrándoles concentrados de plantas verdes, actividad relacionada con el contenido de carotenos, dándoles el nombre de provitaminas A. Las xantofilas carecen de ésta propiedad.

Los carotenos son sintetizados por todas las plantas, excepto por aquellas que son saprófitas y parásitas. Estas provitaminas A, son transformadas por el organismo animal a vitamina A. En ratas, cerdos, ovejas, cabras, conejos y pollos, la conversión de carotenos a vitamina A, ocurre en la pared intestinal; mientras que en el hombre, se cree que el hígado es el único órgano capaz de llevar a cabo ésta transformación.

Aunque teóricamente una molécula de β -caroteno puede producir dos moléculas de vitamina A, los experimentos, con miras cuantitativas, indican que la relación de conversión es más bien 1:1.

La vitamina A no se ha encontrado en el reino vegetal; se localiza con mayor frecuencia en los aceites de hígado de pescados, de donde se extrae comercialmente.

Los mamíferos, incluyendo al hombre, tienden a almacenar carotenos y excretar más xantofilas, mientras que las aves retienen más éstas últimas. Así, el color amarillo o amarillo-naranja que presentan la piel, la grasa, el pico de las aves, así como las yemas de sus huevos, es la resultante principal de la presencia de xantofilas.

El conocimiento de que el alimento juega un papel importante en la modificación de ésta coloración es muy conocido. Los alimentos a base de productos naturales tales como maíz amarillo, camotes, espinacas, hojas de lechuga, alfalfa y varias hierbas, abastecen a los animales de carotenos

y xantofilas. De éstas últimas, la que ha demostrado mejor aprovechamiento biológico es la Luteína o Xantofila.

Muchos de los carotenoides (tanto carotenos como xantofilas) son precursores de la vitamina A, y así poseen cierta actividad de vitamina A, además de sus características colorantes, por lo cual tienen importancia fisiológica.

Tabla IV.- ACTIVIDADES DE VITAMINA A DE ALGUNOS CAROTENOIDES.

Carotenoide	Actividad de Vitamina A (U. I. / g)
β - caroteno	1 667 000
α - caroteno	330 000
γ - caroteno	750 000
Equineonona	800 000
Criptoxantina	950 000
β -apo-8' carotenal	1 100 000
Ester etílico del ácido- β -apo 8' carotenico	420 000
β -apo 12' carotenal	2 000 000
β -zea caroteno	420 000
Citraxantina	Activa

Las funciones de los carotenos en aves, como precursores de la vitamina A, han sido estudiadas ampliamente, mientras que las funciones biológicas de las xantofilas no. En gallinas ponedoras, Palmer considera que las xantofilas carecen de importancia fisiológica, ya que el huevo es una ruta excretoria conveniente para las sustancias solubles en grasas. Otros investigadores observaron que las aves sometidas a dieta libre de xantofilas se comportaron normalmente con

pecto a fecundidad y a fertilidad.

Mientras unos niegan a las xantofilas toda función biológica y su actividad de provitamina A, otros, como Euler, et al⁽¹¹⁵⁾ pensaron que la Luteína era un precursor de la vitamina A en el pollo.

Se ha sugerido que la Luteína es convertida en un factor de crecimiento esencial diferente a la vitamina, pero algo similar en función. Recientemente, otros investigadores han establecido que la falta de Luteína disminuye la habilidad competitiva del semen de algunas especies de aves domésticas. En gallinas, los carotenoides son movilizados a la sangre por grandes dosis de estrógenos. Esta es la forma probable de transferencia de los pigmentos al huevo cuando las gallinas ponen.

Siendo México uno de los países cuyos consumidores de productos avícolas gustan de su buena pigmentación, surge la necesidad de satisfacer dicha protilcción. El desarrollo de la explotación de aves ponedoras en confinamiento, restringe llenar éste requisito, ya que las aves no tienen acceso a vegetales verdes, principales proveedores de xantofilas. La pigmentación de las aves entonces depende sólo de los ingredientes que se usan en la formulación de dietas; las más comunes son el maíz amarillo y la alfalfa, así como algunos preparados comerciales.

III.3.- EVALUACION DEL PODER PIGMENTANTE DE LOS CAROTENOIDES.

En los últimos años, la utilización de sustancias pigmentantes para la coloración de pollos de engorda ha cobrado mucha importancia. Esto es debido a que el público consumidor tiene preferencia por pollos que tengan la piel y los tarsos amarillos, y están dispuestos a pagar más por aquéllos que reúnan estas características, desconociendo probablemente el hecho de que el valor nutritivo del pollo no se relaciona con la pigmentación del mismo.

Hay una diferencia en cuanto al precio de un pollo pigmentado y uno que no lo está, siendo el castigo que se tiene mayor o menor, según sea el grado de palidez. Esto, por lo tanto, causa en ocasiones pérdidas económicas bastante fuertes a los productores de pollos de engorda. (163)

Los carotenoides incluyen varios pigmentos de las plantas que se adicionan en la dieta de aves de corral para pigmentar piel y huevos. (48)

Durante muchos años las investigaciones han evaluado los efectos de la pigmentación, tanto en la piel como en las yemas de los huevos de pollos de engorda, de carotenoides obtenidos en forma natural partiendo de diferentes productos alimenticios. En 1957, Isler y Zeller reportaron la síntesis química de varias sustancias carotenoides puras. Con un aprovechamiento cada vez mayor, varias investigaciones han evaluado estos compuestos para mejorar la pigmentación, tanto en pollos como en las yemas de sus huevos.

Marusich et al (110) evaluaron varios carotenoides puros para la pigmentación de yemas de huevos utilizando un método de evaluación visual y análisis espectrofotométrico de extractos de acetona a 440 nm. Ellos reportaron que el beta-apo-8'-caroteno produjo un "color amarillo agradable", y podría parecer el "carotenoide preferido" para la pigmentación de la yema de huevo. Se encontró que la Cantaxantina es uno, en

tra varios carotenoides, que imparte un matiz naranja a las yemas, que no es aceptable. Bunnell et al ⁽²⁰⁾ estudiaron el uso de beta-apo-8'-caroteno como un agente pigmentante de la yema de huevo, y reportaron que una cápsula estabilizada de este compuesto, proporcionado en el alimento, a un nivel de 4.81 mg/Kg, mezclados con una ración de maíz blanco, y solamente de 1 a 2 % de alfalfa, podría proporcionar un color adecuado a las yemas de huevos. Couch y Farr ⁽²⁴⁾ utilizando la escala de colores de Hoffman - La Roche y extracciones con acetona, evaluaron las capacidades pigmentantes de Cantaxantina y beta-apo-8'-caroteno, adicionados en las dietas consistentes de maíz amarillo y alfalfa. Ellos encontraron _ que la adición de 4.4 mg/Kg de Cantaxantina, dan como resultado un gran incremento en la cuenta efectuada al analizar la carne de las aves.

Un mayor incremento en la pigmentación de la yema de huevo se obtuvo al aumentar el contenido de Cantaxantina en la dieta de 8.8 y 13.2 mg/Kg respectivamente; sin embargo, no hubo incremento en el contenido de las yemas de huevo, resultante de la adición de beta - apo - 8' - caroteno, en combinación con Cantaxantina. Observaron además, que la adición de _ beta - apo - 8' - caroteno, en la dieta conteniendo Cantaxantina no me jora los resultados visuales.

Es evidente, según los datos publicados, que no ha sido posible evaluar las características de pigmentación de las yemas utilizando Cantaxantina y beta- apo - 8'- caroteno, en dietas conteniendo maíz amarillo. Este problema es debido aparentemente a las diferentes longitudes de on da dominantes (color real) de los pigmentos. Así, es falso que la evalua ción exacta de la pigmentación en yemas de huevo pueda ser llevada a ca bo por cualquier análisis visual o espectrofotométrico de extractos de a cetona, utilizando una longitud de onda constante cuando están presentes varios pigmentos de diferente color. (49)

Numerosos métodos han sido utilizados para evaluar las propiedades de

pigmentación de varios compuestos. Uno de los más comunes ha sido el método visual, en el cual, las aves son alimentadas con raciones que contienen una fuente pigmentante durante varias semanas; posteriormente los animales son sacrificados, eliminándose después el plumaje y evaluando la pigmentación, mediante la utilización de un sistema de calificación arbitrario.

Ocasionalmente, sólo la pigmentación de las patas de las aves ha sido utilizada como base en la evaluación. Esta medida subjetiva es difícil de identificar y de reportar; por ello, numerosas investigaciones han relacionado la evaluación visual con un color de referencia. Primeramente, un rotor de colores, descrito por Heiman y Carver ⁽⁶⁶⁾ fué utilizado con frecuencia, pero estudios más recientes se basan, ya sea en la escala de color para yema de huevo de los laboratorios "Roche", o bien, en la guía de pigmentación de la piel de pollos (o aves de corral en general) de "Ralston Purina".

Fry et al ⁽⁵²⁾ introdujeron un método de reflexión colorimétrica, basado en tres mediciones: La longitud de onda dominante, que indica el matiz; la luminosidad, que determina el brillo; y la pureza de excitación, que indica la intensidad de color en la longitud de onda dominante.

Las evaluaciones visuales frecuentemente se complementan con los análisis químicos. Heiman y Tighe ⁽⁶⁷⁾ introdujeron un método para medir la pigmentación de la piel de aves mediante la determinación de la concentración de carotenoides de fragmentos de piel de las patas. Este método fué modificado más tarde para utilizarse en muestras de la membrana de las puntas de las patas por Wilgus ⁽¹⁸⁰⁾ y por Day y Williams ⁽³⁹⁾.

Wilson ⁽⁸²⁾ utilizó los niveles de xantofilas en suero para identificar a las gallinas no ponedoras, mientras que Grau y Klein ⁽⁶⁰⁾ utilizaron dichos niveles para demostrar que los carotenoides de *Chlorella* y de *Scedesmus* son biológicamente aprovechables por los pollos. Davis y Krat-

zer⁽³⁴⁾ encontraron un coeficiente de correlación de 0.93 entre las Xantofilas del suero, después de una semana de alimentación con una dieta que contenía Xantofilas, y la pigmentación de las patas varias semanas después. Dua et al.⁽⁴³⁾ reportaron correlaciones altamente significativas, entre las xantofilas del suero y las de la dieta, y entre las de la piel con respecto a las del suero. La reproducibilidad estimada de 0.92 a 0.98 para las Xantofilas en suero fué mayor que la encontrada para la piel, grasa e hígado, adelantándose Stone et al.^(16b) a concluir que ésta determinación podría ser el mejor criterio para la selección genética.

La correlación entre las Xantofilas del suero y la piel puede ser ligeramente afectada por aquéllos carotenoides que tengan actividad de pro vitamina A. Mientras la mayoría son convertidas en vitamina A en la mucosa intestinal⁽³⁰⁾, pequeñas cantidades escapan a la conversión, entran al torrente sanguíneo⁽⁵³⁾ y son depositadas en los huevos, así como en la piel^(53,56,126)

Todos estos criterios experimentales han demostrado ser válidos. Independientemente del método utilizado, individualmente o en combinación, debe considerarse un período previo de alimentación de al menos dos semanas. Esto no solamente involucra tiempo, sino también cantidades un poco mayores de materiales de prueba, lo cual es un factor significativo, bajo numerosas condiciones, tales como el ensayo experimental de plantas normales u obtenidas por cruzamientos, o el estudio de carotenoides aislados, los cuales además presentan un problema de estabilidad al ser mezclados en raciones experimentales.

Thomas et al.⁽¹⁷⁰⁾ reportaron una correlación de 0.96 entre los niveles de xantofilas en suero de pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de Xantofilas provenientes de diferentes fuentes, tanto para dos días como para cuatro semanas. Mediante éste, fué posible desarrollar un bioensayo para determinar la disponibilidad de las Xantofilas de va-

rias fuentes basándose en las Xantofilas encontradas en el suero, concluyéndose que este método requería de poco tiempo y moderadas cantidades de materiales de prueba, además de que podría no ser necesario el sacrificio de las aves. (117)

La alfalfa (*Medicago Sativa L.*) y otras plantas, generalmente son incluidas en la dieta de pollos de engorda, debido al color que estas imparten a la piel y a las yemas de los huevos. Entre los diferentes pigmentos amarillos de las hojas verdes, los hidroxí-carotenoides (Xantofilas) son los pigmentos más importantes para los pollos de engorda. Livingston et al⁽¹⁰⁴⁾ concluyeron que la determinación de xantofilas no estandarizadas proporciona una gran aproximación a la potencia de pigmentación de una harina de hojas de la planta, mayor que la determinación de las Xantofilas totales. De éste grupo de compuestos, la Lutefina es considerada como el pigmento de mayor importancia. (149)

Se ha encontrado recientemente que el alga espirulina es una buena fuente de Xantofilas, tanto para la pigmentación del pollo de engorda⁽⁶²⁾ como para pigmentar la yema de huevo⁽⁸⁾ ; además, el alga espirulina (*Spirulina geltilen*) contiene un porcentaje de proteína elevado, por lo cual, se le considera una fuente potencial alimenticia y pigmentante para el futuro. (143)

IV.- DETERMINACION Y CUANTIFICACION
DE CAROTENOIDES.

IV.-DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES .

Hasta ahora, los métodos analíticos empleados para la determinación y cuantificación de carotenos y xantofilas se basan en las propiedades coloridas de los mismos, de tal manera que se pueden clasificar principalmente en los siguientes tipos de análisis:

- a) Cromatografía en papel.
- b) Cromatografía en capa fina.
- c) Cromatografía en columna.
- d) Colorimetría .
- e) Espectrofotometría.
- f) Cromatografía de gases.
- g) Cromatografía líquida de alta resolución.
- h) Combinación de las técnicas anteriores.

Idealmente, para diferentes estudios, una técnica cromatográfica podría separar todos los pigmentos en una sencilla operación; sin embargo, la diversidad de las clases de pigmentos y la extrema semejanza de muchos componentes representan una dificultad. Hasta hace poco, solamente la cromatografía de capa fina bidimensional⁽⁸³⁾ (TLC, por sus siglas en inglés) había logrado suficiente resolución para el análisis de pigmentos mezclados, pero la cuantificación de las placas de TLC es muy tediosa, requiriéndose obtener de 0.15 a 1.0 µg de cada pigmento para continuar el análisis.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece importantes ventajas sobre la cromatografía de capa fina (TLC), incluyendo la rapidez, la detección automática y límites de detección mucho más bajos; 0.5 ng para carotenoides y 1 ng para clorofilas con detección por absorbanancia,⁽¹⁵⁾ o bien, 84 pg para clorofilas utilizando detección por fluorescencia.⁽⁵⁷⁾

Recientemente, los métodos y sistemas disponibles para el análisis de pigmentos de plantas fueron revisados⁽¹⁵⁷⁾. Pocos de éstos^(1,15,33-38) separan to-

dos los carotenoides y las clorofilas en una operación sencilla, y ningu no resuelve completamente todos los pigmentos, siendo la luteína y la zeaxantina particularmente difíciles de separar. Las condiciones de fase invertida son mayormente preferidas que las de fase normal, debido a que las fases estacionarias de polaridad de ésta última favorecen la degradación de los pigmentos. ⁽¹⁵⁾

La inestabilidad de los pigmentos en solución ocasiona problemas durante el análisis. Las clorofilas y los carotenoides se degradan por la acción del calor, la luz, el oxígeno, ácidos y álcalis ^(38,74), y muchos de ellos forman familias de isómeros en solución de manera espontánea ⁽¹¹⁵⁾. Además, las clorofilas están sujetas a la degradación por enzimas clorofilasas intracelulares ⁽⁹⁾ durante la extracción. Los pigmentos resultantes, pueden provocar confusiones en la interpretación de los cromatogramas por co-elución con otros pigmentos. Por ello, el sistema con mayor eficiencia es el que se requiere para la separación.

El método empleado para la extracción de pigmentos es crucial para el éxito de la cromatografía subsiguiente. Las condiciones de extracción podrían rápidamente inactivar las enzimas clorofilasas, minimizando al mismo tiempo la degradación de los pigmentos. La rápida extracción y la eliminación de los restos celulares reducen la oportunidad de isomerización y el tiempo de contacto de los pigmentos con cualquier enzima activa residual. Los métodos previamente empleados para la extracción de pigmentos vegetales incluyen la trituración ^(47,16), maceración, o incubación ⁽³²⁾ en varios solventes ^(18,33,106), con tiempos de extracción que van de sólo algunos minutos ^(32, 161) hasta varias horas ^(19,100, 147). En esos métodos, los pigmentos están en contacto con los restos celulares al menos durante 4 minutos.

