

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

 **COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**



Casa abierta al tiempo

CBS

**IDENTIFICACION Y ESTABILIDAD DE PIGMENTOS CAROTENOIDES Y
FLAVONOIDES EXTRAIDOS DE HOJAS DE ALMENDRO (*Terminalia catappa*)
PROCEDENTE DEL ESTADO DE TABASCO.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología**

P R E S E N T A

M. en C. ELOISA LOPEZ HERNANDEZ

OCTUBRE / 2001

"El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología"

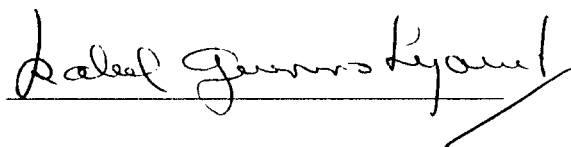
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

M. EN C. ELOISA LOPEZ HERNANDEZ

El día 13 de Noviembre de 2001

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana



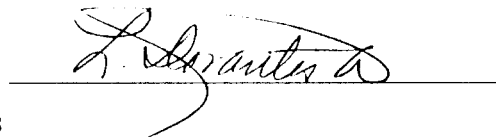
Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dra. Lidia Dorantes Alvarez
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional



Sinodal: Dr. Tirso Ríos Castillo
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México



AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por haber creído en mi, por su confianza y ayuda invaluable.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. MVZ Víctor de Jesús Pérezpriego Cobián, director, por darme la oportunidad de escalar otro peldaño en mi vida profesional.

A la Universidad Tecnológica de Tabasco. Dr. Walter Ramírez Izquierdo, rector, por brindarme sus instalaciones y laboratorios.

A la División de Tecnología de Alimentos. M en C. Antonio Valadez Villarreal, director, por su gran apoyo durante la fase experimental.

Al Sistema de Investigación del Golfo de México por apoyar el proyecto "La flora de tabasco como fuente potencial de colorantes para la industria" del cual formó parte ésta investigación.

A mis asesores y sinodales de tesis.

Al M. en C. José Luis Santos L.

A mis compañeros de la División de Tecnología de Alimentos. UTTAB.

Con todo mi amor

Para

Mi esposo Antonio

y

nuestra hija Angélica Valeria

Por su paciencia, comprensión y apoyo

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fué estudiar el potencial de un vegetal ampliamente distribuído en el estado de Tabasco con posibilidades para la extracción de pigmentos naturales identificando a éstos pigmentos y evaluando su estabilidad.

En una primera etapa se evaluaron diez vegetales existentes en la región Centro del estado, que presentaban compuestos pigmentantes los cuales fueron macuilis (*Tabebuia rosea*), croto (*Codiaeum variegatum*), amarillo ó "cashán" (*Terminalia amazonia*), sazafrán (*Curcuma longa*), almendro (*Terminalia catappa*), matalí (*Tradescantia zebrina*), maguey morado (*Tradescantia spathacea*), guayacán (*Tabebuia guayacán*), copa de oro (*Solandra grandiflora*) y crucetilla (*Randia aculeata*).

Se seleccionó al almendro *T. catappa*, el cual presentó hojas con coloraciones rojo-amarillentas a las cuales se les realizaron extracciones con los disolventes acetona, hexano, etanol, isopropanol y éter de petróleo cuantificando en los extractos el contenido de carotenoides. Hexano-acetona 60:40, resultó ser la mejor mezcla para extraer los pigmentos de hoja de almendro.

Se encontró además que al hacer extracciones de hojas con diversas proporciones de disolventes a medida que se incrementó la polaridad se extrajeron compuestos que de acuerdo a sus longitudes de onda máxima entre 360 y 372 nm pertenecen a flavonoides.

Se realizaron pruebas de saponificación en extractos conteniendo los carotenoides con la finalidad de eliminar clorofilas y lípidos indeseables utilizando en el proceso

condiciones menos severas que las reportadas por otros autores, bajando la concentración de potasa metanólica de 50% a 10%, burbujeando nitrógeno y menor tiempo de duración. Los resultados mostraron que aún con éstas condiciones se presentaron pérdidas de pigmentos de alrededor de un 50% así como la destrucción de β -criptoxantina.

Se realizó un análisis para determinar la composición química de las hojas y ver la posible asociación del pigmento con otros compuestos que pudieran interferir en la extracción posterior encontrando bajo porcentaje de proteínas de 5.21%, 3.72% de extracto etéreo y 59.70% de humedad. El contenido total de carotenoides en hojas frescas de *T. catappa* fué de 36.36 mg/100 g lo cual es una cantidad considerable comparada con otros vegetales tales como lechuga, cilantro, hojas de rábano y mango y flavonoides de 4.84 mg/100 g.

Los pigmentos extraídos fueron separados, purificados e identificados por técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

La identificación se realizó con el apoyo de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR} los cuales fueron luteína, zeaxantina, apocarotenal, β -caroteno, cantaxantina, licopeno y γ - caroteno y por parte de flavonoides, quercetina.

Los compuestos identificados en la hoja de almendro *T. catappa* fueron los carotenoides Violaxantina, violeoxantina, epóxido de luteína, luteína, zeaxantina, dos isoméros de luteína y β -criptoxantina y el flavonoide quercetina. Los componentes mayoritarios fueron luteína mas zeaxantina con 51.56% y β -criptoxantina con

32.57%. La estabilidad de los pigmentos en el extracto se evaluó con respecto a la temperatura a 4, 25, 40 y 60°C en ambiente gaseoso (aire y nitrógeno), iluminación (luz y oscuridad) y presencia de antioxidantes, teniendo como variable de respuesta la concentración de carotenoides presentes.

La iluminación fué el factor más determinante en la estabilidad del pigmento ya que las muestras se vuelven incoloras en presencia de la luz. Los pigmentos fueron estables a la temperatura, esto es importante ya que la temperatura del trópico húmedo oscila entre 30 y 45°C por lo que la adición de antioxidantes y almacenamiento en oscuridad son los factores mas importantes a tomar en cuenta para mantener la estabilidad de los pigmentos.