Wright y Shearer ⁽¹²³⁾, en sus intentos por mejorar las técnicas para el análisis de pigmentos fotosintéticos, han centrado su atención hacia

los problemas de extracción y el subsecuente análisis por cromatografía líquida de alta resolución, proponiendo una técnica de extracción sencilla y un sistema de HPLC que encontraron muy conveniente, ya que ofrece una mayor resolución que otros métodos previamente descritos. (183)

La separación y la identificación de los pigmentos de las plantas han estado muy restringidas a la cromatografía en papel, en capa fina y en columna.

La cromatografía de gases (GC) ha encontrado solamente una aplicación limitada en el análisis de pigmentos.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue desarrollada como una herramienta complementaria para la cromatografía de gases, particularmente para la separación de compuestos iónicos no volátiles. Esto eliminó la posibilidad de originar compuestos derivados y la degradación de compuestos lábiles. Esta técnica ofrece muchas ventajas. Las altas capacidades de resolución de las columnas permiten la separación de complejas mezclas de pigmentos vegetales. El tiempo de análisis, incluyendo la preparación de la muestra, es generalmente menor que el de otros métodos cromatográficos, y frecuentemente, la separación se efectúa en tan sólo 30 minutos. La interacción de la energía luminosa con los pigmentos hace a éstos particularmente adecuados para los métodos de HPLC, los cuales, utilizan la espectrometría como un medio de detección. La alta sensibilidad de los detectores visible-ultravioleta y de fluorescencia hace posible el análisis de muestras en cantidades pequeñas. Cantidades mayores también pueden detectarse por cromatografía mediante la HPLC preparativa, la cual es particularmente usual para la determinación de componentes individuales. Los métodos cualitativos y cuantitativos se han desarrollado para diferenciar los pigmentos de las plantas. Estos métodos han proporcionado un gran número de avances en el estudio de los pigmentos vegetales, y permiten continuar acrecentando los esfuerzos de investiga-

(157)
ción en éste campo.

Ya que los carotenoides son solubles en grasas, pueden ser extraídos utilizando benceno, éter, disulfuro de carbono, etanol o cloroformo. Algunas veces se requiere una purificación preliminar que, generalmente, involucra una hidrólisis alcalina de lípidos o ésteres de los carotenoides hidroxilados, seguida de la cromatografía. Debe tenerse cuidado de no exponer a los carotenoides a la luz y al oxígeno por períodos prolongados. La adsorción excesiva de ciertas fases estacionarias durante la cromatografía debe reducirse al mínimo para evitar la alteración de los pigmentos. Las técnicas para aislar y purificar los carotenoides fueron revisadas por Liasen - Jensen ⁽¹⁰⁾ (1971) y por Moss y Weedon ⁽¹¹⁾ (1976).

La aparición de la cromatografía líquida de alta resolución ha constituido un medio para mayores avances en el estudio de pigmentos carotenoides.

La estructura altamente conjugada de los carotenoides es aprovechada para su detección por medios espectrofotométricos visible y ultravioleta.

TABLA IV.-ALGUNOS CAROTENOIDES Y SUS LONGITUDES DE ONDA EN LA MÁXIMA ABSORCIÓN DE LUZ. ⁽¹⁵⁷⁾

CAROTENOIDE:	MÁXIMA ABSORCIÓN DE LUZ (nm) :			SOLVENTE:
Lycopeno (trans)	505	474	446	
(cis)	502	470	444	
β -Caroteno	497	466		Cloroformo
Zeaxantina	483	451		Etolol
α -Caroteno	485	454		Cloroformo
γ -Caroteno	494	462	437	Eter de petróleo
	508	475	446	Cloroformo
Astaxantina	513	493	476	Pirideno
Bixina	509	475	443	Cloroformo
Criptoxantina	480	452		
Crocetina	464	436	411	Piridina
Crocina	464	434		Metanol

La alta capacidad de resolución de la HPLC ha hecho posible la separación de carotenoides estrechamente relacionados, que antes había resultado tediosa o imposible.

Muchos pigmentos carotenoides coexisten con clorofilas y frecuentemente son analizados simultáneamente en los extractos de plantas.^(1,10,33,40,45,75,148)

TABLA VII. ALGUNOS CAROTENOIDES Y SUS FUENTES.

Clase:	Principales Carotenoides:	Otros Carotenoides:	Fuente:
Carotenos	β -Caroteno	α -Caroteno	Zanahorias
	β -Caroteno	α -Carotino	Aceite de palma roja
		δ -Caroteno	
	β -Caroteno	Xantofilas	Alfalfa
	Licopeno	Caroteno	Tomate

Xantofilas	Criptoxantina	Zeaxantina	Maíz
	Luteína	Carotenos	Alfalfa
	Capsantina	-	
	Astaxantina	-	Salmón

Ácido Carotenico	Crocina Crocetina Bixina	β -Caroteno	Azafrán

La primera técnica de HPLC utilizada para separar carotenoides fué desarrollada por Sweeney y Marsh, en 1970. Una columna empacada con hidróxidos de calcio y magnesio fué utilizada para estudiar los carotenos y sus estereoisómeros, en vegetales. El método fué aplicado para investigar los efectos del procesamiento de alimentos sobre la isomerización. Como fase móvil se empleó p-Metilanol en éter de petróleo (1.5%) para resolver siete isómeros en menos de una hora.

Stewart y Wheaton, en 1971, emplearon la HPLC para separar carotenoides y xantofilas de cáscaras de frutos cítricos. Los carotenoides fueron se-

parados sobre una columna de óxido de magnesio, mientras que las xantofilas fueron separadas utilizando una columna de carbonato de zinc. La fase móvil fué una mezcla de alcohol ter-pentil, en n-hexano conteniendo 1% de BHT como antioxidante. La elución se efectuó de manera gradual, incrementando la concentración de alcohol. Veintitrés pigmentos fueron separados, de los cuales, trece fueron identificados. Los carotenoides α y β -caroteno, así como la criptoxantina, fueron analizados por Reeder y Park, en 1975, para medir la actividad de provitamina "A" del jugo de naranja. El método emplea alúmina como fase estacionaria y 0.01 % de BHT en benceno : n-hexano (3:5 v/v) como fase móvil para la separación de carotenos. Una fase estacionaria de sílica con un 0.01% de BHT en tetrahidrofurano : n-hexano (1:5 v/v) como fase móvil, fueron utilizadas para la separación de criptoxantina. El efecto de los carotenoides en el color de los productos cítricos y los problemas asociados con su análisis por medio de HPLC han sido revisados por Stewart y Leuenberger, en 1976. Stewart⁽¹⁶⁶⁾ amplió el método de Reeder y Park para separar cinco carotenoides de jugo de naranja (α , β y ζ caroteno, y α y β criptoxantina). El método emplea una simple columna de magnesita y un sistema de elución gradiente compuesto por una mezcla de n-hexano y acetona, o bien, una mezcla de hexano, acetona y agua como fase móvil. Este método fué aplicado posteriormente para medir el contenido de carotenoides durante la maduración de frutos cítricos⁽¹⁶⁶⁾. En éstos métodos, la detección de los pigmentos fué monitoreada a una longitud de onda de 440 nm. Thompson y Maxwell, en 1977, emplearon una columna de fase invertida y metanol : agua (99 : 1 v/v) como mezcla eluyente para separar β -caroteno de margarina, leche enriquecida y fórmula infantil. El β -caroteno fué detectado por monitoreo del eluyente a una longitud de onda de 453 nm. En 1978, Hajibrahim et al.⁽⁶⁴⁾ analizaron los carotenoides y otros pigmentos de sedimentos geoquímicos, utilizando sílica gel como fase estacionaria. Se

empleó un sistema cónico gradiente compuesto de 1 a 75% de acetona en hexano, ó de 2 a 50% de acetona en hexano. La detección de los carotenoides en el eluyente fué monitoreada a una longitud de onda de 451 nm. Este estudio se efectuó para evaluar el potencial de la HPLC en las distribuciones de petroporfirina en las huellas digitales.

El alcance y las limitaciones de la HPLC, en sílica, para la separación de carotenos, dioles, isómeros cis-trans y diastereoisómeros, en comparación con la cromatografía de capa fina común y los sistemas cromatográficos en papel, se han investigado por Fiksdahl et al.⁽⁴⁷⁾ en 1978. El licopeno y el β -caroteno fueron cuantificados en muestras de tomate por Zakaria et al.⁽¹⁸⁴⁾. Una columna de fase invertida y una mezcla de cloroformo en acetonitrilo fué utilizada como eluyente. Los pigmentos fueron monitoreados en el eluyente a una longitud de onda de 470 nm. La separación se realizó en 15 minutos. Los autores aseguran que su método proporciona una evaluación más precisa del contenido de vitamina A en frutas, y es más exacto que el método común utilizado por la AOAC para establecer la composición de vitamina A en alimentos.

Landen y Eitenmiller, en 1979⁽⁹⁶⁾, combinaron la cromatografía en gel de alta difusión con la HPLC de fase invertida no acuosa, para cuantificar simultáneamente β -caroteno y palmitato de retinilo en aceite y margarina. La ventaja de ésta combinación de técnicas consiste en que permite realizar el análisis sin la previa saponificación de la muestra. Los pigmentos del azafrán fueron monitoreados a una longitud de onda de 440 nm, utilizando una columna de fase invertida y acetonitrilo como fase móvil, por Pfander et al.⁽¹³⁷⁾

Cuatro pigmentos, α , β y δ -carotenos, además de licopeno, fueron totalmente resueltos en sólo 15 minutos.

V.- METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION Y

CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES .

V - METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES (CAROTENOS Y XANTOFILAS).

V.1.- METODOS GENERALES.

Los carotenoides imparten su color característico a los productos que los contienen, razón por la cual son empleados como aditivos en la elaboración de pastas, alimentos para animales, etc. De ahí que hayan asumido importancia industrial en los últimos años.

La adición de carotenoides a los alimentos, es en realidad un tipo de sofisticación, ya que el propósito principal es incrementar el color de dichos productos.

Debido a que varios productos alimenticios contienen carotenoides en forma natural, el problema radica en la determinación y cuantificación de los carotenoides adicionados. Esto se logra por estimación total de los carotenoides, y posteriormente, comparando el dato obtenido con los valores conocidos de los carotenos contenidos en el producto en cuestión.

Hasta ahora, se han desarrollado varios métodos analíticos para la determinación y cuantificación de los pigmentos carotenoides, y como se menciona anteriormente, la mayoría de ellos se fundamentan en las propiedades coloridas de los mismos pigmentos. Algunos de estos métodos analíticos se han modificado por los investigadores, quienes han tratado de perfeccionarlos, o bien, simplificarlos. Así, debido a su eficiencia y/o simplicidad, algunas de las técnicas analíticas se han implantado como técnicas oficiales por las instituciones dedicadas a la reglamentación de los productos industrializados. Sin embargo, para efectos de investigación se emplean métodos distintos, cuya eficiencia ha sido comprobada previamente, o bien, se hacen modificaciones de las técnicas conocidas, lo que permite que el desarrollo de nuevas técnicas continúe su marcha.

V.1.1.- METODO DE WALL Y KELLEY (A.O.A.C.). (41,79)

En el procedimiento de Wall y Kelley⁽¹⁷⁹⁾, se lleva a cabo la extracción de los pigmentos carotenoides con solventes en frío.

Preparación de la muestra.- Cualquiera que sea la muestra, como podría ser alguna planta deshidratada, debe ser triturada, y posteriormente, pasada a través de un tamiz (malla 40), guardada en un recipiente cerrado, en condiciones de refrigeración.

Procedimiento.- Se extrae una muestra de 2 a 5 gramos con 200 ml de una mezcla (5:3) de alcohol etílico al 95% y éter de petróleo, en un matraz con agitación constante, durante 10 minutos. Transferir el extracto y el material finamente triturado a un filtro de fibra de vidrio conectado a un matraz de succión; lavar con porciones alternadas de etanol y éter de petróleo, hasta obtener un filtrado incoloro. Lavar con agua destilada en un embudo de separación, y concentrar el extracto de éter de petróleo en un baño de vapor. Secar por filtración a través de sulfato de sodio anhidro, colectando el filtrado en un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con éter de petróleo.

Cromatografía.- Preparar una columna compuesta por una mezcla (1:3) de óxido de magnesio (Westvac # 2641) y Ryflo - Super Cel (Fisher) en un tubo de adsorción de 22 x 100 mm, ajustándolo con un disco de porosidad mediana. Espacar el adsorbente hasta una profundidad de aproximadamente 75 mm; adicionar una capa de sulfato de sodio anhidro, de 1 cm; agregar la solución del extracto. Desarrollar el cromatograma y eluir los carotenoides con una solución al 5% de acetona en éter de petróleo.

Determinación espectrofotométrica.- Determinar la absorbancia de los pigmentos purificados, a intervalos de 5 nm, entre los 400 y los 500 nm.

V.1.2.-METODO DE LA A.O.A.C. MODIFICADO. (5,41,79)

Este método ⁽⁵⁾ depende de una extracción en caliente de los pigmentos carotenoides de materiales vegetales, con solventes de bajo punto de ebullición.

Procedimiento.- Se extrae una muestra de 2 a 4 gramos en un aparato de Bailey - Walker, durante 1 hora, con 30 ml de una solución al 30% de acetona - éter de petróleo. El extracto se transfiere a un matraz aforado de 100 ml y se afora con éter de petróleo.

Digestión con potasa alcohólica.- En ésta variación, el material vegetal se digiere con una solución alcohólica de hidróxido de potasio, en caliente, efectuándose posteriormente la extracción con éter de petróleo u otros solventes de propiedades similares.

Procedimiento.- Se coloca una porción de la muestra, de 2 a 5 gramos en un matraz Erlenmeyer, con 100 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio, y se digiere en un baño de vapor durante 30 minutos, manteniendo el volumen constante durante la digestión, mediante la adición de alcohol etílico al 95%. La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente y se transfiere a un embudo de separación de 500 ml. Se extrae la mezcla resultante con porciones de 50 ml de éter de petróleo, hasta obtener un extracto incoloro. Esto requiere de 5 ó 6 extracciones; los extractos se combinan en otro embudo de separación, y se adicionan 200 ml de agua, teniendo mucho cuidado para evitar la agitación. Después de 2 minutos se decanta la fase acuosa. Se adicionan otros 100 ml de agua, y se agita suavemente, dejando en reposo durante 2 minutos para permitir la separación. Se elimina la capa acuosa. Se adicionan 25 ml de agua, agitándose vigorosamente durante 30 seg; continuando con las extracciones con porciones de 25 ml de agua, hasta que los lavados sean neutros a la solución de indicador de fenoftaleína. Después del lavado fi-

nal, se deja reposando el embudo de separación durante 5 minutos. Se elimina todo residuo de agua, y se concentra la fase superior (etérea), al vacío, y dentro de un baño de vapor. Se filtra a través de sulfato de sodio anhidro. El filtrado se colecta en un matraz aforado de 100 ml y se adiciona éter de petróleo hasta la marca.

Cromatografía.- Preparar una columna compuesta por una mezcla (1:3) de óxido de magnesio (Westvaco # 2641) y Hyflo-Super Cel (Fisher) en un tubo de adsorción de 22 x 100 mm, ajustándolo con un disco de porosidad meliana. Se empaca el adsorbente hasta una profundidad de aproximadamente 75 mm, adicionando después una capa de sulfato de sodio anhidro, de 1 cm de espesor. Agregar la solución del extracto. Se desarrolla el cromatograma eluyendo los carotenoides con solución de acetona al 5% en éter de petróleo. Ajustar el eluyente a un volumen deseado con éter de petróleo.

Determinación espectrofotométrica.- Determinar la absorbancia del pigmento purificado, empleando un espectrofotómetro, a intervalos de 5 nm, entre los 400 y los 500 nm.

V.1.3.-METODO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. (13, 92, 102, 144, 169)

MODIFICACION DEL METODO DE REBEIZ⁽¹⁴³⁾, APLICADO A LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN GENERAL.

Procedimiento.- Se colocan 3 gramos de muestra fresca en una cápsula de porcelana, mezclando homogéneamente con 18 ml de acetona y 2 ml de hidróxido de amonio 0.1N. La mezcla se vierte en un tubo para centrifuga, y se centrifuga durante 10 minutos, entre 12 000 y 13 000 rpm. El sobrenadante se decanta, y el precipitado se resuspende en 3 ml de una mezcla de acetona-agua (4:1), centrifugándose nuevamente. Se adicio-

nan 3 ml de éter al sobrenadante, combinándolos perfectamente. La mezcla acetona-éter se vierte en un embudo de separación conteniendo 800 ml de agua destilada fría, saturada con carbonato de magnesio. La fase inferior de agua-acetona se descarta. La fase etérea se colecta y se centrifuga durante 2 minutos para eliminar las pequeñas gotas de agua que se encuentran suspendidas en el extracto etéreo. Una décima parte del extracto se concentra en un tubo cónico, hasta un volumen de 0.2 ml en atmósfera de Nitrógeno. Después de concentrar la fase etérea, ésta se aplica (con una micropipeta) sobre una placa con sílica gel de 5 x 20 cm, para cromatografía de capa fina. Se adicionan 0.2 ml de acetona al tubo cónico, y el mismo volumen se aplica enseguida sobre una segunda placa cromatográfica. Ambas placas se desarrollan dentro de un cilindro de vidrio de 23 x 6 cm, cubierto, y previamente enfriado, que debe contener benceno:acetato de etilo:etanol al 99% (8:2:0.5 ml V/V). Las placas se dejan desarrollar dentro de un refrigerador durante un lapso de tiempo de 30 a 40 minutos. Aún frías y húmedas, las bandas de luteína se desprenden de las placas, con la ayuda de una microespátula de punta curva, colectándolas dentro de un tubo cónico que debe contener 1 ml de etanol. Se agregan 1.5 ml de etanol adicionales para lavar el tubo, el cual se centrifuga durante 3 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se guarda, y el residuo de sílica gel se lava con 1 ml adicional de etanol. Los sobrenadantes se combinan y el volumen se ajusta a 20 ml con etanol. Se determina la absorbancia a una longitud de onda de 446 nm, utilizando un espectrofotómetro, por ejemplo, el Bausch and Lomb "Spectronic 20".

El aparato debe calibrarse previamente con solución de carotenoides de alta pureza, obteniéndose una curva de calibración característica, a partir de la cual se obtienen los datos de concentración.

V.1.4. EXTRACCIÓN DE ALTA EFICIENCIA Y ANALISIS DE PIGMENTOS CAROTENOIDEOS
 POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION. (1,15,34,51, 83,157,183)

Extracción y purificación.

Un tubo cónico de polipropileno (15 ml) para centrifuga, se modifica, efectuando un corte por debajo de la marca de 7 ml y haciéndole un pequeño orificio (aproximadamente 0.5 mm de diámetro) en la punta. El orificio debe sellarse en su parte externa con cinta adhesiva Nescofilm (Nippon Shoji Kaisha) herméticamente alrededor de la base del tubo.

La muestra filtrada y previamente enfriada se coloca dentro del tubo. Se adiciona metanol frío (4 ml a 0°C) el tubo se coloca inmediatamente en el tope de un tubo de vidrio para centrifuga (de 15 ml), y los dos tubos se centrifugan juntos durante dos minutos a 2000 rpm a 0°C. El extracto rompe el Nescofilm y es colectado en el tubo inferior, mientras que los residuos orgánicos son retenidos casi por completo en el tubo superior. Estos residuos se lavan adicionando una cantidad adicional de metanol (1 ml) y volviendo a centrifugar, siendo recuperados la mayor parte de los pigmentos residuales en los primeros 0.2 ml. Todas las operaciones deben llevarse a cabo con luz de baja intensidad, utilizando un equipo que debe ser previamente enfriado a 0°C.

El extracto crudo se purifica haciéndolo pasar a través de un cartucho de sílica octadecil (C_{18} Sep-PAK, Waters Assoc.) y eluido con 2 x 1.5 ml de acetato de etilo. La solución se filtra utilizando un filtro Millipore FH de poro de 0.4 μ m y generalmente se utiliza sin concentrarse. Cuando es necesaria la concentración, el extracto filtrado y purificado es transferido a éter dietílico, mezclándolo con cloruro de sodio al 10%, frío, y neutralizado con bicarbonato de sodio. La fracción etérea se evapora hasta 0.2 ml en una corriente de nitrógeno, después se lleva a 0.5 ml con acetonitrilo y se filtra utilizando un filtro de teflón con poro de 0.22 μ m,

sostenido en un ensamblador de microfiltración de Sistemas Bioanalíticos MF-1.

En experimentos que comparan la relativa eficiencia de la maceración y la trituración, los filtros sobrepuestos se trituran hasta formar una masa, con 3 ml de metanol en un mortero o cápsula, transfiriéndose cuantitativamente a un homogenizador Potter-Elvehjem, triturándose durante 20 segundos más, antes de la filtración y la purificación descritas anteriormente.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

El extracto (20 - 200 μ l) se inyecta en un cromatógrafo para líquidos Waters Assoc., compuesto por bombas M6000 y M45, un programador de solventes 650, un inyector U6K y dos módulos de compresión radial RCM-100 en serie, cada uno de los cuales debe contener un cartucho Rad-Pak (silica octadecil, de tamaño de partícula de 5 μ m). El primer cartucho se protege con un Guarda-PAK RCSS y un filtro precolumna. Los pigmentos se eluyen utilizando un gradiente lineal desde 90% de acetonitrilo hasta acetato de etilo, durante 20 minutos, con una velocidad de flujo de 2ml/min. Un minuto después de la elución del pigmento final (21 min), la composición del solvente se cambia a las condiciones iniciales por un gradiente de 3 min, después de lo cual, se permiten 5 minutos más para que el sistema se equilibre, antes de inyectar la siguiente muestra.

Los pigmentos se detectan utilizando las absorbancias comprendidas entre los 405 y los 436 nm, en un detector de absorbancia 440 de dos canales, de la Waters Assoc (o el equivalente). La adición de los dos canales se lleva a cabo por reversión de las señales de polaridad del sensor para el canal inferior y seleccionando longitud de onda 1 - longitud de onda 2 en el canal superior. La salida de los dos canales puede ser entonces integrada utilizando un Módulo de Datos Waters, el cual integra solamente una señal. Un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8450A, equipado con una celda

de flujo Helma de 15 μ l, permita obtener el espectro de los pigmentos, sin la necesidad de detener el flujo del solvente.

IDENTIFICACION DE LOS PIGMENTOS.

Los pigmentos individuales son colectados a partir del flujo del solvente y sus espectros de absorción en etanol, hexano y cloroformo (en el caso de los carotenoides) se comparan con los datos publicados. Un cambio hipocrómico por acidificación con HCl es utilizado para identificar los 5,6-epoxi carotenoides. La presencia de los grupos 5,6-epoxi, o los grupos ceto se confirma por recromatografía después de la acidificación. La identidad de los cis-carotenoides se confirma por co-cromatografía con productos catalizadores de yodo sobre todos los trans-carotenoides. Una vez que se han colectado suficientes carotenoides, la espectrometría de masas de impacto-electrón se utiliza para su posterior identificación.

Cuando el patrón de fragmentación es enmascarado por lípidos de menor co-loración de la muestra, así como por los residuos de octadecil arrastrados desde la columna analítica, únicamente es posible obtener los pesos moleculares de los carotenoides por ésta técnica.

Reactivos.

El metanol, el acetonitrilo, y el acetato de etilo, deben ser reactivos del grado para cromatografía líquida de alta resolución (se recomienda utilizar los de la Waters Assoc.) pudiéndose utilizar sin más purificación que una simple filtración seguida de una eliminación de gases.

El agua empleada se purifica utilizando un sistema Millipore-Q.

El éter dietílico y el cloroformo se purifican por el método que recomienda Davis. (34)

Mediante ésta técnica, los Carotenos y las Xantofilas, así como sus productos de degradación son separados con gran resolución, inclusive con mejor resolución de la que se ha reportado mediante la separación simple.

(18, 31, 32, 104, 118, 143, 144, 173)

V.2.1.-METODO PARA DETERMINAR LUTEINA.

Procedimiento.- Colocar 3 gramos de la muestra en una cápsula de porogiana, mezclando homogéneamente con 18 ml de acetona y 2 ml de hidróxido de amonio 0.1 N., durante 2 minutos. La mezcla se vierte a un tubo, centrifugándose durante 10 minutos, entre 12 000 y 13 000 rpm. El sobrenadante se decanta, y el precipitado se coloca en un mortero; se adiciona 1 gramo de arena blanca; la mezcla se resuspende en 2 ml de acetona:éter (1:1 V/V) macerando durante 3 minutos. La suspensión se coloca en un tubo, para centrifugarse durante 5 minutos, entre 12 000 y 13 000 rpm. El procedimiento de maceración se repite 3 veces. Después de la cuarta maceración el residuo se deja en el tubo para centrifugar; se resuspende en 1 ml de acetona:éter (1:1 V/V). Se centrifuga nuevamente y el sobrenadante se colecta. Esto último se repite 3 veces, obteniéndose una pasta de color crema. Después de concentrar el extracto total hasta un volumen de 0.2 ml, éste se aplica sobre una placa para cromatografía de capa fina, adicionándose 0.2 ml de acetona al tubo. La mezcla obtenida se aplica sobre una segunda placa cromatográfica. Se efectúa un lavado adicional del tubo con 0.2 ml de acetona, aplicándose el volumen final sobre una tercera placa. El siguiente paso es desarrollar las placas dentro de un cilindro de 23 x 6 cm, cubierto, previamente enfriado y conteniendo benceno:acetato de etilo:etanol al 99% (8:2:0.5 ml V/V). Las placas se dejan desarrollar en refrigeración, de 30 a 40 minutos. Aún frías y húmedas, las bandas de luteína se degprenden de las placas, con la ayuda de una micropipetula de punta curva, colectándose en tubos cónicos, conteniendo cada uno de éstos 1 ml de etanol. Se agregan 1.5 ml de etanol adicionales para lavar el tubo, el cual se centrifuga durante 3 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se guarda, y el residuo de sílica gel se lava con 1 ml adicional de etanol. Los sobrenadantes se combinan, y el volumen se ajusta

hasta 20 ml con etanol. La absorbancia se determina a una longitud de onda de 446 nm, utilizando un espectrofotómetro, del tipo Bausch & Lomb "Spectronic 20", o cualquiera que tenga las mismas características.

La Luteína, en mg/ml del extracto de etanol se determina de acuerdo a la ecuación:

$$\text{mg de Luteína/ml de etanol} = A/\alpha$$

en la cual:

$\alpha = 255.5$, siendo el coeficiente de absorción específico para Luteína en etanol.

A = Absorbancia determinada.

La cantidad de Luteína por ml de etanol se corrige de acuerdo con el % de pérdidas de extracción, así como el % recuperado de la sílica gel.

V.2.2.- METODO PARA LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN MATERIALES VEGETALES FRESCOS O SECOS. METODO ESPECTROFOTOMETRICO. (4,5,6,7,73)

Reactivos:

- a) Acetona.- Anhidra, libre de alcohol. Para secarla se trata con Na_2SO_4 anhidro, destilando sobre zinc granular, a través de una malla # 10.
- b) Hexano comercial.- Punto de ebullición de 60 a 70°C; destilado sobre KCH.
- c) Adsorbente.- Magnesita activada (Sea Sorb 43; Fisher Scientific Co., No. S-120).
- d) Tierra de diatomeas.- Ryflo Super-Cel.

Extracción:

El material se corta finamente con unas tijeras, o se muele en un _

triturador de alimentos, para asegurar que la muestra sea representativa. Si el análisis no puede ser efectuado inmediatamente, debe hervirse la muestra en agua durante 15 minutos, y almacenarse en refrigeración. Se pesa con exactitud una muestra de 2 a 5 gramos, y se coloca dentro de un mezclador de alta velocidad, adicionando 40 ml de acetona, 60 ml de hexano, y 0.1 g de $MgCO_3$. Se agita durante 5 minutos. Se filtra al vacío, o se deja asentar el residuo y se decanta en un embudo de separación. El residuo se lava con dos porciones de acetona de 25 ml cada una, y posteriormente con 25 ml de hexano. Se mezclan los extractos. La acetona del extracto se lava con 5 porciones de agua, de 100 ml cada una. La capa superior se transfiere a un matraz aforado de 100 ml, conteniendo 9 ml de acetona, y se afora con hexano. Si se desea, puede utilizarse etanol en lugar de acetona para la extracción. Se utilizan 80 ml de etanol y 60 ml de hexano durante la agitación.

Separación de los pigmentos.

Se empaquetan la magnesia activada y la tierra de diatomeas, mezcladas (1:1), en una columna cromatográfica de 22 mm de diámetro x 175 mm de longitud, conectado a un tubo de 10 mm de diámetro en su base. Para preparar la columna, se coloca un poco de fibra de vidrio o un tapón de algodón dentro del tubo; se agrega el adsorbente a 15 cm de profundidad. Se conecta el tubo a un matraz de succión, y se aplica el vacío de una bomba de agua. Utilizar un instrumento extendido (tal como un tapón de corcho montado sobre una varilla de vidrio) para presionar suavemente el adsorbente y extender la superficie (la columna empacada debe tener aproximadamente 10 cm de profundidad). Colocar una capa de 1 cm de espesor de Na_2SO_4 anhidro, por encima del adsorbente. Con el vacío continuamente aplicado al matraz, vaciar al extracto dentro de la columna; utilizando 50 ml de acetona-hexano (1:9), o un poco más si es necesario, para desarrollar el cromatograma. Los carotenoi

des visibles a través del adsorbente se lavan, manteniendo la parte superior de la columna cubierta con una capa de solvente durante la operación completa (se recomienda hacerlo sujetando con unas pinzas un matraz volumétrico invertido y lleno de solvente, sobre la columna, con el cuello 1 ó 2 cm por encima de la superficie del adsorbente).

Se colecta el volumen total eluido. Los carotenoides pasan rápidamente a través de la columna; las bandas de xantofilas, los productos de oxidación de carotenos, y las clorofilas, deben estar presentes en la columna al completar la operación. Se transfiere el volumen eluido, que debe haberse concentrado por pérdida de vapor a través de una bomba de agua, a un matraz volumétrico de 100 ml. Se afora con acetona-hexano (1:9), determinándose el contenido de pigmentos fotométricamente.

Determinación:

Se determina la absorbancia de la solución tan pronto como sea posible, en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 436 nm, o con un instrumento equipado con un sistema de filtros adecuado, tal como un fotómetro Klett con un filtro No. 44, ó con un colorímetro fotoeléctrico Evelyn con filtro de 440 nm. Estos aparatos deben calibrarse previamente con soluciones de β -caroteno de alta pureza, obteniendo una curva de absorción característica. Después de preparar la curva de calibración, transformar los datos de absorbancia de la solución en datos de concentración de carotenoides a partir de la misma curva.

Para determinaciones efectuadas en un espectrofotómetro apropiadamente calibrado a 436 nm, utilizar la ecuación:

$$C = (A \times 454) / (196 \times L \times W)$$

donde:

C= Concentración de carotenoides (mg/Kg) en la muestra inicial.

L= Longitud de la celda, en centímetros.

W= gramos de la muestra/ml, en la dilución final.

Reportar los resultados como μg de β -caroteno/ Kg de muestra. Multi-
plicar por 2.2 para obtener el resultado en ppm, ó por 1667 para obte-
nerlo en Unidades Internacionales/ lb .

V.2.3.--DETERMINACION DE CAROTENOS Y XANTOFILAS EN MATERIALES VEGETALES SE-
CCS Y MEZCLADOS CON ALIMENTOS. METODO ESPECTROFOTOMETRICO. (4,5,6,7,7a)

Aparatos.

- a) Tubo cromatográfico.- 125 mm de diámetro interno x 300 mm, Pyrex, con tubo capilar en la base, de 2 mm de diámetro interno x 100 mm, para extender dentro del cuello de un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Sistema de vacío para filtración.- Para colección del eluido en un matraz volumétrico (Filtrador Fisher Scientific Co., o algún equivalente). Conectar un tapón de hule a la columna para ajustar el mecanismo.

Reactivos.

- a) Acetona.- anhidra, libre de alcohol. Destilada sobre zinc granular , (que pueda pasar a través de la malla No. 10).
- b) Hexano.- Comercial; Philips Petroleum Co., de alta pureza, o su equivalente.
- c) Extractante.- Hexano - acetona - alcohol absoluto - tolueno (10:7:6:7).
- d) Adsorbente I.- Se mezcla en un agitador mecánico, durante un período de 1 a 2 horas, sílica gel G con tierra de diatomeas (Hyflo Super-Cel), 1:1 (peso/peso).
- e) Adsorbente II.- Se mezcla en un agitador mecánico durante un período de 1 a 2 horas, magnesia activada (Sea Sorb 43; Fisher Scientific Co.) y tierra de diatomeas (Hyflo Super-Cel) 1 : 1 (peso/peso).
- f) Hidróxido de potasio (solución metanólica) al 40%. Disolver 40g de KOH en metanol, enfriar, y diluir a 100 ml con MeOH.
- g) Solución de sulfato de sodio al 10%. Disolver 10 g de Na_2SO_4 anhi

dro en 100 ml de H_2O .

h) Eluyentes:

Carotonos.- Hexano-acetona (96 + 4).