También se evaluó a condiciones de temperatura, ambiente gaseoso, iluminación y presencia de antioxidantes un aceite comestible de ajonjolí (*Sesamum orientale L*) al que se le añadieron pigmentos de hoja de almendro (*T. catappa*) y al comparar los datos de estabilidad del extracto puro con los del añadido al aceite de ajonjolí a las mismas condiciones y tiempo de almacenamiento, los porcentajes de retención de pigmentos fueron superiores para los del aceite conteniendo al pigmento ya fuera con ó sin adición de antioxidante, por lo que se manifestó un efecto protector del aceite hacia el pigmento al compararlo con la mayor pérdida de pigmentos del extracto puro.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el arbol del almendro *T. catappa* es un potencial para ser utilizado en la extracción de pigmentos carotenoides o compuestos flavonoides.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to study the potential, as pigment source, of a widely distributed plant in Tabasco; the extraction, pigment identification and stability were also explored. On a first stage, ten plants of Tabasco's Central region were screened for their coloring potential. These were: macuilis (*Tabebuia rosea*), croto (*Codiaeum variegatum*), amarillo or cashán (*Terminalia amazonia*), sasafrán (*Curcuma longa*), almendro (*Terminalia catappa*), matalí (*Tradescantia zebrina*), maguey morado (*Tradescantia spathacea*), guayacán (*Tabebuia guayacan*), copa de oro (*Solandra grandiflora*) and rucetilla (*Randia aculeata*).

T. catappa leaves were chosen for further studies. They produced a wide range of red-yellowish colors. Solvent extraction was carried out with this material, using acetone, hexane, ethanol, isopropanol and petroleum ether. Carotenoid concentration was determined for each extract; 60:40 hexane-acetone was the most efficient extraction system. When solvent polarity was increased, other pigments were also extracted. As their maximum absorption was at 360 and 372 nm, it was concluded that they were flavonoids.

In order to eliminate contaminant chlorophylls and lipids, the carotenoid-containing extract was saponified. The saponification process was carried out using milder conditions to those reported by other authors. Methanol-potassium hydroxide concentration was reduced from 50 to 10% while hydrogen was bubbled during shorter time than previously reported. The results showed that, even under these conditions, 50% of the pigments as well as β -cryptoxanthin were destroyed.

Leaves were chemically analyzed in order to determine if possible associations with other compounds could interfere with the extraction. Low protein concentration (5.21%) was found, as well as 3.72% ether extract and 59.7% moisture content. Total carotenoid concentration in raw *T. catappa* leaves was 36.36 mg/100 g tissue. This concentration was higher to that found in other plants such as lettuce, coriander, radish leaves and mango. Flavonoid concentration was 4.84 mg/100 g tissue.

The extracted pigments were separated, purified and identified by spectrophotometry and chromatography.

Identification was carried out using standards, kindly supplied by Hoffman Laroche™: lutein, zeaxanthin, apocarotenal, β -caroten, cantaxanthin, lycopene and γ -carotene. Quercetin was used as a standard for flavonoid identification.

The identified compounds in *T. catappa* leaves were: eight carotenoids (violaxanthin, violaxanthin, lutein epoxide, lutein, zeaxanthin, two lutein isomers and β -cryptoxanthin) and one flavonoid (quercetin). The most abundant compounds were lutein (51.56%) and zeaxanthin (32.57%). Pigment stability in the extract with respect to temperature (4, 25, 40 and 60°C), gas atmosphere (air and nitrogen), illumination (light and darkness) and antioxidant addition was evaluated. The response variable was carotenoid concentration.

Illumination was the most important factor for pigment stability. Samples became colorless when exposed to light. Pigments were heat stable, an important feature for a coloring material aimed to be used in the tropic where ambient temperature

ranges between 35 and 40°C. Therefore, antioxidant addition and storage in the dark determinant conditions for pigment stability.

The same sources of variation (temperature, gas atmosphere, illumination and antioxidant addition) were also evaluated when the extract was added to sesame oil (*Sesamum orientale* L). Comparing the effect of storage conditions on pigment stability in the purified extract and in pigment added to sesame oil, it was observed that retention percentages were higher in the presence of oil, with and without antioxidant addition. This was due to the oil protective effect.

According to the results it can be concluded that *T. catappa* leaves are a potential source of caroteoids and flavonoids.

INDICE GENERAL

1.	Introducción	1
1.1.	Antecedentes	1
1.1.1.	Colorantes naturales como ingredientes nutraceuticos	1
1.1.2.	El almendro (<i>Terminalia catappa</i>) en Tabasco	8
1.1.3.	Los carotenoides y sus propiedades	11
1.1.4.	Separación, cuantificación e identificación de carotenoides	19
1.1.5.	Usos y aplicaciones de los carotenoides	23
1.1.6.	Mecanismo del efecto antioxidante	24
1.1.7.	Actividad antioxidante de los carotenoides	30
1.1.8.	Efecto antioxidante de carotenoides <i>in vitro</i>	33
1.1.9.	Efecto antioxidante de carotenoides <i>in vivo</i>	35
1.1.10.	Los bioflavonoides y sus propiedades	36
1.2.	Obtención de pigmentos	44
1.2.1.	Métodos de extracción	44
1.2.2.	Obtención de compuestos de origen natural	46
1.3.	Separación y análisis cromatográfico	57
1.3.1.	Consideraciones analíticas generales	57
1.3.2.	Parámetros de la columna	64
1.3.3.	Instrumentación	66
2.	Justificación	69
3.	Objetivos	71
3.1	Objetivo general	71
3.2	Objetivos específicos	71
4.	Metodología	73
4.1.	Recolección y selección de material vegetal	73
4.2.	Selección de los parámetros de extracción: disolvente-tiempo de extracción	74
4.2.1.	Primera etapa de extracción	74
4.2.2.	Segunda etapa de extracción	75
4.2.3.	Saponificación	76
4.2.4.	Identificación de los grupos de compuestos a los cuales pertenecen los pigmentos extraídos	77
4.3.	Identificación de posibles compuestos asociados al pigmento	78
4.3.1.	Análisis fisicoquímico	78