Monohidroxipigmentos (MHP).- Hexano-acetona (9 : 1).

Dihidroxipigmentos (DHP).- Hexano-acetona (8 : 2).

Xantofilas totales (XT).- Hexano-acetona-metanol (8 : 1 : 1) .

i) 1 - (Fencilazo) - 2 naftol (C.I. Solvente amarillo 14; Sudán I) soluciones estandar.- (1) Solución de Stock.- 1.0 milimolar (mM). Estandar recristalizado en alcohol absoluto. Secar los cristales en estufa de va cfo a peso constante, a $70^{\circ}C$. Disolver 0.1241 g en 500 ml de acetona-isopropanol (1 : 1).

Solución de trabajo.- 0.04 mN. Diluir 20 ml de la solución Stock a 500 ml con acetona-isopropanol (1 : 1). Guardar en lugar obscuro.

Preparación de la muestra.

La muestra se muele hasta obtener un tamaño de partícula que atraviese la malla del No. 40. La muestra debe pesarse con exactitud (2 gramos de harina de maíz o de harina de alfalfa; 50 mg de harina de caléndula; 4 g de alimentos mezclados) en un matraz volumétrico de 100 ml . Pipetear 30 ml de la mezcla extractante en el matraz, tapando y agitando durante 1 minuto. Si la muestra tiene un bajo contenido de humedad, debe adicionarse 1 ml de H_2O por cada gramo de muestra en el matraz antes de la agitación.

a) Saponificación en caliente (Para una rápida extracción y para muestras que contengan xantofilas esterificadas).- Pipetear de 2 a 4 ml de KOH metanólica al 40% y vaciarlos dentro del matraz que contiene la mezcla extractante con la muestra. Se agita durante 1 minuto y onseguida se introduce el matraz en un baño de agua a $56^{\circ}C$ durante 20 minutos . Se conecta un condensador de aire, o se enfría el cuello del matraz para evitar las pérdidas del solvente por evaporación. Transcurridos los

20 minutos la muestra se enfría y se deja en reposo en la obscuridad durante una hora. Con una pipeta, se adicionan 30 ml de hexano dentro del matraz; se agita durante 1 minuto; se diluye hasta la marca del matraz con solución de Na_2SO_4 al 10% y se agita vigorosamente durante 1 minuto. Nuevamente se deja reposar el matraz en la obscuridad durante una hora, antes de la cromatografía. La fase superior debe ser de 50 ml.

b) Saponificación en frío (durante toda la noche — para muestras que no contengan ésteres de xantofilas).— Después de pesar la muestra en el matraz volumétrico y adicionarle 30 ml de la mezcla extractante, se tapa el matraz perfectamente, agitándose durante 1 minuto y se deja en reposo en la obscuridad, durante 16 horas, transcurridas las cuales, se adicionan con una pipeta 2 ml de KOH metanólica al 40%, agitándose durante un minuto. Nuevamente se deja en reposo, en la obscuridad, durante 1 hora, y se procede con la adición de hexano, como en (a).

Cromatografía.

Con la columna sobre el filtrador, se coloca un algodón absorbente, o fibra de vidrio, en el centro, y se adicionan aproximadamente 12 cm del adsorbente I. Se aplica el vacío total y se adiciona más adsorbente, hasta formar una capa de 7 cm. Se recomienda utilizar un instrumento plano, tal como un tapón de corcho invertido, montado sobre una varilla de vidrio, para presionar y aplanar la superficie del adsorbente. Se adiciona una capa de 2 cm de espesor de Na_2SO_4 sobre el adsorbente, presionando firmemente.

(a) Carotenos totales.— Utilizando un matraz volumétrico de 25 ml como colector, se pipetea 5 ml (ó 10 ml si la concentración de pigmentos es baja) de la fase superior y se vierten sobre la columna, ajustando el vacío hasta obtener un flujo de 2 ó 3 gotas por segundo. Una válvula de aguja en la línea de vacío ayuda a controlar la cantidad del flujo. Se adiciona el eluyente después de que la solución de carotenos haya terminado

de penetrar en el adsorbente, continuando hasta que la banda de carotenos haya sido recolectada en el matraz. Se recomienda mantener el adsorbente cubierto por el solvente en todo momento. Suspender el vacío. La solución de carotenos se coloca en la obscuridad hasta que alcance la temperatura ambiente, y se ajusta el volumen con el eluyente para carotenos. El contenido del matraz se homogeniza perfectamente. Inmediatamente se determina la absorbancia de la disolución, como se indica posteriormente.

Las xantofilas permanecen en la columna. Para separar los monohidroxi pigmentos de los dihidroxipigmentos (ambos libres de los epoxy y polioxi pigmentos), o para separar las xantofilas totales, proceder como se indica a continuación:

(b) Separación de Xantofilas.- (1) Colocando un matraz volumétrico de 25 ml en el filtrador, y aplicando el vacío a la columna, dejar que el nivel del eluyente se aproxime a la superficie del adsorbente, e inmediatamente se adiciona el eluyente para MHP. La banda de monohidroxipigmentos (como la zeinoxantina y la criptoxantina) y cualquier mono o dícter persistente podría moverse hacia el fondo de la columna, al frente de otras bandas. Cuando la elución de la banda de MHP haya concluido, se debe colocar el matraz en la obscuridad, hasta alcanzar la temperatura ambiental; después se ajusta el volumen con el eluyente para MHP, y enseguida se determina la absorbancia de la solución. (2) Proceder como en (1), utilizando el eluyente para DHP, para coleccionar los pigmentos de la siguiente banda (luteína, zeaxantina, y sus isómeros) en un matraz volumétrico de 25 ó 50 ml. La violaxantina, neoxantina, y otros polioxi pigmentos (POP) permanecen en la columna.

(c) Xantofilas Totales.- Si se desea obtener el valor para xantofilas totales, debe tomarse una alícuota de la fase superior del extracto original contenido sobre la capa de 7 cm del adsorbente II en la columna,

eluyendo los carotenos con hexano-acetona (9 : 1), y las xantofilas ta tales con la mezcla hexano-acetona-metanol (3 : 1 : 1).

Determinación:

La absorbancia de las diversas fracciones eluidas se debe determinar in mediatamente, para minimizar la isomerización y las pérdidas por auto-oxidación. Primero es necesario checar la calibración del espectrofotómetro mediante la lectura de la solución estandar, a intervalos de 1 nm, entre los 469 y los 479 nm de longitud de onda. Si el valor máximo de absorbancia no se encuentra a 474 nm, será necesario volver a calibrar el instrumento. Cuando el aparato indique una máxima absorbancia a 474 nm, las lecturas correspondientes de la solución de trabajo deberán ser 0.561 (a 474 nm) y 0.460 (a 436 nm).

La absorbancia correspondiente a la fracción de carotenos debe determinarse a una longitud de onda de 436 nm, en tanto que las absorbancias de las fracciones de Monohidroxipigmentos y Dihidroxipigmentos deberán leerse a una longitud de onda de 474 nm. Para una mayor exactitud, se recomienda ajustar los volúmenes de las soluciones de tal manera que se obtengan valores de absorbancia comprendidos entre el rango de 0.25 y 0.75 unidades.

Preparar una curva de calibración y transformar los datos de absorban-cia de las soluciones en datos de concentración, a partir de la misma.

Cálculos:

Las siguientes ecuaciones son aplicables a los datos de absorbancia ob-tenidos a partir de espectrofotómetros calibrados como se indicó ante-riormente.

$$\text{Cono. de la fracción de carotenos (mg/lb)} = \frac{(A_{436} \times 454 \times f)}{(196 \times b \times d)}$$

La concentración para las fracciones de MHP, DHP, o Xantofilas Totales

$$(\text{en } \mu\text{g/lb}) = \frac{(A_{474} \times 454 \times f)}{(236 \times b \times d)}$$

en donde:

b = longitud de la celda (en cm).

d = Factor de dilución = $\frac{(\text{Gramos de muestra}) \times (\text{ml de extracto})}{(50 \text{ ml de Fase Sup.}) \times (\text{ml de Dil. final})}$

f = factor de desviación del instrumento

f = 0.460 para la absorbancia observada a una longitud de onda de 436 nm.

f = 0.561 para la absorbancia observada a una longitud de onda de 474 nm.

V.2.4.-DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN YEMA DE HUEVO. (4,5,6,7)

METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

Preparación de las soluciones estandar de carotenos.

(1) Solución Stock.- Aproximadamente 6 $\mu\text{g/ml}$. Se pesa con exactitud u na cantidad de un concentrado de alta pureza, que contenga 1.5 mg de β -caroteno. La muestra se transfiere a un matraz volumetrico de 250 ml y se diluye hasta la marca con acetona. La solución es estable durante aproximadamente 3 meses en condiciones de refrigeración.

(2) Soluciones de trabajo.- Diluir a 100 ml, con acetona, 10, 20, 30, 45, 60, y 75 ml de la solución stock, para obtener soluciones que contengan 0.6, 1.2, 1.8, 2.7, 3.6, y 4.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Las soluciones son estables durante 1 semana en la obscuridad, en refrigeración.

Preparación de la curva estandar.

Determinar el % de Transmitancia ó Absorbancia de las soluciones estandar diluidas, tan pronto como sea posible, con un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 450 nm, o con un instrumento provisto con un sistema de filtros adecuado, tal como un fotómetro Klett-Summerson con filtro No. 44, o cualquier aparato equivalente. Trazar una curva de —

μg de β -caroteno contra el % de transmitancia, excluyendo los valores mayores del 90% y los menores del 10%, en papel semilog, o contra Abcor bancia, en papel de coordenadas planas.

Determinación.

Pesar una muestra que contenga exactamente 1.0g de sólidos de yema de _ huevo (1g de yema seca, 2.5g de yema líquida, 5.0g de huevo entero flu ido, o el equivalente) en un matraz de 150 ml. Adicionar de 1 a 2 ml de acetona y mezclar hasta formar una pasta homogénea. Agregar 50ml de acetona, mezclar y filtrar. Adicionar aproximadamente 2.5 ml de H_2O antes de la acetona a los productos que contengan azúcar o sal. Lavar el producto sobre un papel filtro Whatman del No. 4, o el equivalente, con pequeñas porciones sucesivas de acetona, colectando el filtrado en un matraz volu métrico de 100 ml. Diluir hasta la marca con acetona. Determinar la ab- sorbancia, o el % de transmitancia, tan pronto como sea posible, y utili zando acetona como blanco.

Reportar el color de la yema, equivalente a los μg de β -caroteno / gra mos de muestra.

V.2.5.- DETERMINACION DE CAROTENOIDES EN PASTAS Y MACARRONES. METODO COLORI- METRICO (APLICABLE SOLAMENTE A LA DETERMINACION DE CAROTENOIDES ADI- CIONADOS CON PROPÓSITOS DE COLORACION).^(4,5,6,7)

Reactivos:

(a) Solución alcohólica de hidróxido de potasio.- Disolver 10g de KOH en 100 ml de alcohol, con calentamiento en baño de agua.

(b) Metanol al 92 % .

(c) Mezcla adsorbente.- Mezclar porciones iguales de magnesia activada (microm brand No. 2641, 2642, o magnesia adsorbente No. S-120, Fisher Scientific Co.) y tierra de diatomeas (Hyflo Super Cel) .

(d) Solución estandar de carotenos.- 20 mg/ litro. Disolver 100 mg de α y β - carotenos en 5 6 6 ml de CS_2 ; adicionar de 35 a 40 ml de alcohol absoluto, enfriar en refrigerador aproximadamente durante 1 hora para asegurar una mayor cristalización y filtrar sobre pa pel de poro fino. Disolver los cristales de carotenos en 5 6 6 ml de CS_2 y adicionar 40 ml de éter de petróleo, previamente enfriado; filtrar en papel de poro fino y secar los cristales en un desecador con vacío durante una hora.

Pesar con exactitud 20 mg de los cristales purificados y lavar con 20 ml de éter absoluto, en un matraz volumétrico de 1 litro. Continuar lavando con éter de petróleo y llevar a volumen adicionando el mismo solvente hata que los carotenos se hayan disuelto completamente.

Preparación de la curva estandar.

Diluir 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25, 7.5, 8.75, y 10.00 ml de la solución estandar de carotenos a 250 ml con éter de petróleo (para obtener concentraciones de 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, y 0.80 mg/litro). Determinar la absorbancia de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 436 nm, y utilizando como blanco éter de petróleo. Obtener una línea a partir de los datos más adecuados, mediante el método de mínimos cuadrados. En dicho método, "x" representa la escala leída, mientras que "y" es la concentración (en mg/litro).

Estandarizar el mismo día la solución preparada.

Preparación de la muestra.

Moler los macarrones o la pasta para sopa, hasta formar una fina harina, en un molino de los que se emplean comúnmente para moler café (los productos que contienen huevo no presentan dificultad, pero los macarrones y otros productos de poco espesor necesitan molerse varias veces). Se debe tener cuidado de no apretar demasiado el molino, pues el calor que pudiera generarse dañaría los pigmentos.

Determinación de Carotenos y Carotenoides Totales.

Se pesan 20 g de harina, semolina, o macarrón; ó 10 gramos de pasta para sopa que contenga huevo; o bien, 2 g de yema de huevo, en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Se adicionan 50 ml de solución alcohólica de KOH, llevando a ebullición en un baño de vapor durante 30 minutos bajo un condensador para reflujo. Ocasionalmente rotar el matraz, teniendo cuidado de mantener siempre la muestra dentro del matraz. Se retira el matraz del baño de vapor y se enfría a temperatura ambiente. Se filtra a través de un buchner de porcelana de porosidad media, recolectando el filtrado en un matraz de succión de 250 ml, y succionando, transferir la mayor parte del material con algunos mililitros de alcohol, lavando el matraz original. Terminar la succión, enjuagar el matraz con 25 ml de éter, vaciando los enjuagues sobre el filtro y agitando el material con un rodillo para permitir que el éter entre en contacto con todas las porciones. Filtrar y repetir esta operación 2 veces.

Transferir el filtrado a un embudo de separación de 250 ml y enjuagar con aproximadamente 25 ml de éter, disgregando el material jabonoso en el matraz. Agregar 175 ml de H_2O , invertir cuidadosamente y rotar varias veces. Cuando las capas se hayan separado, eliminar la capa inferior (agua-alcohol) y extraer ésta capa nuevamente con 25 ml de éter. Descartar la capa inferior y adicionar el éter a la solución etérea original. Lavar el éter mediante la adición de 50 ml de agua. Una vez que las capas se hayan separado, retirar la fase acuosa y descartarla. Adicionar 50 ml de éter de petróleo a la solución etérea, y lavar con 5 porciones de 50 ml de agua; invertir cuidadosamente y rotar el embudo de separación. Descartar todas las porciones de fase acuosa (las emulsiones ligeras desaparecen generalmente en pocos minutos, aunque pueden ser descartadas, especialmente si no hay una coloración amarilla significativa).

Transferir la mezcla éter-éter de petróleo a otro matraz de 250 ml,

enjuagando el embudo de separación con éter de petróleo. Colocar el matraz dentro de un baño de agua a una temperatura entre los 45 y los 50°C. Tajar el matraz, conectar la parte saliente del mismo a una bomba de vacío, y concentrar hasta aproximadamente 5 ml para eliminar el éter. Filtrar a través de un tubo de adsorción con un filtro de fibra de vidrio, que contenga una capa de aproximadamente 3 mm de Na_2SO_4 anhidro en polvo, ó a través de un papel de 5.5 a 7.0 cm, de porosidad mediana con Sulfato de Sodio (utilizar un embudo de tallo largo, que logre pasar por el cuello del matraz), recibir el filtrado en un matraz volumétrico de 25 ml. Diluir hasta la marca con éter de petróleo (el mismo que se empleó para enjuagar el matraz de destilación) haciéndolo pasar antes a través del filtro con Na_2SO_4 , y mezclar, invirtiendo varias veces el matraz. Transferir a una celda de absorción de 1 cm, y determinar la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 436 nm, efectuando por lo menos 3 lecturas. A partir de los valores de absorbancia leídos, calcular el contenido de pigmentos carotenoides totales en ppm, a partir de la curva estandar. Si no se dispone de carotenos puros para la estandarización, multiplicar "A" por 6.42 para los datos correspondientes a la yema de huevo; por 13.05 para los valores correspondientes a pastas, ó por 6.52 para los productos como semolina y macarrones.

Separación de Xantofilas y Carotenos.

(a) Carotenos por separación de fases.- Cuantitativamente, transferir toda la solución de la celda y del matraz volumétrico a un embudo de separación de 125 ml, enjuagar con éter de petróleo y diluir a 100 ml. Adicionar 15 ml de MeOH al 92%, agitar moderadamente durante 2 minutos, manualmente, ó 10 min en un agitador mecánico. Dejar en reposo el embudo de separación durante 1 minuto, en posición vertical, para permitir la separación de las fases. Decantar la capa inferior que contiene las xanto

filas y repetir las extracciones, cinco veces más, o hasta que la fase agua - metanol sea ligeramente menos colorida que la comolina. Generalmente, ocho extracciones son suficientes para las pastas, aunque un contenido de huevo mayor que el normal puede requerir de diez extracciones. Examinar la fase metanólica final recuperada, en un tubo de ensayo, comparándola contra el blanco, para asegurarse de que la solución sea casi incolora.

Lavar la fase etérea con 25 ml de H_2O , invirtiendo el embudo de separación varias veces; descartar la fase acuosa y repetir 2 veces más. Filtrar el éter de petróleo a través de un tubo de adsorción conteniendo una capa de 6 mm de Na_2SO_4 anhidro en polvo, ó a través de un papel filtro de 9 cm de diámetro, de porosidad media, con Na_2SO_4 , recolectando el filtrado en un matraz de destilación de 250 ml, lavando el residuo del filtro con éter de petróleo, hasta la desaparición del color.

Concentrar hasta un volumen de 5 ml, para eliminar el éter (como se indicó para la determinación de carotenoides totales) y transferir la solución concentrada a un matraz volumétrico de 10 ml.

Utilizando porciones muy pequeñas de éter de petróleo, diluir hasta la marca del matraz; mezclar perfectamente y determinar la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 436 nm, efectuando por lo menos 3 lecturas.

A partir de los valores de absorbancia leídos, calcular el contenido de carotenos en ppm, después de haber trazado la curva estándar.

Si no se dispone de carotenos puros para efectuar la estandarización, deberán multiplicarse los datos de absorbancia leídos por 5.22 para

pastas , 6 por 2.61 para semolina.

(b) Carotenos por separación cromatográfica.- Preparar una columna , con un tubo de adsorción de 18 mm de diámetro por 240 mm de longitud conectado a un tubo de 5 cm en uno de sus extremos (insertado con un ta - pón de hule). Ensamblando suavemente con pequeñas porciones de algodón, colocar sobre un matraz de succión de 250 ml y hacer funcionar la suc - ción. Adicionar la mezcla de adsorción (reactivo c) en pequeñas cantida - des a través de un embudo, con la ayuda de una espátula, hasta una altu - ra de aproximadamente 11 centímetros; empacar la columna presionando ha - cia abajo (solamente después de que toda la mezcla haya sido adiciona - da) con un tapón de corcho igual al diámetro interno del tubo. Colocar una capa de 1 a 2 cm de Na_2SO_4 anhidro en polvo, en la superficie.

Transferir cuantitativamente toda la solución de la celda y del ma - tras volumétrico a un matraz de destilación de 250 ml, y concentrar (co - mo se indicó en el método para carotenoides totales) hasta aproximada - mente 5 ml, aplicando succión al matraz continuamente. Transferir a la columna preparada y enjuagar con 4 porciones de aproximadamente 5 ml de éter de petróleo para eliminar todo el color. Finalmente, enjuagar las paredes del tubo con algunos ml de éter de petróleo. Después de que sólo queden en la columna algunas gotas de la solución, cambiar a otro matraz de succión de 250 ml. Cuando casi todo el éter de petróleo esté debajo de la capa de Na_2SO_4 , adicionar 50 ml de éter de petróleo-acetona (en proporción de 9:1) para lavar los carotenos. Cuando todo éste solvente haya pasado a través del Na_2SO_4 , terminar la succión. Mantener la super - ficie de la columna cubierta con solvente durante toda la operación. Transferir la solución de carotenos (que pueden ser sólo algunos ml) a un matraz volumétrico de 10 ml, utilizando porciones muy pequeñas de é - ter de petróleo; diluir hasta la marca del matraz con el mismo solvente, tapar bien el matraz y mezclar el contenido invirtiéndolo varias veces.

Determinar la absorbancia como en el procedimiento anterior, y calcular el contenido de los pigmentos en ppm (La absorbancia de estas soluciones debe determinarse el mismo día en que se efectúe la extracción.

V.2.6. - DETERMINACION DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EN HARINAS.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO. (4.5.4,7)

Determinación.

Colocar 10 gramos de harina en un matras de 125 ml, y con una pipeta adicionar 50 ml de una solución saturada de n-BuOH en H₂O. Tapar el matras fuertemente; agitar perfectamente durante 1 minuto, y dejar en reposo durante 15 minutos, protegiendo el matras de la luz. Nuevamente agitar bien y filtrar a través de un papel Whatman No. 1, colectando el filtrado en un matras Erlenmeyer de 50 ml ó cualquier recipiente adecuado. Llenar una celda de 1 cm con el extracto de la harina, y otra celda con el solvente correspondiente.

Determinar la absorbancia (A) con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 435.8 nm. A partir del promedio de 3 lecturas, calcular el contenido de pigmentos en la muestra, como carotenoides en ppm, con la ayuda de la curva estandar, o, en ausencia de carotenos estandar, partiendo de la siguiente fórmula:

$$C = 5.0 \times A / b \times K = 30.1 \times A$$

donde:

C = concentración de pigmentos, como carotenos en ppm; b = espesor de la celda (en cm); K = 0.16632 (mg/l para carotenos a 435.8 nm en H₂O saturada de n-BuOH, en una celda de 1 cm).

Precaución: Utilizar estrictamente celdas limpias y filtrar en papel.

Emplear como blanco solución de H₂O saturada de n-BuOH filtrada.

V.2.7.- METODO DE RESONANCIA EN EL ESPECTRO DE RAMAN, PARA DETERMINACION DE XANTOFILAS (CAROTENOIDES EN GRAL.) EN PLASMA SANGUINEO. (91,145)

Larson y Hellgren reportaron en 1974 que, tanto el espectro de Raman, como el de fluorescencia, del plasma sanguíneo, cambian moderadamente dependiendo del estado de salud del individuo. El espectro Láser de Raman del plasma sanguíneo exhibe tres bandas máximas sobrepuestas en un fondo fluorescente. Se sabe que éstas bandas, antes no identificadas, corresponden a los carotenoides presentes en el plasma, habiéndose reportado la detección directa de dichos pigmentos en el plasma sanguíneo por medio del método de resonancia, en el espectro de Raman.

Los pigmentos carotenoides son intensamente coloridos, por lo que el acoplamiento de sus comportamientos electrónico y vibracional dan lugar a un espectro de resonancia aumentado, el cual puede ser detectado a 10^{-7} m. Experimentos previos han demostrado que los carotenoides son transportados por las proteínas del plasma, a niveles de aproximadamente 10^{-6} m. Así, Rein et.al. opinan que la observación directa de carotenoides, por medio de la técnica de resonancia en el espectro de Raman es posible.

DETERMINACION.

Se extrae la muestra de sangre del individuo (por vía venosa). La sangre se colecta en tubos heparinizados. Después de centrifugar durante 10 min a 2,500 rpm, se inyectan 0.1 ml del plasma dentro de un tubo capilar de vidrio, de 0.1 mm de diámetro, con mucho cuidado, evitando la formación de burbujas de aire.

Para la determinación, se puede emplear un espectrofotómetro Cary 82 (ó el equivalente) con un láser de argón. El tubo capilar se ajusta en el centro del enfoque de la línea verde (514.5 nm), con el eje del tubo capilar paralelo al haz de luz.

Se determina cuidadosamente el poder láser utilizado en la determinación

de la muestra, que debe ser de 150 mV.

La fluorescencia máxima y las bandas extensas de Raman, tales como las vibraciones de las uniones O-H, podrían ser separadas utilizando diferentes longitudes de onda de excitación (las líneas a 514.5 y 488 nm). Los efectos de fluorescencia deben pronunciarse en el rango comprendido entre los 542 y los 648 nm. Esto corresponde, en el espectro de Raman, al rango de 1000 a 4000 cm^{-1} , con excitación por la línea de 514.5 nm.

Determinaciones repetitivas en plasma de sangre humana han dado como resultado los tres valores máximos a 1517, 1157 y 1005 cm^{-1} (Lasser de Ar^+ a 514.5 nm). Estas frecuencias se comparan con aquellas obtenidas para trans- β -caroteno, al cual corresponden $\nu_2 = 1523$, $\nu_1 = 1157$, y $\nu_4 = 1006 \text{ cm}^{-1}$, siendo dichos valores similares al espectro de resonancia de Raman de otras especies de carotenoides.

Debido a que las proteínas ligadas a los carotenoides tienen una gran influencia en el espectro observado, es necesario llevar a cabo procedimientos de extracción y fraccionamiento. El plasma sanguíneo humano se desnaturaliza con metanol, y la suspensión resultante se extrae con éter de petróleo.

El espectro de Raman de la fase etérea concentrada muestra los incrementos esperados de las tres bandas de carotenoides, las cuales aparecen en idénticas frecuencias a las del plasma no tratado.

Los procedimientos de fraccionamiento se llevan a cabo para determinar la contribución de los carotenoides específicos en el espectro de Raman total. Se obtienen varias bandas coloridas mediante un método cromatográfico, empleando eluyentes de polaridad creciente en forma gradual.

El nivel de carotenoides no puede ser detectado directamente en el plasma sanguíneo utilizando mediciones de absorción visible, debido a la interferencia de otros componentes coloridos, como la bilirrubina, la cual absorbe en la misma región.

V.2.8.-IDENTIFICACION DE XANTOFILAS ESTERIFICADAS CON ACIDOS GRASOS. (55,85)

METODO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS, PARA MUESTRAS OBTENIDAS POR EL METODO DE CRMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION Y DISTRIBUCION C.C.

Aparatos:

Se puede utilizar un cromatógrafo de alta resolución para líquidos, como el modelo 1084 B con sistema automático de inyección (tipo 79 842/79 841 A) y detector de longitud de onda variable (tipo 79 875 A) (Hewlett-Packard, Waldbronn, R.F.A.). Las columnas analíticas (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno) pueden ser Columnas Batch 79 6434 (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.) empacadas con RP-18 (5 μ m). La columna preparativa (25 x 2.5 cm) se empaca con Li-Chrosorb RP-18 (10 μ m) (E. Merck).

Un aparato de distribución contra-corriente (DCC) (Labotec, Basle, Switzerland) se equipa con tubos de distribución de 240 cm. El volumen de la fase del aparato debe ser de 50 ml.

Se utiliza un espectrofotómetro del tipo 554 (Perkin-Elmer, Überlingen, R.F.A.) para registrar el espectro de absorción. El espectro de masas se registra en un aparato de MATCH 5/DF (anteriormente Varian, ahora Finnigan-MAT, Bremen, R.F.A.): energía de electrón, 70 eV; fuente de temperatura, 200°C; entrada directa; monitor de temperatura, 250°C.

Reactivos y materiales iniciales:

Los eluyentes utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acetonitrilo y diclorometano, deben ser de alta calidad. La dimetilformamida, n-hexano, y diclorometano, utilizados para distribuciones líquido-líquido, deben ser q.p. Las determinaciones en el espectro UV deben llevarse a cabo en n-hexano (Dvasol). Todos los solventes empleados pueden ser provistos por E. Merck.

Para comenzar la parte cromatográfica debe emplearse un extracto purificado de la muestra en cuestión.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

Una columna HiBar de Merck (12.5 cm x 4 mm), empacada con RP-18 (5 m) es utilizada para el análisis del material inicial. Como fase móvil se emplea diclorometano-acetonitrilo (25:75, v/v) y la velocidad de flujo 3 ml/min. El detector se calibra a 471 nm. Una solución al 0.1% (20 l) del material inicial es inyectada al aparato.

Una columna preparativa (25 cm x 25 mm de diámetro interno), empacada con LiChrosorb RP-18 (10 m), es utilizada para la separación semipreparativa de los componentes individuales del extracto de la muestra. La fase móvil debe ser una mezcla de acetonitrilo-diclorometano (65:35, v/v); la velocidad de flujo 15 ml/min. La detección se efectúa a 471 nm. Cada muestra (1 litro x 25 µg disueltos en 250 l de eluyente) se introduce en la columna a través de la abertura para muestra.

Las sustancias separadas son recolectadas y el solvente removido bajo un flujo de argón a 30°C sobre un evaporador rotatorio.

Preparación del dipalmitato de xantofila estandar por distribución líquido-líquido.

Una cantidad de 25 g del material inicial se disuelve en 375 ml de dimetilformamida-diclorometano-hexano (8:2:10, v/v/v) transfiriéndose a los primeros cinco tubos del tren de distribución: número de tubos de distribución, 240; volumen de la fase inferior, 50 ml; fase superior, 25 ml; factor de volumen, 0.5; intensidad de agitación, 40; número de movimientos de agitación, 30; tiempo de separación, 2.5 min. La distribución de líquido-líquido se efectúa en dimetilformamida-diclorometano-hexano (8:2:10, v/v/v) bajo argón con exclusión de luz, utilizando un procedimiento recíproco. El desarrollo de la separación es monitoreado por CLAR (cromatografía líquida de alta resolución). Después de que n° 2025 transfere - rencias la principal fracción se encuentra en los tubos del 35 al 65.

Los solventes utilizados deben ser previamente saturados con argón. Las fracciones de los tubos del 3^o al 6^o se combinan y la fase superior evitando la exposición a la luz directa. La fase inferior se extrae 4 veces con 500 ml de n-hexano cada vez, los extractos de hexano se combinan con la fase superior, y las fases orgánicas combinadas se lavan dos veces con 500 ml de agua para eliminar la dimetilformamida. Enseguida, la fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio evaporándose el solvente a 40°C en un evaporador rotatorio (bomba de vacío). El residuo se seca durante 16 horas a 30°C en sílica gel azul y hojuelas de parafina en una estufa de vacío. Se calcula el rendimiento de dipalmitato de xantofila puro. También se compara el espectro de absorción con el reportado en la literatura. (55,85)

VI .- RESULTADOS Y DISCUSION.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En base a la información recopilada, existen varios aspectos a discutir. Uno de ellos es la adición de Carotenos y Xantofilas en productos destinados a la alimentación humana y la de animales, principalmente aves de corral.

Esta adición de carotenoides a los alimentos constituye en realidad una sofisticación, pues su principal finalidad es la de mejorar las características visuales de los productos en los que se emplean, ya sea un tipo específico o una mezcla de carotenoides.

El hecho de que tal adición esté aceptada oficialmente y se controle mediante Normas, no significa que los pigmentos no sean empleados en ocasiones de manera excesiva, lo cual constituye una adulteración (aún en los casos en que los niveles adicionados sean muy bajos).

Existen casos de productos alimenticios en los que se prohíbe estrictamente el empleo de colorantes, tanto naturales como sintéticos, a pesar de lo cual, muchas veces se encuentran adulteraciones, y en algunos de éstos casos, las adulteraciones son detectadas tomando como referencia o como prueba confirmativa la presencia de Carotenoides que no se encuentran en forma natural en algunas especies o grupos de alimentos. ^(39,136,178)

Por el contrario, en algunos casos, la adición de ciertos grupos de carotenoides sí está permitida, pues desde el punto de vista nutricional resulta benéfica, ya que algunos de éstos carotenoides son precursores de la vitamina "A", como es el caso del β -caroteno. ⁽¹⁵⁹⁾

Otro aspecto digno de discusión es, de manera general, la determinación, ya sea cualitativa o cuantitativa, de Carotenos y Xantofilas, en cualquier tipo de muestra.