4.4.	Separación, purificación e identificación de pigmentos extraídos de la hoja de <i>T. catappa</i>	78
4.4.1.	Separación cromatográfica en capa fina	78
4.4.2.	Separación cromatográfica en columna por adsorción en sistema a baja presión (columna abierta)	80
4.4.3.	Separación e identificación de compuestos por cromatografía líquida	81
4.5.	Pruebas de estabilidad en el extracto	83
4.6.	Pruebas de estabilidad del pigmento adicionando un aceite comestible	84
5.	Resultados y Discusión	86
5.1.	Recolección y selección de material vegetal	86
5.2.	Selección de los parámetros de extracción tiempo-disolventes	99
5.2.1.	Primera etapa de extracción	99
5.2.2.	Segunda etapa de extracción	106
5.2.3.	Saponificación	111
5.2.4.	Identificación de los grupos de compuestos a que pertenecen los pigmentos extraídos	115
5.3.	Identificación de compuestos asociados al pigmento	118
5.3.1	Análisis fisicoquímico	118
5.4.	Separación, purificación e identificación de los pigmentos extraídos	120
5.4.1.	Separación por cromatografía en capa fina (CCF)	120
5.4.2.	Separación por cromatografía de adsorción a baja presión (columna abierta)	123
5.4.3.	Separación e identificación de compuestos por cromatografía líquida de fase reversa	126
5.4.4.	Flavonoides en la hoja de almendro	137
5.5.	Pruebas de estabilidad en el extracto	139
5.6.	Pruebas de estabilidad del pigmento adicionado a aceite de ajonjolí	150
6.	Conclusiones	155
7.	Recomendaciones	160
8.	Bibliografía	162

INDICE DE FIGURAS

1a	Foto del árbol de almendro (<i>Terminalia catappa</i>)	9
1b	Foto del árbol de almendro (<i>Terminalia catappa</i>), hojas y fruto	9
2	Estructura de una unidad de isopreno para formar un carotenoide	13
3	Estados primarios de biosíntesis de carotenoides y posibles transformaciones	15
4	Estructura de carotenoides	16
5	Espectros de absorción UV-VIS de carotenoides	17
6	Estructura básica de los flavonoides	38
7	Estructuras de flavonoides	39
8	Flavonoides derivados de antocianidinas	41
9	Espectro de absorción UV-VIS de quercetina en acetona	42
10	Etapa de equilibrio en extracción sólido- líquido	48
11	Diagrama presión-temperatura para un compuesto puro	52
12	Triángulo de selectividad de disolventes propuesto por Znyder según el tipo y magnitud de interacción	60
13	Superficie de un empaque típico de fase reversa	66
14	Detector de arreglo de diodos	68
15	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de flor de macuilis (<i>Tabebuia rosea</i>), en acetona	87
16	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de croto (<i>Codiaeum variegatum</i>), en acetona	88
17	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de sazafrán (<i>Curcuma longa</i>), en etanol	89
18	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de matalí (<i>Tradescantia zebrina</i>), en acetona	90

19	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de maguey morado (<i>Tradescantia spathacea</i>), en etanol	92
20	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de flores de guayacán (<i>Tabebuia guayacán</i>), en acetona	94
21	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de flor de copa de oro (<i>Solandra grandiflora</i>), en etanol absoluto	95
22	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de crucetilla (<i>Randia aculeata</i>), en acetona	96
23	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de amarillo ó "cashán" (<i>Terminalia amazonia</i>), en acetona	97
24	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja amarilla de almendro (<i>Terminalia catappa</i>), en hexano	98
25	Espectro de absorción UV-VIS de extracto de las hojas de almendro (<i>Terminalia catappa</i>), donde se observan flavonoides, carotenoides y clorofila	100
26	Eficiencia de extracción de carotenoides obtenidos con los sistemas de disolventes estudiados	101
27	Absorbancia en la extracción de carotenoides con diferentes proporciones de hexano-acetona	107
28	Absorbancia en la extracción de carotenoides con diferentes proporciones de éter de petróleo-acetona	107
29	Curva de extracción-concentración de carotenoides con hexano-acetona	110
30	Curva de extracción-concentración de carotenoides con éter de petróleo-acetona	110
31	Concentración de carotenoides a partir de muestras saponificadas y no saponificadas con éter de petróleo-acetona	114
32	Concentración de carotenoides a partir de muestras saponificadas y no saponificadas con hexano- acetona	114
33	Espectros de absorción UV-VIS de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman- Laroche ^{MR}	117

34	Espectro de absorción UV-VIS de las fracciones I a VI separadas por cromatografía de baja presión	125
35	Separación cromatográfica de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche ^{MR} utilizando una columna symmetry C ₁₈ marca Waters	127
36	Cromatografía de alta resolución en fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>)	130
37	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>)	131
38	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: β-caroteno	134
39	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: zeaxantina	134
40	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: luteína	135
41	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: licopeno	135
42	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: cantaxantina	136
43	Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (<i>T. catappa</i>). Estándar interno: 8' apocarotenal	136
44	Cromatograma del estándar de quercetina	138
45	Cromatograma de los flavonoides del extracto de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>)	139
46	Efecto de la temperatura, ambiente gaseoso e iluminación en extractos de pigmentos de (<i>T. catappa</i>) con antioxidantes	141

47	Efecto de la temperatura, ambiente gaseoso e iluminación en extractos de pigmentos de (<i>T. catappa</i>) sin antioxidantes	141
48	Resumen de medias de las pruebas de estabilidad del pigmento de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>), adicionado a aceite de ajonjolí (<i>S. orientale L</i>), sin antioxidantes	142
49	Resumen de medias de las pruebas de estabilidad del pigmento de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>), adicionado a aceite de ajonjolí (<i>S. orientale L</i>), con antioxidantes	142
50	Comparativo de los porcentajes de retención de carotenoides de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>) en el extracto y en el aceite de ajonjolí (<i>S. orientale L</i>), con antioxidante	152
51	Comparativo de los porcentajes de retención de carotenoides de hoja de almendro (<i>T. catappa</i>) en el extracto y en el aceite de ajonjolí (<i>S. orientale L</i>), sin antioxidante	152

INDICE DE TABLAS

1	Ejemplos de alimentos funcionales ó nutraceuticos	5
2	Pérdida de color u oxidación de productos carotenoides inducidos por fuentes radicales	31
3	Productos de oxidación de β -caroteno cuando se expone a autoxidación, ataque de radicales u oxidación pareada	32
4	Variación en la absorción UV-VIS de los flavonoides (nm)	40
5	Tipos de relleno usados en cromatografía en fase ligada	63
6	Especies vegetales muestreadas en el estado de Tabasco que presentan pigmentos naturales	73
7	Disolventes empleados en la extracción de pigmentos de hoja de almendro (<i>Terminalia catappa</i>) durante la primera fase experimental	75
8	Sistemas de disolventes empleados para separación de pigmentos por cromatografía en capa fina	79
9	Condiciones del método de gradiente en HPLC empleado en la detección de carotenoides	82
10	Condiciones del método de gradiente en HPLC empleado en la detección de flavonoides	83
11	Características de los pigmentos extraídos a partir de especies vegetales	86
12	Longitud de onda máxima obtenida en el espectro de absorción UV-VIS de β -caroteno en diversas mezclas de disolventes	101
13	Composición proximal de la hoja de almendro (<i>Terminalia catappa</i>)	118
14	Valores de R_f de los compuestos extraídos con mezclas de éter de petróleo-acetona eluidos por cromatografía en capa fina	121
15	Separación de muestras del extracto hexano-acetona (60:40) empleando cromatografía en capa fina bidimensional	122