Primeramente, es necesario mencionar la importancia que tiene el mantener la muestra en condiciones que desfavorezcan la degradación de los pigmentos antes de su análisis, lo cual es recomendado por todos y cada uno

de los autores, principalmente por aquéllos que han fijado su atención en la investigación para desarrollar nuevas técnicas de análisis, o para modificar las ya existentes. ⁽⁵⁵⁾

Generalmente, los investigadores se inclinan por los métodos novedosos, o bien, desarrollan sus propias técnicas. ^(19,143,152) En tanto que, para los análisis rutinarios, los que predominan son los métodos oficiales, ya sean colorimétricos, o espectrofotométricos, a pesar del tiempo tan prolongado que algunos de éstos métodos implican, debiéndose tal elección al factor económico principalmente, pues los costos del análisis resultan menores al utilizar los métodos espectrofotométricos y colorimétricos, en comparación con los análisis efectuados por medio de técnicas más sofisticadas. ^(45,145,183)

Independientemente del método seleccionado, se toma siempre en cuenta el seguimiento de ciertas precauciones para evitar o minimizar la degradación de los pigmentos en la muestra, además de que siempre se procura obtener resultados eficaces y confiables, aunque no en todos los casos de manera rápida. ⁽⁴²⁾

Por otra parte, el uso de solventes como disulfuro de carbono, el benceno, acetona, el hexano, el metanol, etc., es muy favorecido, por la tendencia de éstos a disolver con mayor eficiencia los pigmentos, ya sea utilizándolos en forma individual, o preparando mezclas de varios solventes, ⁽¹⁰³⁾ en cuyos casos se ha encontrado todavía mayor eficiencia.

Substancias como el Metanol, ⁽¹¹⁵⁾ que presentan ciertos problemas de manipulación, se prefieren usualmente en combinación con otras sustancias como la acetona, o el etanol ⁽¹⁵⁷⁾, que disminuyen en gran medida el riesgo que implica su utilización. Entre las mezclas de solventes más utilizadas por su eficiencia, se encuentran las de Metanol - Acetona - Hexano - Etanol ^(17,102), Acetona - Eter de petróleo ^(143,144,173), Benceno - Acetato de etilo ^(13,102), Benceno - Acetato de etilo - Etanol ^(143,163), Acetona - Hexano - Etanol - Tolueno, etc. ^(4,5,6,7,32,122)

Las mezclas de solventes son preferidas, dependiendo de la finalidad del análisis, debido a que, en conjunto los solventes son más eficientes para disolver o eluir los pigmentos carotenoides, encontrándose siempre la proporción más adecuada de cada uno de los solventes para lograr la eficiencia óptima, y tratando de disminuir el riesgo de manipulación, pues manipulando las mezclas con cuidado y precaución éstas no presentan mayores problemas (a pesar de ser altamente inflamables).

En cuanto a las precauciones que hay que tener en cuenta para con la muestra, antes de efectuar el análisis, e incluso durante el mismo, varios autores recomiendan principalmente el evitar la exposición directa de la muestra al aire ⁽⁹⁴⁾, así como a la luz directa ^(81,93), sugiriéndose el empleo de equipo de iluminación especial, o bien, el empleo de corrientes de Nitrógeno. ⁽¹⁰⁸⁾

En la mayoría de las investigaciones, los productos alimenticios son evaluados para determinar su capacidad para pigmentar las yemas de los huevos de gallinas, ya sea mediante la determinación de la cantidad de pigmentos presentes en la yema, o bien, mediante la cuantificación del color resultante. Cualquiera de éstos métodos puede resultar satisfactorio para la determinación o comparación de productos del mismo tipo o similares (o sea, conjuntos similares de pigmentos), pero los mismos métodos han probado ser inadecuados en la comparación de diferentes productos alimenticios, en los que las xantofilas presentes pueden contribuir a coloraciones totalmente diferentes en el producto final ^(48,49,50).

Varios de los reportes publicados comparan la "disponibilidad" de diferentes especies alimenticias por cuantificación del color, o comparan el color resultante por medición de la deposición de los pigmentos. Esto ha conducido a una cantidad poco común de confrontación de datos entre diferentes autores en la comparación de las propiedades de pigmentación relativas de un número considerable de productos analizados. ⁽⁵⁰⁾

Middendorf et al. ^(116,117) reportaron un método único diseñado para evaluar la capacidad de pigmentación de un gran número de productos. Dicho método se basa en proporcionar un contenido de xantofilas conocido a los animales de experimentación, determinando posteriormente el contenido de xantofilas en el suero después de un intervalo de tiempo establecido. Es así como, hasta ahora, ha sido posible comparar la "disponibilidad" de las xantofilas contenidas en un gran número de productos.

Un problema importante con el método de Middendorf es su incapacidad para proporcionar información en cuanto a las diferencias en los perfiles o grupos de xantofilas en los materiales de prueba. Fletcher ⁽⁵⁰⁾ propone un método de evaluación de fuentes de xantofilas mediante la comparación del perfil de xantofilas y el contenido en el producto, contra el contenido de xantofilas y el perfil depositado en la yema de huevo (o en la piel de las aves) y relacionándolo además con el color real producido. Burdick y Fletcher ⁽²¹⁾ evaluaron diferentes productos, en los cuales compararon el contenido de xantofilas en el alimento contra el contenido de xantofilas y el color en las yemas de los huevos resultantes. Contrariamente a los resultados reportados por Middendorf et al ⁽¹¹⁷⁾, ellos encontraron que había solamente pequeñas diferencias entre los distintos productos analizados en cuanto a la disponibilidad de sus respectivas xantofilas.

Las diferencias en la disponibilidad de las xantofilas entre varias de las fuentes alimenticias pueden deberse no solamente a las diferencias en el perfil de xantofilas (proporción entre las mismas), sino también a las diferencias en las matrices celulares, las cuales envuelven a las xantofilas, como sugieren Scott et al. Estos autores declaran además que la utilización de xantofilas químicamente determinadas es más eficiente para los carotenoides libres que para aquéllos que se encuentran unidos dentro de las células en los productos naturales tales como la alfalfa. Se puede concebir, entonces, la posibilidad de que durante la

industrialización de los productos, tales como la alfalfa, pueden provocar diferencias en cuanto a la disponibilidad de las xantofilas, teniendo como base el criterio expuesto anteriormente. Es decir, que las disponibilidades pueden diferir entre un alimento a base de alfalfa contra un producto concentrado, debido a las diferentes condiciones en el proceso de industrialización, ya sea por seleccionar diferentes perfiles de las xantofilas componentes en cada producto, o bien, a ciertas alteraciones en la naturaleza o en las cantidades de las matrices celulares que envuelven al perfil de xantofilas característico de cada fuente. Diferentes perfiles o contenidos de xantofilas disponibles pueden producir marcadas diferencias en el color final de las yemas. En este tipo de experimentos, Fletcher et al. ⁽⁵⁰⁾ recomiendan utilizar los métodos espectrofotométricos, tales como los propuestos por la A. C. A. C. (ellos utilizaron el método de la A.C.A.C. de 1980 para determinación de carotenoides en materiales vegetales frescos o secos), debido a su eficiencia y reproducibilidad en los resultados, así como la sencillez de la técnica. Mediante éste método, ellos pudieron comprobar que la utilización de las xantofilas es por lo general más eficiente a bajos niveles de dichos pigmentos en la dieta.

Si bien, entre los métodos espectrofotométricos para la detección de carotenoides no hay diferencias considerables, si existen grandes diferencias entre los métodos cromatográficos, tanto en lo que se refiere a materiales, tiempos, costos, complejidad, etc.

En el caso del método de Cromatografía en Capa Fina, Robeiz ⁽⁴³⁾ reporta que la separación de los pigmentos tiene como principal inconveniente la relativa cercanía entre las bandas de diferentes pigmentos, lo cual disminuye la eficiencia del método, sobre todo tratándose de experimentos que tienen la finalidad de cuantificar los pigmentos presentes en una muestra determinada, como en el caso de la extracción de Lutefina, efectuada por Turgeon y Lester ⁽⁴⁷⁾, quienes reportan una eficiencia del 47 %

en la extracción, lo cual probablemente se debe, según afirman ellos, a las uniones existentes entre los carotenoides y las proteínas dentro de los cloroplastos.⁽¹³⁾

Por otra parte, Puokle y Rahman⁽¹⁴⁾, habiendo empleado la Cromatografía en capa fina para la separación de pigmentos carotenoides, reportan que el método resulta rápido y eficiente si se emplea Celulosa como fase estacionaria, ya que ésta no reacciona ni favorece la isomerización de los carotenoides, como sucede con el óxido de aluminio, el óxido de magnesio ó la sílica, cuando se utilizan como adsorbentes, aún bajo las mismas condiciones de trabajo, como reportan Sestak, Strain et al. y Strain y Svec. Además de la ventaja antes mencionada, la celulosa presenta una mejor adhesividad mecánica y una mayor resistencia a las fracturas, especialmente cuando las soluciones de los pigmentos son aplicadas en forma de líneas, bandas o en cualquier forma y lugar. Sin embargo, la celulosa se puede desprender con facilidad de la placa cuando las bandas son removidas para la elución de los pigmentos.⁽¹⁵⁾

En resumen, las capas finas de celulosa y una variedad de mezclas de solventes proporcionan un sistema cromatográfico para la rápida separación sin degradación de los pigmentos carotenoides.

Por su parte, el método de Cromatografía Líquida de Alta resolución ha sido probado con excelentes resultados. Eskins y Dalton lo han empleado utilizando un gradiente desde 90% de metanol hasta acetato de etilo.⁽¹⁶⁾ Posteriormente, Wright y Shearer^(17,18) encontraron que el sistema proporciona una resolución adecuada para la mayoría de los pigmentos, aunque los primeros picos eluidos son bajos y amplios, lo cual dificulta su detección y su integración, tratando de resolverse éste inconveniente mediante la utilización de diferentes sistemas de solventes, teniendo en consideración, que para trabajos de cuantificación se requiere un valor de resolución de al menos 1.0.

Los cromatogramas obtenidos por Wright y Shearer⁽¹⁸³⁾ muestran una excelente separación de la mayoría de los pigmentos. Los carotenoides más significativos en estudios ecológicos como la peridina, la fucoxantina, diadinoxantina y luteína, pueden ser totalmente resueltos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Mediante esta técnica se puede obtener una notable resolución al separar zeaxantina y luteína cuando se encuentran presentes en una misma muestra, lo cual resulta bastante complicado debido a que tales compuestos difieren únicamente en un doble enlace en la configuración de un grupo terminal, por lo cual su resolución no había sido reportada previamente en cromatografía líquida de alta resolución, de fase reversible.

Wright y Shearer⁽¹⁸³⁾ encontraron que el método de cromatografía líquida de alta resolución es simple, rápido y fácilmente reproducible, siendo bastante adecuado para muestras de fitoplancton, así como muestras de zooplankton, flora intestinal y otras, en las que los límites de detección para pigmentos como la fucoxantina, por ejemplo, son del orden de 0.3 ng.

Aunque la técnica de extracción puede variar de acuerdo con el tipo de muestra, el sistema cromatográfico reportado por Wright y Shearer ofrece una mayor resolución para pigmentos carotenoides que otras técnicas reportadas hasta la fecha, por lo cual es muy empleada en aquellas investigaciones en las que se requiere la cromatografía de pigmentos vegetales.

Gau et al.,⁽⁵⁵⁾ tras haber empleado la Espectrometría de Masas para la identificación de xantofilas obtenidas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, encontraron que el espectro de absorción de un extracto de *Tagetes erecta* (utilizado como material de prueba) exhibe un máximo típico de las xantofilas, el cual, sin embargo, se encontró recorrido hipocromómicamente por varios nanómetros, comparado con los valores de la literatura, a pesar de que el espectro fue registrado utilizando el mismo solvente y después de haber calibrado el aparato en la longitud de onda ade

cuada. Posteriormente, el análisis del extracto por Cromatografía Líquida de Alta Resolución mostró que éste contenía cinco componentes principales, cuyas estructuras fueron dilucidadas con la ayuda de la espectrometría de masas. En investigaciones previas de xantofilas esterificadas, se había empleado la Cromatografía de Capa Fina, pero la resolución de ésta ha sido superada por la de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La separación de mezclas de ésteres y diésteres de xantofilas no había sido posible por Cromatografía de Capa Fina, mientras que con la Cromatografía Líquida puede realizarse con gran satisfacción. Además, al utilizar la Distribución Contra Corriente de Craig, el curso de la separación de los pigmentos es matemáticamente calculable y controlable, a diferencia de aquéllos casos en los que se emplean otras técnicas cromatográficas.

En resumen, la separación de xantofilas esterificadas, contenidas en muestras vegetales, es exitosamente realizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Además, ha quedado demostrado que, para la preparación de grandes cantidades de xantofilas puras, el método de Distribución Contra Corriente, de Craig, es el más adecuado.

En cuanto a otros métodos de detección de pigmentos carotenoides, que son técnicas más sofisticadas, Rein et al. ⁽¹⁴⁵⁾ reportan sus investigaciones en plasma sanguíneo para la detección de pigmentos carotenoides mediante la técnica de Espectroscopía Raman de Resonancia, con la cual demuestran que bajos niveles de β -caroteno, licopeno, y xantofila, producen bandas de resonancia aumentadas, en el plasma sanguíneo. Tales resultados explican el significado de espectros aumentados, previamente obtenidos sin ser identificados, los cuales han sido relacionados con el estado de salud del donador de sangre en cuestión.

Proviamente, en 1974, Larsson y Hellgron ⁽⁹⁷⁾ habían reportado que tanto el espectro Raman como el de fluorescencia, del plasma de sangre humana, se

modifica notablemente, dependiendo del estado de salud del individuo. El espectro Raman de laser, del plasma sanguíneo, exhibe tres máximos modificados superpuestos en un fondo fluorescente. Posteriormente, en 1976, Rein et al.⁽¹⁴⁵⁾ han reportado que esas bandas, previamente encontradas, sin haber sido identificadas, son producidas por los carotenoides en el plasma sanguíneo, reportándose así la detección directa de carotenoides en plasma por espectroscopía Raman de resonancia.

El nivel de carotenos no puede ser directamente detectado en el plasma sanguíneo utilizando mediciones de absorción en el espectro visible, debido a la interferencia por otros componentes coloridos, tales como la bilirubina, que absorbe en la misma región.

Auf, la espectroscopía Raman, mostrando las pequeñas, pero distintas bandas de carotenoides del plasma, ha sido la primera demostración de detección directa por cualquier método, evitándose el problema de la extracción de los carotenoides implicado en cualquier otro método de detección.

A pesar del desarrollo de nuevas técnicas de detección de pigmentos carotenoides, éstas no han podido ser implantadas como técnicas oficiales, por varias razones; entre las que se encuentran los altos costos, la falta de equipo, etc. Por otra parte, hay que considerar que tales técnicas únicamente se utilizan con fines de investigación, por lo cual continuamente sufren modificaciones para su optimización.

Con respecto a los métodos a utilizar, no existe mucha variedad, como podría suceder con otro tipo de muestras. Las técnicas existentes no difieren mucho en su fundamento, pero sí en cuanto a los reactivos utilizados, los límites de detección, la sensibilidad, los aparatos o el equipo de trabajo, las condiciones, y el tiempo de las determinaciones.

Al efectuar un análisis de detección de pigmentos carotenoides es necesario considerar una serie de puntos para seleccionar el método más ...

adecuado, como son: sensibilidad, precisión, exactitud, costo (de equipo, reactivos, mano de obra, etc.), así como la finalidad del análisis a efectuar, que puede ser rutinario, de investigación, comparativo, para control de calidad, para detectar adulteraciones, etc.

Las técnicas de detección y cuantificación de carotenoides, se han mejorado con el paso del tiempo, en ocasiones, desplazándose unas a otras. La determinación de cromatografía en papel fué una de las primeras técnicas utilizadas, mas, como se menciona en el capítulo correspondiente a los métodos de análisis, hay que seguir una serie de pasos a menudo tediosos y tener ciertas precauciones, lo que incrementa el tiempo de análisis. Por otra parte, hay que tomar en cuenta la especificidad del método ante los diferentes tipos de muestras a analizar (vegetales frescos, deshidratados, alimentos preparados, frutas, flores, plasma sanguíneo, etc.), por lo que no se recomienda aplicar métodos específicos para muestras no adecuadas.

En 1906, Tawett desarrolló el primer método para la identificación de carotenoides, extrayendo éstos de una planta con éter de petróleo, y haciendo pasar la solución a través de un tubo de vidrio empacado con carbonato de calcio finamente pulverizado. Al resultado obtenido, Tawett lo llamó "cromatograma". Esta primera técnica cromatográfica presenta muchas deficiencias, sobre todo en lo referente a resolución de los pigmentos, así como al incremento de las posibilidades de degradación de los mismos, aunque para fines cualitativos exclusivamente, éste no representa una desventaja importante.