16	Separaciones por cromatografía en capa fina bidimensional de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche ^{MR}	123
17	Fracciones del extracto de hoja de almendro (<i>Terminalia catappa</i>) separada por cromatografía de baja presión (Columna abierta)	124
18	Tiempos de retención y longitud de onda máxima promedio de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche ^{MR} en solución hexano-acetona (60:40)	128
19	Proporciones de los diversos carotenoides identificados en hoja de almendro (<i>Terminalia catappa</i>) sin saponificar	133

INDICE DE ECUACIONES

1	Etapa de equilibrio extracción sólido-líquido (a)	49
2	Etapa de equilibrio extracción sólido-líquido (b)	49
3	Cuantificación de β -caroteno a 450 nm	108
4	Cuantificación de proteína por el método de albúmina de suero bovino a 750 nm	119

ANEXOS

- Anexo 1. Efecto de la extracción de hoja de almendro con disolventes orgánicos: Análisis de varianza.
- Anexo 2. Pruebas de extracciones de hoja de almendro con diferentes sistemas de disolventes: Comparación de medias de Duncan
- Anexo 3. Áreas de picos de estándares empleados para el análisis de carotenoides por HPLC
- Anexo 4. Curva estándar para el análisis de quercetina
- Anexo 5. Estabilidad de extractos de hoja de almendro: Análisis de varianza
- Anexo 6. Estabilidad de extractos de hoja de almendro: comparación de medias de Duncan
- Anexo 7. Estabilidad de extractos de hojas de almendro: Interacciones dobles y triples
- Anexo 8. Estabilidad de extractos de hojas de almendro, en aceite de ajonjolí: Interacciones dobles y triples.
- Anexo 9. Estabilidad de extractos de hoja de almendro en aceite de ajonjolí: Comparación de medias de Duncan
- Anexo 10. Estabilidad de extracto de hojas de almendro en aceite de ajonjolí: Análisis de varianza

1. INTRODUCCION.

1.1. Antecedentes.

1.1.1. Colorantes naturales como ingredientes nutraceuticos.

El color determina en gran medida, la elección de un producto sobre otro, ante un universo tan amplio, que ofrece distintas calidades, propiedades y formas. Está demostrado que ésta cualidad influye de manera decisiva en nuestros días y se ha convertido en una condición sin la cuál no es posible competir en un mercado tan diferenciado. Asimismo, el color es un constituyente vital de los alimentos, y probablemente una de las primeras características percibidas por los sentidos e indispensable en el consumidor de hoy en día, ya que le permite identificar y clasificar rápidamente los productos.

De manera general, los colorantes son adicionados a los alimentos por las siguientes razones (Torres, 1997):

- Devolver al producto la apariencia original cuando el color natural ha sido destruído por el procesamiento.
- Asegurar uniformidad en tonos, evitando variaciones naturales en la intensidad de los mismos.
- Intensificar colores en alimentos donde se han visto disminuidos.

- Conservar la identidad y el carácter de los alimentos.
- Como indicador visual de la calidad.

Según la definición de la F.D.A. (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés, de Estados Unidos), un aditivo colorante es cualquier materia, tinte, pigmento u otra sustancia producida por un proceso de síntesis o por otra estrategia química, extraído, aislado o derivado de otra manera, con o sin cambio de identidad intermedia o final, de un animal, vegetal, mineral o de otra fuente que al añadirlo o al aplicarlo a un alimento, droga, cosmético, o al cuerpo humano, es capaz de impartir color por sí mismo o mediante una reacción con otra sustancia (García y col., 1993; Hayward, 1992; Marmion, 1984).

En México, la definición dada por la Secretaría de Salud está comprendida dentro de la especificada por la FDA, mencionando además que una vez obtenido el colorante natural éste es sometido a pruebas de identidad y pureza (Diario Oficial, 1995).

Los colorantes sintéticos, han sido muy usados por las ventajas que éstos presentan, sobre los naturales tales como la mayor capacidad tintórea, estabilidad, y producción así como relativamente bajos costos (López y col., 1993). No obstante, actualmente hay un marcado interés mundial por regresar otra vez a los colorantes naturales ya que existe una necesidad de expansión de la variedad de ellos por ser naturales y

considerarse seguros (Giusti y Wrolstad, 1996; Gao y Mazza, 1996; Baublis y col., 1994).

Se han realizado estudios de colorantes sintéticos que han proporcionado dudas sobre su inocuidad ya que se han encontrado casos de toxicidad, transformaciones hepáticas, problemas de sensibilización, alteraciones de la conducta y aprendizaje (García y col, 1993; López y col., 1993; Valle, 1986; Derache, 1990; Lindner, 1991; Giusti y Wrolstad, 1996; Sapers y col., 1994).

Los pigmentos naturales son considerados como colorantes seguros y libres de certificación, éstos pueden ser de origen vegetal ó animal, de entre todos ellos los que destacan son: a) Pigmentos quininoideos que incluyen al carmín de cochinilla y al ácido kermésico de kermes los cuales imparten una coloración roja. (López y col., 1993); b) Pigmentos porfirínicos, que incluyen a la clorofila y que dan un color verde y los hem de tono rojo ó café. (Hayward, 1992); c) Las antocianinas y sus derivados que incluyen las betalainas y flavonoides con colores rojos y amarillos (García y col., 1993); d) Pigmentos melanoidínicos en que se encuentra el color caramelo (Fennema, 1993); e) pigmentos carotenoides, entre los que se tienen al α y β caroteno, luteína, astaxantina, violaxantina, cantaxantina, que imparten colores rojos, amarillos y naranjas, (Sapers y col., 1994); f) Otros, como riboflavina y curcuminoides (amarillo) (Rouseff, 1998); e indigotina (azul), (Hayward, 1992).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas de inocuidad, los colorantes naturales tienen la limitación de su inestabilidad bajo diferentes condiciones como son la presencia de luz, pH, presencia de metales en el medio, presencia de oxígeno y aplicación de altas temperaturas, entre otras. Por lo tanto, se requiere realizar estudios de estabilización de los colorantes naturales que permitan hacerlos más funcionales y de amplia aplicación.

Dada la urgente necesidad de colorantes naturales para alimentos, es necesario recurrir al estudio de nuevas fuentes de colorantes de éste tipo, a partir de materias primas de la región o de especies que sean fácilmente adaptables al clima, de fácil propagación y de bajo costo.

Por otra parte, algunos de los pigmentos naturales de origen vegetal se encuentran relacionados con otros compuestos, denominados alimentos funcionales o ingredientes nutraceuticos, los cuales son sustancias que proporcionan beneficios a la salud del consumidor mas allá de los que ofrecen los alimentos convencionales. Ellos incluyen a los que reducen el colesterol y el riesgo de contraer enfermedades, como las vitaminas, minerales y fitoquímicos los cuales se encuentran en productos naturales, destacando los carotenoides, bioflavonoides, polifenoles, gomas y pectinas (Helguera, 1999; Pszczda, 1988). La Tabla 1 muestra ejemplos de alimentos que son considerados como nutraceuticos.

Tabla 1. Ejemplos de alimentos funcionales ó nutraceuticos (Helguera, 1999; Yanun, 1999; Canales, 2001).

Clase/Componente	Fuente	Beneficio potencial
Carotenoides		
α -caroteno	Zanahorias	Neutraliza los radicales libres que pueden causar daño a los componentes de las células.
β -caroteno	Vegetales verdes	Neutraliza los radicales libres. Pueden reducir el riesgo de cáncer.
licopeno	Productos de tomate	Contribuyen a mantener una visión saludable.
luteína	Vegetales verdes	Contribuyen a mantener una visión saludable.
zeaxantina	Huevos, cítricos, maíz	
Fibra dietética		
Fibra insoluble	Salvado de trigo	Puede reducir el riesgo de cáncer de pecho o colon.
β -glucano	Avena	Reduce riesgo enfermedades cardiovasculares (CVD).
fibra soluble	<i>Psyllium plantago</i>	Reduce riesgo de CVD.
Acidos grasos		
Omega 3	Atún, pescados y aceites marinos	Reduce el riesgo de CVD y Mejora las funciones mentales
Acido linoleico conjugado	Queso y prod. Cárnicos	Mejora la composición del cuerpo.
Flavonoides		
Antocianinas	Frutas	Neutralizan los radicales libres, pueden reducir el riesgo de cáncer.
Catequinas	Té	
Flavonoles	Cítricos	
Fenoles		
Acido cafeico	Frutas, vegetales y cítricos	Actividades antioxidantes y reducen el riesgo de enfermedades degenerativas.
Acido ferúlico		
Sulfuros		
Tioles	Cebolla, ajo, aceitunas	Disminuye el colesterol LDL.
Probióticos		
<i>Lactobacillus</i>	Yogurt y otros lácteos	Mejora la calidad de la microflora intestinal.

Se han descrito actividades biológicas de gran interés para un número considerable de carotenoides, entre otras la acción preventiva en determinados tipos de cáncer y úlceras (Chiralt y col., 1990a; Lietz y Henry, 1997; Yen y Chen, 1995; López y col., 1993; Mínguez y Hornero, 1993; Fisher y Kocis, 1987; Wills y Rangga, 1996; Adewussi y Bradbury, 1993; Chen y Chen, 1993); como protectores de la mucosa gástrica (Mínguez y Hornero, 1993) y debido a su acción de prevenir el envejecimiento (Wills y Rangga, 1996).

Los estudios realizados indican que éstos pigmentos pueden prevenir mutagénesis, efectos genotóxicos, transformaciones malignas en bacterias y tejidos de mamíferos (Krinsky y col., 1990). El licopeno es un carotenoide encontrado en productos de tomate, que previene la oxidación del colesterol, unido a una lipoproteína de baja densidad que reduce el riesgo de desarrollar arterosclerosis y enfermedades coronarias.

Otros investigadores manifiestan que éste compuesto también reduce el riesgo de cáncer de próstata, pulmón, vejiga, cervix y piel y la susceptibilidad de daños oxidativos en ADN de linfocitos (Leffinwell, 1999). Los estudios realizados en lípidos del cuerpo humano demostraron que el consumo de al menos 40 mg de licopeno/día es suficiente para estos fines preventivos (Agarwal y Rao, 1998).

Existe una relación en la dieta entre el pigmento macular y dos carotenoides, luteína y zeaxantina, por lo que la ingestión de frutas y verduras alta en carotenoides

permiten un gran incremento en la concentración de luteína en el plasma sanguíneo, así como la de luteína-zeaxantina en el pigmento ocular cuyos beneficios son los de mejorar la visión de quienes consumen carotenoides (Steven, 1998).

Por otra parte, algunos investigadores (Lee y col., 1995; Miyake y col., 1997; Williams, 1999; Gary, 1998), han demostrado las ventajas de incluir a los bioflavonoides en la dieta ya que encuentran beneficios adicionales en la salud al igual que para los carotenoides, en los bioflavonoides se reduce el riesgo de contraer enfermedades del corazón, inhibir la efectividad del virus herpes, protegen contra úlceras en la piel, venas varicosas, hemorroides, artritis reumatoide, asma y alergias las cuales éstas últimas ocurren cuando una proteína extraña entra al torrente sanguíneo y provoca la liberación de histamina y serotonina. Entre los bioflavonoides de mayor importancia se tienen a quercetina y kaemferol, recomendando una ingesta mínima de 25 mg/día (Crozier y col., 1997).

1.1.2. El Almendro (*Terminalia catappa*) en Tabasco.

El Estado de Tabasco está localizado geográficamente dentro del llamado Trópico Húmedo lo que es un nicho natural de una flora característica tanto en especies como en diversidad de coloraciones y tonalidades. Se cuenta con tallos, flores, frutas, hojas y raíces que presentan colores amarillos, rojos, azules, verdes y tonalidades de ellos, que son resultado de la variedad de climas que se presentan, siendo éstos: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano que presenta selva alta perennifolia asociada a pastizal, en las zonas lacustres se encuentran tulares (*Typha latifolia*) y en las pantanosas popal (*Thalia geniculata*). En éste clima hay lluvias todo el año y la vegetación es de selva alta perenifolia que en algunas áreas es secundaria; clima cálido subhúmedo, con lluvias de verano, en el que predomina pastizal cultivado, en la parte occidental se desarrolla una pequeña área de sabana (INEGI, 1995; Ortiz y col., 1994; Magaña, 1995).