Posteriormente, aparecieron las técnicas de cromatografía en papel y en capa fina, obteniéndose poco a poco mejores resultados, a medida que los nuevos descubrimientos conducían a los investigadores a optimizar cada vez más las técnicas de extracción y elución, seleccionando los mejores solventes o bien, elaborando mezclas ideales para casos específicos.

Las técnicas cromatográficas de detección de pigmentos carotenoides

no fueron desplazadas por los métodos instrumentales, sino más bien, éstos han venido a servir de complemento, pues concretamente, con el surgimiento de los colorímetros, espectrofotómetros y otros instrumentos que permiten medir la absorbancia de una solución a una determinada longitud de onda y posteriormente calculando la concentración de pigmentos con la ayuda de curvas patrón, se han podido desarrollar técnicas que involucran una etapa de cromatografía para la separación de los pigmentos, complementando el análisis con la etapa de cuantificación empleando algún instrumento de medición.

Varios de los métodos, tanto cromatográficos, como colorimétricos, aún siendo de los primeros métodos que aparecieron, siguen siendo empleados para la determinación de carotenos y xantofilas, siendo sus resultados concordantes con los obtenidos a partir de métodos más recientes.

La separación y la identificación de pigmentos carotenoides ha estado muy restringida a la cromatografía en papel, en capa fina y en columna. La cromatografía de gases ha encontrado solamente una limitada aplicación en el análisis de pigmentos. La cromatografía líquida de alta resolución fué desarrollada como una herramienta complementaria para la cromatografía de gases, particularmente para la separación de compuestos iónicos no volátiles. Esta elimina las posibilidades de formación de derivados, así como la degradación de los pigmentos por efectos del calor, sobre todo de compuestos lábiles. Esta técnica ofrece muchas ventajas. Las altas capacidades de resolución de la cromatografía líquida, hace posible que en sus columnas se lleve a cabo la separación de complejas mezclas de pigmentos vegetales. Los tiempos de análisis, incluyendo la separación de la muestra, son generalmente menores que en otros métodos cromatográficos y en muchas ocasiones, la separación total se lleva a cabo en 30 minutos. La interacción de la energía luminosa con los pigmentos, hace que éstos resulten particularmente adecuados para la cromatografía líquida y sus

métodos, los cuales utilizan la espectrometría como medio de detección. La alta sensibilidad de los detectores ultravioleta-visible y de fluorescencia hace posible el análisis de muestras muy pequeñas. Las grandes cantidades de muestras también pueden ser analizadas por cromatografía líquida preparativa, la cual es particularmente usual para la colección de componentes individuales.

Los métodos cualitativos y cuantitativos que se han desarrollado para el análisis de pigmentos carotenoides, han dado lugar a un gran número de avances en el estudio de los pigmentos vegetales en general, y continúan incrementando los esfuerzos de investigación en este campo.

VII.- CONCLUSIONES .

VII.- CONCLUSIONES.

- Los carotenoides son pigmentos liposolubles, por lo cual se requieren para su extracción, disolventes como el benceno, acetona, etanol, tolueno, éter, cloroformo, disulfuro de carbono, etc.
- En algunas ocasiones, se requiere de una purificación preliminar, la que generalmente involucra una hidrólisis alcalina de los lípidos o ésteres de carotenoides hidroxilados, seguida del método de separación, que generalmente es cromatográfico.
- Deben tomarse precauciones para prevenir prolongadas exposiciones de los pigmentos carotenoides al calor, al oxígeno y a la luz, y en el caso de efectuar análisis por cromatografía líquida de alta resolución, debe tratarse de que la adsorción a ciertas fases estacionarias sea mínima, para evitar la alteración de los pigmentos.
- La estructura altamente conjugada de los carotenoides es la base para su detección y cuantificación, mediante la utilización de la espectroscopía visible y ultravioleta.
- La aparición de la cromatografía líquida de alta resolución ha constituido un recurso para mejores avances en el estudio de pigmentos carotenoides. Además, la gran capacidad de resolución de dicha técnica cromatográfica ha hecho posible la separación de carotenoides estrechamente relacionados, los cuales previamente habían sido imposibles de separar.
- Los métodos cualitativos y cuantitativos de cromatografía líquida de alta resolución han encontrado una amplia aplicación para la separación e identificación de una gran variedad de pigmentos vegetales.
- Comparada con otras técnicas cromatográficas, la HPLC, además de que es muy precisa, sensible y requiere de menos tiempo. La preparación previa de la muestra para la cromatografía es generalmente mínima, siendo suficiente la mayoría de las veces un simple paso de extracción. Los tiempos de retención y los resultados del espectro de pigmentos individuales obtenidos

nidos durante la cromatografía han resultado ser una valiosa ayuda para propósitos de identificación.

- Los primeros métodos desarrollados para la separación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución utilizaban la cromatografía de adsorción con fases móviles no polares. Las columnas de fase reversible han encontrado reciente aplicación en el estudio de esos pigmentos.
- Muchas de las técnicas desarrolladas para la separación de carotenoides son aplicables para la determinación simultánea de carotenos, xantofilas y clorofilas, ya que todos éstos pigmentos están relacionados y se encuentran presentes en forma natural en el mismo tipo de muestras.
- La mayoría de las investigaciones sobre pigmentos carotenoides están orientadas a la determinación del contenido de xantofilas en productos vegetales, para su utilización como fuentes pigmentantes en la carne y huevos de aves de corral. Es decir, que los análisis más frecuentes se efectúan en las fuentes de pigmentos o bien, en las especies animales que son el objeto de tal pigmentación.
- Entre las fuentes de pigmentos más importantes a nivel comercial se encuentran los pétalos de flores de Taraxacum erecta (campanúchil) y recientemente el alga espirulina, aunque también es de mediana importancia el contenido de xantofilas de la alfalfa y de algunas variedades del maíz.
- El alga espirulina, además de ser una buena fuente de xantofilas es biológicamente más potente que la flor de campanúchil y otras especies, además de que dicha alga es una fuente de proteínas muy importante.
- Para fines de pigmentación de aves de corral, se ha demostrado que, a medida que aumenta el nivel de xantofilas en la dieta de estos animales, el punto de estabilización de pigmentos se logra más rápidamente.
- Se pueden emplear dosis altas de xantofilas en casos de emergencia, en que se tengan parvadas que por alguna razón, al momento de aproximarse

la venta de los animales al mercado se encuentran con baja pigmentación.

- Las xantofilas esterificadas, extraídas de los pétalos de Tagetes erecta, han sido objeto de un gran número de investigaciones. Se ha encontrado que en las flores de T. erecta, las xantofilas se encuentran esterificadas con los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico, que son ácidos grasos. Estas xantofilas esterificadas con ácidos grasos, se pueden purificar para su utilización en algunos alimentos como colorantes de origen natural.
- Además del uso como colorantes, los productos de esterificación de xantofilas y ácidos grasos pueden tener otras aplicaciones. Un extracto purificado de pétalos de flores de T. erecta, conteniendo principalmente dipalmitato de xantofila (luteína dipalmitato), es comercializado como agente oftalmológico bajo el nombre de Adaptinol[®].
- Los pigmentos carotenoides se obtienen por deshidratación de materiales vegetales, lo cual implica gastos de combustible y pérdidas de pigmentos, por lo cual algunas de las investigaciones se han orientado a la optimización de los métodos de extracción de carotenoides.
- Las xantofilas libres, como la violaxantina se degradan en función del tiempo y la temperatura de los procesos de industrialización, a diferencia de los diésteres de xantofilas, que aumentan durante el almacenamiento y cuyo contenido se afecta sólo ligeramente durante la industrialización.
- La etoxiquina, que es un antioxidante, evita la degradación de las xantofilas y favorece su absorción durante la digestión y el proceso de absorción en el organismo de las aves, encontrándose un incremento lineal (directamente proporcional) dependiendo de la cantidad de etoxiquina utilizada.
- Habiéndose estudiado ampliamente la absorción, el transporte en el plasma sanguíneo, y la acumulación de los pigmentos carotenoides en aves,

se ha comprobado que las xantofilas se absorben y se transportan únicamente en su forma libre, ya que en el tracto digestivo tiene lugar una hidrólisis de ésteres de xantofilas. Sin embargo, la acumulación de dichos pigmentos en los tejidos ocurre tanto en forma libre como esterificada.

- No se puede hacer una diferenciación formal ni de una especificidad estricta entre los métodos analíticos para la determinación de los dos tipos de pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas); es decir, que los métodos empleados para determinar xantofilas son básicamente los mismos métodos empleados para el análisis de carotenos, debido a la estrecha relación que existe entre ambos tipos de pigmentos, adaptándose únicamente las técnicas analíticas y estableciendo condiciones especiales para casos específicos de algún pigmento o un grupo de carotenoides, siendo casos muy frecuentes el de la Luteína y de β - caroteno.

VIII.- B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Abaychi, J. K. and Riley, J. F. *Anal. Chim. Acta* 107, 1. (1979).
- 2.- Antic, Naval., Cheng, Joseph Y. *Phycologia* 22 (3), 235-242 (1983).
- 3.- Ariki, J., Favoretto, V., Castilho, A. C., Oliveira, Filho, J. J. *Cientifica* 6 (3), 477 - 481 (1978).
- 4.- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 9 th Ed., Secc. 43.018-43.023. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D. C. (1960).
- 5.- Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis*, Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., 10 th ed., (1965), p. 261.
- 6.- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 12 th Ed., p.p. 822-823. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, D. C. (1975).
- 7.- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 13 th Ed., p.p. 256, 257, 269, 270, 320, 334, 335, 336. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, D.C.
- 8.- Avila, G. E. y Cuca, G. *Técnica Pecuaria* 26, 47-48 (1974).
- 9.- Barret, J. and Jeffrey, S. W. *Plant Physiol.* 33, 44 (1964).
- 10.- Baumann, T. and Grimme, L. H. *Journal of Chromatography* 170, 264 (1979).
- 11.- Ben'ko, G. M. *Rastit. Resur.* 19 (4), 516 - 520 (1983).
- 12.- Beshanova, H. V. and Gevorgyan, A. G. *Botanic Zh.* 59 (12), 1808 - 1812 (1974).
- 13.- Bitton, G., and Goodwin, T. W. Chlorophyll, carotenoid pigments and sterols. In G. W. Butler and Bailey, R. W. (Eds.), *Chemistry and biochemistry of herbage*, I, 477-510. Academic Press, N.Y. (1973).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 14.- Brambila, D., Pino, J. A. and Mendoza, C. Poultry Science 42 (2), 249-301. (1963).
- 15.- Braumann, T. and Grinne, L. H. Biochim. Biophys. Acta 637, 8. (1981).
- 16.- Braumann, T. and Grinne, L. H. Journal of Chromatography 170, 264. (1979).
- 17.- Briton, George., Pwls, Roy. and Schulze, Rainer H. Archives of Microbiology 113 (3), 281-284. (1977).
- 18.- Brown, L. M., Hargrave, B. T. and Mackinnon, M. D. Can. Jour-
nal Fish. Aquat. Science 38, 205. (1981).
- 19.- Buckle, K. A. and Rahman, F. M. N. Journal of Chromatography 171, 385-391. (1979).
- 20.- Bunnell, R. H., Marusich, W. T. and Bauernfeind, J. C. Poultry Science 41, 1109-1115. (1962).
- 21.- Burdick, D. and Fletcher, D. L. Poultry Science 63 (10), 1946-1951. (1984).
- 22.- Burdick, Donald. and Fletcher, Daniel L. Journal of Agricultural Food Chemistry 33 (2), 235-238. (1985).
- 23.- Clydesdale, F. M. Food Technology 23, 16-22 (1969).
- 24.- Clydesdale, F. M. and Francis, F. J. Food Prod. Dev. 2 (6), 50-56. (1969).
- 25.- Coon, C. H. and Couch, J. R. Poultry Science 55 (3), 841-847. (1976).
- 26.- Couch, J. R. and Farr, F. M. Britanic Poultry Science 12, 49-55. (1971).
- 27.- Czeszuga, B. Bulletin of the Acad. Poultry Sci., Ser. Sci. Biol. 25 (7), 471-474. (1977).

- 28.- Cseccuga, N. Bull. Acad. Poultry Science, Ser. Sci. Biol. 37 (3), 627. (1972).
- 29.- Chandra, S., Netke, S. P. and Gupta, N. S. Indian Journal Animal Science 43 (5), 456-460. (1978).
- 30.- Cheng, A. L. S. and Deuel, H. J. Jr. Journal of Nutrition 41, 619-627. (1950).
- 31.- Chifa, Emil., Szako, Janos, and Tomoia Cotinel, Harfa. Journal Colloid Interface Science 95 (2), 346-354. ((1983).
- 32.- Daley, R. J., Gray, C. B. J. and Brown, S. R. J. Fish. Res. Board Can. 30, 345. (1973).
- 33.- Davies, D. and Holdsworth, E. S. Journal of Liquid Chromatog. 3, 123. (1980).
- 34.- Davis, P. M. and Kratzer, P. H. Poultry Sci. 37, 851-854. (1958).
- 35.- Davies, R. H. In Goodwin, T. W. (Editor), Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments; Academic Press, New York. p.p.489. (1965).
- 36.- Davies, R. E., Johns, M. L. and Yacowitz, H. Poultry Science 48, 1800. (1969).
- 37.- Davies, R. H., Mattows, S. and Kirk, J. T. C. Phytochemistry 2, 797. (1970).
- 38.- Davies, R. H. In Goodwin, T. W. (Editor). Chemistry and Biochemistry of plant pigments, Vol. 2, Academic Press; London. p.p.38. (1976).
- 39.- Day, E. J. and Williams, W. P. Jr. Poultry Science 37, 1373-1381. (1958).
- 40.- De Jong, D. W. and Woodlief, W. G. Journal of Agricultural Food Chemistry 26, 1231. (1978).
- 41.- Derby and De Witt. Journal of Association of Official Agricultural Chem. 31, 111. (1943).

- 42.- Douillard, Roger., Burghoffer, Chantal., and Costes, Claude.
Physiology Veg. 21 (3), 375. (1981).
- 43.- Dua, P. H., Day, E. J. Hill, J. E. and Grogan, C. C. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 15, 324-328. (1967).
- 44.- Eskins, K. and Dutton, H. J. *Analytical Chemistry* 51, 1885. (1979).
- 45.- Eskins, K., Scholfreld, C. R. and Dutton, H. J. *Journal of Chromatography* 135, 217. (1977).
- 46.- Fary, R., Montaz, A., Saleh, H. M., Fouad, Sowraya F. *Egypt. Journal of Botanic* 16 (1, 2, 3), 329- 335. (1974).
- 47.- Fiksdahl, A., Mortensen, J. T. and Liaen-Jensen, S. *Journal of Chromatography* 157, 111. (1978).
- 48.- Fletcher, D. L., Janky, D. M., Christmas, E. B., Arafa, A. S., and Harms, R. H. *Poultry Science* 56, 2061-2063. (1977).
- 49.- Fletcher, D. L. Harms, R. H., Janky, D. M. *Poultry Science* 57 (3), 624-629. (1978).
- 50.- Fletcher, D. L., Papa, C. H., Halloran, H. R. and Burdick, D. *Poultry Science* 64 (8), 1458 - 1463. (1985).
- 51.- Fry, J. L., Hinton, C. F. and Harms, R. H. *Journal of Food Sci.* 32, 508-510. (1974).
- 52.- Fry, J. L., Ahmed, E. M., Herrick, G. M. and Harms, R. H. *Poultry Science* 48, 1127-1129. (1969).
- 53.- Ganguly, J., Mohl, J. H. and Devel, H. J. *Journal of Nutrition* 50, 59-72. (1953).
- 54.- Garard, Ira. D., Ph. D., *Introductory Food Chemistry. The AVI Publishing Company, Inc. p.p. 271-274. U.S.A. (1973).*
- 55.- Gau, Wolfgang., Ploschke, Hans Juergen., Wunsche, Christian. *Journal of Chromatography* 262, 277-284. (1983)

- 56.- Gillam, L. . and Neilborn, J. N. Biochem. J. 29 , 1061-1067. (1935).
- 57.- Goeyens, L., Post, E., Dehaere, P., Vandenheut, A. and Baeyens, W. Intern. J. Environ Anal. Chem. 12, 51. (1982).
- 58.- Goodwin, T. W., In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". (F. W. Goodwin, Ed.), p.p. 225-257. Academic Press; New York. (1976).
- 59.- Goodwin, T. W., Carotenoids, their comparative Biochemistry. Chemical Publishing Co., Inc., New York. (1954).
- 60.- Grau, C. R. and Klein, H. V. Poultry Science 36, 1046-1051. (1957).
- 61.- Grossman, S., Ben Aziz, A., Budowski, P., Ascarolia, G. A., Birk, Y. and Bondi, A. Phytochemistry 8 , 2287. (1969).
- 62.- Gross, Jeana., Carmon, Michaela., Lifshitz, Abraham., Costes, Claude. Lebensw. Wiss. Technology 2 (4), 211-214. (1976).
- 63.- Grumbach, Karl. Dev. Plant. Biol. 2 (Struct., Funct. Metab. Plant Lipids), 259-262. (1984).
- 64.-Hajibrahim, S. K., Tibbets, P. J. C., Watts, C. D., Maxwell, J. R., Eglinton, G., Colin, H. and Guiochon, G. Analytical Chemistry 50 , 549. (1978).
- 65.-Hall, G. H., Livingston, A. L., Knowels, R. E. and Nelson, J. W. Poultry Science 45 , 639-641. (1956).
- 66.- Hansmann, P., and Kleinig, H. Phytochemistry 21 (1), 238-239. (1982).
- 67.- Harms, R. H., Burch, R. E., Damron, B. L. Poultry Science 63 (8), 1659-1660. (1984).
- 68.- Heiman, V. and Carver, J. S. The Yolk Color Index U. S. Egg - Poultry Magazine 41, 40-41. (1935).
- 69.- Heiman, V. and Tighe, L. W. Poultry Science 22, 102-107. (1943).