En la mayor parte del estado se encuentra difundido el árbol del almendro el cual en determinadas épocas del año sus hojas adquieren coloraciones rojizas ó amarillas (Figuras 1a y 1b).



Figura 1a. Foto del Árbol de Almendro (*Terminalia catappa*)



Figura 1b. Foto del Árbol de Almendro (*Terminalia catappa*), hojas y fruto

A continuación se da la descripción botánica del almendro.

Nombre Científico. *Terminalia catappa* L.

Familia. Combretaceae.

Descripción. Arbol de sombra que llega a medir mas de 10 metros de altura y en el estado de Tabasco hasta 5 metros. Sus hojas son de aproximadamente 25 cm de longitud, simples y ovaladas y alternadas. Presentan inflorescencia arriba de las hojas, las flores son pequeñas y blancas la fruta es drupa ovoide de aproximadamente 5 cm de longitud, verdosa a rojiza, con una pequeña almendra comestible (CDFA, 1999).

Son importantes varios géneros de significación forestal y por su producción de principios curtientes (taninos) y las sustancias oleaginosas de sus semillas. Merecen citarse los árboles del género *Terminalia* de las selvas altas perennifolias (Cano y Marroquín, 1994), *T. amazonia* del Sureste de México conocida también como amarillo, "cashán" o volador y la llamada *T. catappa* L., almendro tropical o almendra de Singapur, que es una planta ornamental ampliamente cultivada en zonas tropicales (Cano y Marroquín, 1994; Magaña, 1995).

Origen: Península de Malasia, ampliamente distribuída en áreas tropicales.

Usos: Sus hojas son ricas en taninos para la fabricación de tintura negra. También se utilizan con fines medicinales en dolor de ojos, reumatismo, heridas, enfermedades de la piel (Dittmar, 1998). Los componentes del almendro (*T. catappa*), se mencionan a continuación.

Constituyentes de *T. catappa*:

Fruta.- β -caroteno, corilagina, cianidina 3-glucósido, ácido elágico, ácido gálico, pentosanos y taninos (Duke's, 1998)

Semillas: β -caroteno, ácidos araquídico, ascórbico, linoleico, linolénico, mirístico, oleico, palmítico, palmitoleico y esteárico; calcio, hierro, niacina, fósforo, potasio, riboflavina, sodio y tiamina (Duke's, 1998; Dittmar, 1999).

Hojas: Kamferol y quercetina (Duke's, 1998). Recientemente se han encontrado punicalagina y punicalina (Tsung y Liu, 1999).

Corteza: catequina, epicatequina, leucocianidina y taninos.

Este árbol es hospedero para *Anastrepha spp*, *Ceratis capitata*, *Dacus spp*. Las investigaciones recientes han demostrado que *T. catappa* posee compuestos preventivos de cáncer y alto potencial anticancerígeno.

1.1.3. Los carotenoides y sus propiedades.

Los carotenoides junto con las clorofilas están presentes en la mayoría de los tejidos fotosintéticos, imparten el color a frutas y verduras como tomates, zanahorias, piñas, cítricos, a flores como el zempasúchil (*Tagetes erecta L.*) y girasol (*Helianthus annuus*), semillas como achiote (*Bixa orellana L.*) (López y col., 1993; Wills y Rangga, 1996; Adewussi y Bradbury, 1993; Fisher y Kocis, 1987). Algunas aves como los flamencos y canarios; peces como los salmones, así como microalgas clorofitas (*Haematococcus pluviales*), hongos (*Phaffia rhodozyma*), y bacterias (*Corynebacterium poinsettiae*) producen un tipo de carotenoide, en el caso de los

microorganismos este pigmento se produce cuando se encuentran sujetos a condiciones extremas ya que la función de éste compuesto es reforzar las membranas celulares.

Otras fuentes naturales de carotenoides son los desperdicios de crustáceos como el camarón (Mandeville y col., 1992) y el langostino (Chen y Meyers, 1984) en los que se aprovecha el caparazón, carne adherida a éste y la cabeza los cuáles son ricos en astaxantina, que están siendo probados para colorear trucha arcoiris; con el mismo fin se utiliza *H. pluviales* (Sommer y col., 1992).

Los carotenoides en alimentos son compuestos generalmente tetraterpenoides (C₄₀) formados de 8 unidades de isopreno y la secuencia está invertida en el centro. Es un esqueleto básico lineal y simétrico que puede estar ciclado en ambos extremos, tener grupos metilos separados por 6 átomos de carbono al centro y 5 en otras partes (Figura 2). La ciclización y otras modificaciones tales como hidrogenación, deshidrogenación, migración de dobles enlaces, cadenas cortas o largas, rearreglos, isomerización, introducción de funciones oxígeno o combinación de éstos procesos da como resultado una gran variedad de estructuras. Una característica distintiva es su sistema de dobles enlaces conjugados los cuales sirven como cromóforos que absorben luz para dar los colores amarillo, naranja ó rojo (Amaya-Rodríguez, 1999). Los carotenoides hidrocarbonados están formados únicamente por carbono e hidrógeno los cuales son generalmente llamados carotenos y a los que contienen oxígeno se les llama xantofilas (Braverman y col., 1980)

En la naturaleza existen en la forma isomérica más estable llamada trans, sin embargo los isómeros cis pueden encontrarse.

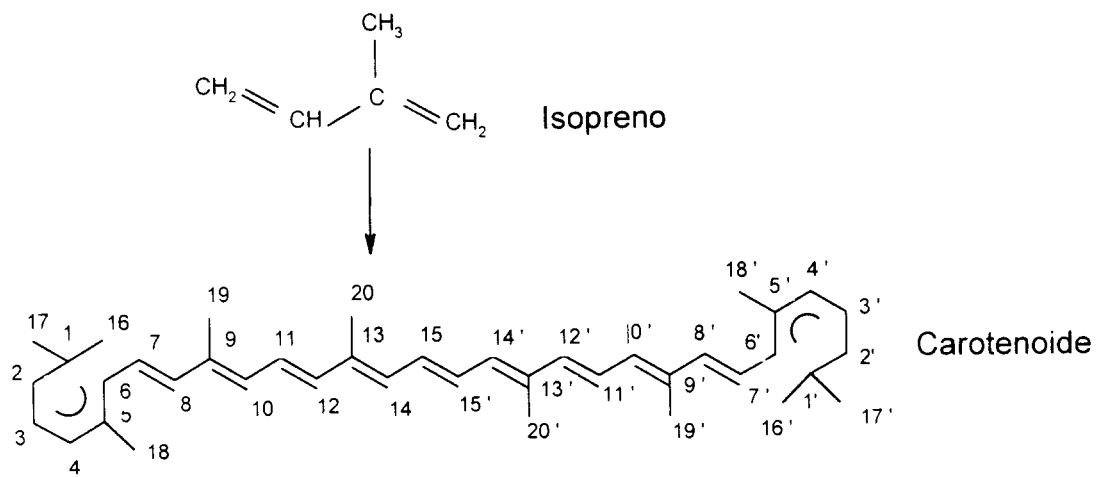


Figura 2. Estructura de una unidad de isopreno para formar un carotenoide.

En los estados iniciales de biosíntesis de carotenoides la primera unidad de isopreno (C_5) sufre adiciones sucesivas de unidades de C_5 dando en secuencia compuestos de C_{10} , C_{15} , y C_{20} , la dimerización posterior produce el primer carotenoide C_{40} , las sucesivas transformaciones se esquematizan en la Figura 3.

(Rodríguez-Amaya, 1999).

Los carotenoides son solubles en los disolventes apolares y en las grasas e insolubles en agua. Por ésta razón se les denomina "lipocromos". Se extraen con éter de petróleo, éter etílico o bencol; para la extracción de las xantofílas son apropiados también el alcohol y la acetona. La crocina y crocetina son tal vez los únicos carotenoides solubles en agua los cuáles se encuentran en el azafrán (*Crocus sativus*), (Raina y col., 1996) y en la fruta de gardenia (*Gardenia jasminoides*) (Kamikura y Nakasato, 1985), en la Figura 4 se presentan estructuras de carotenoides comunes.

El espectro de absorción UV-VIS de los carotenoides tiene tres máximos cuyas longitudes de onda dependen del número de dobles enlaces conjugados, los valores oscilan entre 410 - 510 nm (Figura 5) (Kamikura y Nakasato, 1985; Mínguez y Hornero, 1993; Rouseff, 1988). Como se mencionó la gran mayoría de los carotenoides en la naturaleza son compuestos trans, si se crea una configuración cis se desplaza el máximo de absorción y aparece una banda secundaria de menor longitud de onda (Belitz y Grosh, 1988).

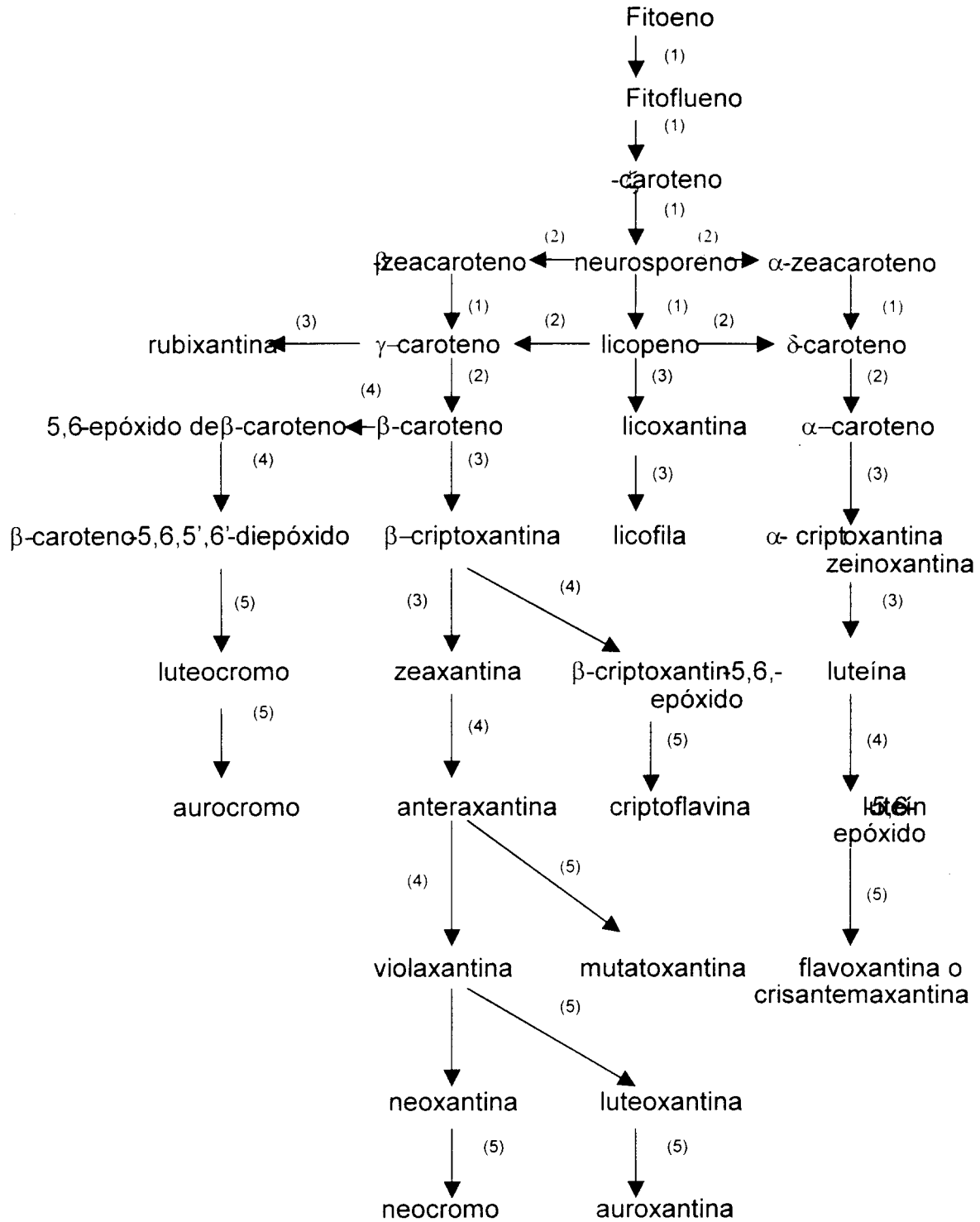


Figura 3. Estados primarios de biosíntesis de carotenoides y posibles transformaciones (Amaya-Rodríguez, 1999). 1) insaturación; 2) ciclicización; 3) hidroxilación; 4) epoxidación; y 5) rearreglo furanóxido-epóxido.