- 70.- Herriek, G. F., Frey, S. L. and Harms, R. H. Poultry Science 49, 1396-1397. (1970).
- 71.- Hinton, C. F., Fry, J. L. and Harms, R. H. Poultry Science 52, 2169-2180. (1973).
- 72.- Holman, Richard H. Botánica General. Ed. U.T.H.E.A., p.p. 51-54. México. (1965).
- 73.- Horowitz, H. Carotenes and Xanthophylls in Dried Plant Materials and Mixed Foods. Págs 739-740; in Official Methods of Analysis., 13 th Ed., Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, D. C. (1980).
- 74.-Hynnion, P. H. and Assandri, S. Acta Chem. Scand. 27, 1478.(1973).
- 75.- Iriyama, K., Yoshiura, M. and Shiraki, N., Journal of Chromatography 154, 302. (1978).
- 76.- Isler, O. and Zeller, P. Vitamins and Hormones 15, 31-71. (1957).
- 77.- Isler, C. Pure and Applied Chem. 51, 447. (1979).
- 78.- IUPAC. Commission on the Nomenclature of Biological Chemistry. Journal of American Chem. Soc. 82, 5583. (1960).
- 79.- Jacobs, Morris B. Ph. D., The chemical analysis of foods and food products. 3th Ed. Robert Krieger Publishing Co. Inc. p.p. 970. U.S.A. (1973).
- 80.- Janky, D. H., Francis, C., Dunron, B. L. and Fletcher, D. L. Poultry Science 61 (3), 467-468. (1982).
- 81.- Janky, D. H., Dukas, M. G. and Harms, R. H. Poultry Science 61 (3), 572-574. (1982).
- 82.- Janky, D. H., Voitle, R. A. and Harms, R. H. Poultry Science 64 (5), 925-931. (1985).
- 83.- Jeffroy, S. W. Limnol. Oceanogr. 26, 191. (1981).
- 84.- Joshi, K. G. and Joshi, R. H. Indian Journal of Botanic 2 (1), 32-36. (1979).

- 85.- Karrer, P. and Jucker, B. Carotenoids. Elsevier Publ. Co., New York/ Amsterdam. (1950).
- 86.- Karunajeeva, H. Britanic Poultry Science 19 (6), 699-708. (1972).
- 87.- Kirichenko, E. D., Smolygina, L. D., Serdyuk, C. P. and Vasil'eva V. P. Fiziol. Rast. 23 (1), 25-30. (1976).
- 88.- Kirichenko, A. E., Kirichenko, E. B., Chobotar, A. A., Smolygina, L. D. and Serdyuk, C. P. Fiziol. Rast. 23 (4), 697 - 701. (1976).
- 89.- Klepped, G. S. and Pieper, R. E. Marine Biology 78 (2), 193-198. (1984).
- 90.- Koch, Lehel. Hung. Taljos 17, 112. (1979).
- 91.- Knowels, R. E., Livingston, A. L., and Kohler, G. C. Agricultural Food Chemistry 20, 1127-1129. (1972).
- 92.- Kohler, G. O., Knowels, R. E. and Livingston, A. L. Journal of Association Off. Anal. Chem. 50, 707-711. (1967).
- 93.- Korniyushenko, G. A., Eudokinova, I. V. and Sapozhnikov, D. I. Fiziol. Rast. 25 (3), 510-517. (1978).
- 94.- Koroleva, C. Ya. Fiziol. Rast. 32 (3), 611-614. (1985).
- 95.- Kuznicky, D. D., Kolher, G. C., Livingston, A. L., Knowels, R. E. and Nelson, J. W. Poultry Science 48, 326-330. (1969).
- 96.- Landen, W. O. and Eitenmiller, R. R. J. Assoc. Anal. Chem. 62, 283. (1979).
- 97.- Larson, K. and Hallgren, L. Experientia 30, 481. (1974).
- 98.- Lazor, M., Curcio, R. and Vuckovick, M. Veterinaria (Sarajevo), 29 (1-2), 211-215. (1980).
- 99.- Leibetseder, J. and Scheveighardt, H. World's Poultry Science Journal 35 (4), 236 - 243. (1979).
- 100.- Lewoy, S. A. and Aorham, J. Marine Biology 80 (1), 109-115. (1984).

- 101.- Lilaen-Jensen, S. In "Carotenoids". (C. Isler, Ed.), p.p. 63-77. Birkhäuser Verlag, Basel. (1971).
- 102.- Livingston, A. L., Knowels, R. E. and Kohler, G. C. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56, 1378-1381. (1973).
- 103.- Livingston, A. L., Kuzmicky, D. D., Knowels, R. E. and Kohler, G. C. Poultry Science 48, 1678-1683. (1969).
- 104.- Livingston, A. L., Nelson, J. W. and Kohler, G. O. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52, 617-622. (1969).
- 105.- Livingston, A. Lyle., Kohler, George O. and Kuzmicky, Donald D. J. Agric. Food Chem. 28 (3), 652-656. (1980).
- 106.- Loeblich, A. R. III. and Smith, V. E. Lipids 3, 5.(1968).
- 107.- Lohle, K. and Bultcherleit. Tierzucht 13, 321-323. (1959).
- 108.- Lyon, Cameron K., Kohler, George O. Journal of Agricultural Food Chemistry 30 (5), 934-937. (1982).
- 109.- Mader, Pavel. Chladova, Jarmilla Czech. CS, 216 ,993. (1985).
- 110.- Marusich, W. L. and Bauernfeind, J. C. Poultry Science 49, 1566-1579. (1970).
- 111.- Marusich, W. L., Ritter, E. and Bauernfeind. Poultry Science 39, 1338 - 1345. (1960).
- 112.- Matus, Z., Baranyai, M., Thoht, G. and Szabolcs. Journal of Chromatographia 14, 337. (1981).
- 113.- Meck, E., Strasser, R. J. Adv. Photosynth. Res., Proc. Int. Congr. Photosynth, 6th, 1, 717-720. (1984).
- 114.- Men'Kin, V. K., Tumriev, A. D., Izv. Timiryazevsk. S-Kh. Akad. (2), 175-182. (1978).
- 115.- Mendoza de F. Carmen. Efecto de Tagetes erecta sobre la pigmenta-

- ción de la yema de huevo. Tercer Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S. A. G., p.p. 27-44. (1971).
- 116.- Middendorf, D. F., Childs, G. R., Cravens, W. W. Poultry Science 59, (7), 1460-1470. (1980).
- 117.- Middendorf, D. F., Childs, G. R., Cravens, W. W. Poultry Science 59 (7), 1442-1450. (1980).
- 118.- Mobster, J. B., Quickenbush, and Porter, J. W. Arch. Biochem. Biophys. 38, 287-296. (1952).
- 119.- Moss, G. P. and Weedon, B. C. L. In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. (T. W. Goodwin, Ed.), pp. 149-219., Academic Press, New York. (1976).
- 120.- Moutounet, H. Ann. Technol. Agric., 25 (1), 73-84. (1976).
- 121.- Mueller, Robert K., Bernhard, Kurt., Kienzle, Frank., Mayer, Hans., and Ruettimann, August. Food Chemistry 5 (1), 15-45. (1980).
- 122.- Mukherji, S., Biswas, A. K. Indian J. Exp. Biol. 19 (1), 70-72. (1981).
- 123.- Nagle, B. J., Villalon, B. and Burns, E. E. Journal of Food Science 44 (2), 416-418. (1979).
- 124.- Nagle, B. J., Villalon, B., and Burns, E. E. Journal of Food Science 44 (6), 1792-1793. (1979).
- 125.- Nakano, H. S., Kurnick, A. A., Hulett, B. J. and Reid, B. L. Poultry Science 45, 478-483. (1966).
- 126.- Natalucci, Claudia Luisa. Acta Farmacéutica Bonaerense 1 (1), 13-21. (1982).
- 127.- Neantu, Gavril., Salcjan, Gheorgi., Laslo, Tiberiu., Bilau, Corina. and Simpson, Kenneth L. Stud. Cercet. Biochim. 20 (1), 63-69. (1977).

- 128.- Nelson, T. C. Feed Pigments. *Foultry Science* 45 (4), 747-753. (1965).
- 129.- Hiemann, G. J. and Van Broderode, J. *Journal of Chromatography* 152, 523. (1978).
- 130.- Oke, H. S. and Shrikhande, A. J. *Journal of Food Science Technology* 14 (6), 280-281. (1977).
- 131.- Okombi, G., Billot, J. and Hartmann, C. *Fruits* 35 (5), 313-320. (1980).
- 132.- Omata, T., Murata, H. *Archives of Microbiology* 139 (2-3), 113-116. (1984).
- 133.- Ohta, N., Kuwata, G., Akahori, H. and Watanabe, T. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1415. (1979).
- 134.- Ocianu, D., Micoara, E. *Stud. Cercet. Biochim.* 27 (1), 76-80. (1984).
- 135.- Papa, C. M., Fletcher, D. L. and Halloran, H. R. *Foultry Science* 64 (8), 1464-1469. (1985).
- 136.- Petrovic, S. M., Kolarov, L. A. and Perisic-Janjic, M. V. *Journal of Chromatography* 171, 522. (1979).
- 137.- Pfander, H., Schurtenberger, H. and Meyer, V. R. *Chimia* 34, 179. (1980).
- 138.- Quackenbush, F. W., Kvalovskiy, S., Hoover, T. and Rogler, J. C. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 40, 1241-1244. (1965).
- 139.- Quackenbush, F. W., Dyer, M. A., and Smallidge, R. L. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53, 181-185. (1970).
- 140.- Radunz, Alfons. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 33 C (11-12), 941-947. (1978).
- 141.- Radunz, Alfons., Schnaid, G. H. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 92 (2-3), 437-443. (1980).
- 142.- Rastogi, R. P., Shabd, R., Upadhyay, B. K., Singh, S. B. and Pandey, P. C. *J. Membr. Sci.* 19 (1), 51-71. (1984).

- 143.- Rebeiz, C. A. *Magnon Ser. Sci.* 21, 1-25. (1968).
- 144.- Rebeiz, C. A., Bazzaz, K. B. and Belanger, F. *Chromatogr. Rev.* 4 (2). (1978).
- 145.- Rein, A. J., Saperstein, D. D., Pines, S. H. and Radlick, P. C. *Experientia*, 32 (10), 1352-1354. (1976).
- 146.- Rieman, B. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14, 70. (1980).
- 147.- Riley, J. P. and Wilson, T. R. S. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 45, 583. (1965).
- 148.- Robbins, Kelly R. *Poultry Science* 60 (1), 254-256. (1981).
- 149.- Rossman, R. and Chang, W. Y. B. *Hydrobiologia* 88, 245. (1982).
- 150.- Rouchand, J., Moonn, C., Meyer, J. A. *J. Hortic. Sci.* 60 (2), 245-249. (1985).
- 151.- Rouseff, R. L. and Ting, S. Y. *J. Chromatog.* 176, 75. (1979).
- 152.- Sadowski, R. and Wojcik, W. *Journal of Chromatography* 262, 455-459. (1983).
- 153.- Sasikumaran, S., Kandaswamy, T. K. and Vidyaasekaran, P. *Indian Phytopathol.* 32 (3), 352-359. (1979).
- 154.- Schwartz, S. J., Hildenbrand, B. E. and von Elbe, J. H. *J. Food Sci.* 46, 296. (1981).
- 155.- Schwartz, S. J. and von Elbe, J. H. *J. Agric. Food Chemistry* 20, 540. (1980).
- 156.- Schwartz, S. J., Woo, S. L. and von Elbe, J. H. *J. Agricultural Food Chemistry* 29, 533. (1981).
- 157.- Schwartz, S. J. and von Elbe, J. H. *Journal of Liquid Chromatogr.* 5 (Suppl. 1), 43-73. (1982)
- 158.- Schoch, S., Lempert, U., Wieschhoff, H. and Scheer, H. *Journal of Chromatography* 157, 357. (1978).
- 159.- Scott, M. L., Ancarelli, I. and Olson, G. *Poultry Sci.* 57, 863-872. (1968).

- 160.- Sherna, J. and Latta, E. J. Chromatogr. 154, 73. (1973).
- 161.- Sheaf, W. T. Journal of Chromatography 152, 247. (1979).
- 162.- Siefertmann, H. D. Lipids Polym. Higher Plants, (Pap. Symp), 218-230. (Pub. 1977).
- 163.- Siavers, G. and Hynnion, P. H. J. Chromatogr. 134, 359. (1977).
- 164.- Silerio V. Filiberto., Mendoza de Flores, Carmen., Avila G. Ernesto. Técnica Peouaria Mex. 31, 47 - 54. (1976).
- 165.- Singer, J. W. and von Elbe, J. H. J. Food Sci. 45, 489. (1930).
- 166.- Stewart, R. H., Anen, S., Mascie, D. R., Norris, K. H. Biochemical Systematics and Ecology. 3, 119. (1930).
- 167.- Strain, H. H. and Svec, W. A. Advan. Chromatogr. 8, 119. (1969).
- 168.- Stone, H. A., Collins, W. M. and Urban, W. E. Jr. Poultry Sci. 50, 675-681. (1971).
- 169.- Stransky, H. Z. Naturforsch. 33, 836. (1978).
- 170.- Thomas, O. P., Twining, P. V. Jr., Bossard, E. H. and Lund, P.G. Poultry Science 50, 1636. (1971).
- 171.- Thompson, J. H. and Maxwell, W. B. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 766. (1977).
- 172.- Ting, S. V., Rouseff, R. L., Dougherty, M. H. and Attaway, J. A. J. Food Sci. 44, 69. (1979).
- 173.- Turgeron, A. J. and Lester, G. Agron. Journal 68 (6), 946-948. (1976).
- 174.- Taplin, D. E., D' Mello, J. P. F. and Phillips, P. Tropical Science 23 (3), 217-226. (1932).
- 175.- Taylor, R. F. and Davies, B. H. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61 (3), 892-905.
- 176.- Vincent, K. R. and Scholz, R. G. J. Agric. Food Chem. 26, 312. (1978).

- 177.- Von Elbe, J. H., Schwartz, S. J. and Hildebrand, B. E. Journal of Food Science 46, (1981).
- 178.- Wall and Kelley. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15, 18. (1943).
- 179.- Wild, R., Dobrovolsky, H., Gesterhelt, G., Shiedt, K., Voochi, M. Dtsch. Lebensm.- Rundsch. 77 (7), 245-248. (1981).
- 180.- Wilgus, H. S., Exp. B 854 Xan., Peter Hand Foundation, Chicago 22, Illinois. (1954).
- 181.- Willis, G. M. and Baker, D. H. Poultry Sci. 59 (2), 404. (1980).
- 182.- Wilson, W. O. Poultry Science 35, 226 - 227. (1956).
- 183.- Wright, S. and Shearer, J. D. Journal of Chromatogr. 294, 281 - 295. (1984).
- 184.- Zakaria, M. Journal of Chromatography 176, 109. (1979).
- 185.- Zechmeister, L. Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A, and Arylpolyenes, Springer - Verlag, Vienna, p.p. 230. (1962).