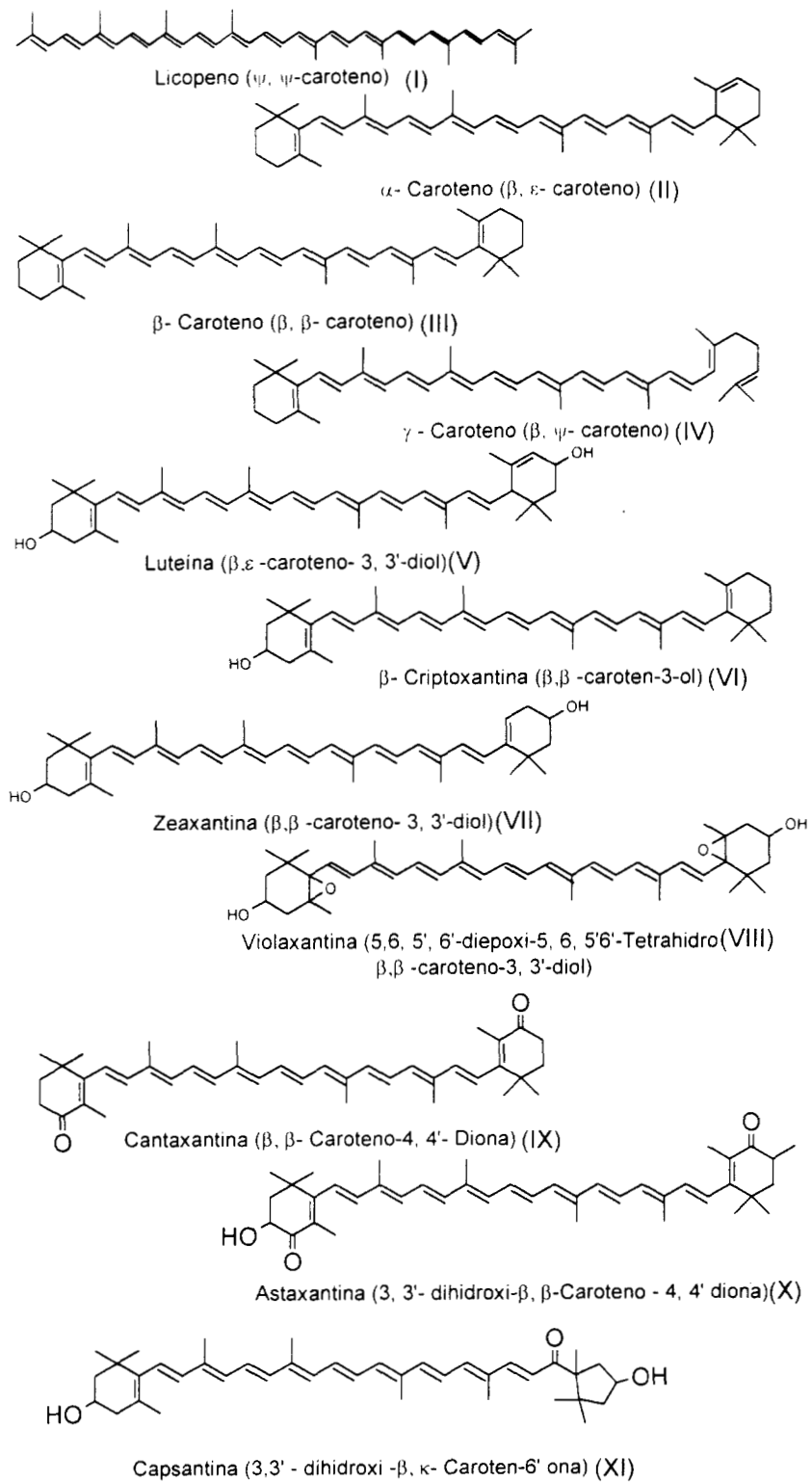


Figura 4. Estructura de carotenoides.

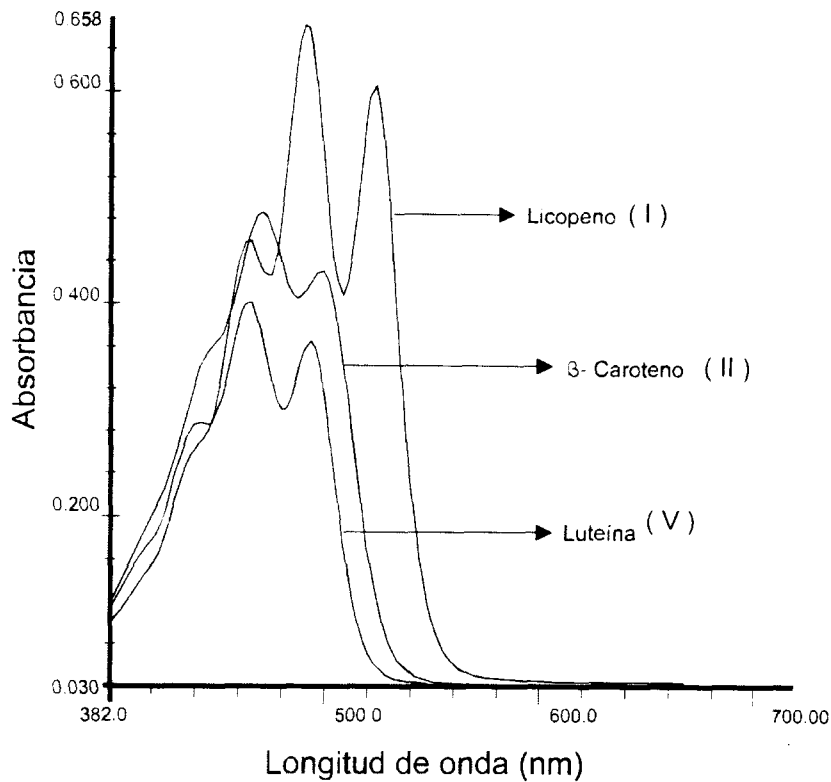


Figura 5. Espectros de absorción UV-VIS de carotenoides. Cortesía de Hoffman-Laroche- Bessel Suiza.

Entre todos los carotenoides, con excepción de la cantaxantina, son los únicos que tienen un carácter nutrimental como provitamina A, un compuesto que los animales y los humanos convierten en Vitamina A por un sistema enzimático oxidativo en la mucosa intestinal (Hayward, 1992).

Los dobles enlaces conjugados los hacen susceptibles a la luz, oxígeno, degradaciones ácidas (Chen y Chen, 1993) y calor (Howard y col., 1996; Man, 1990).

En ausencia de éstas condiciones, son estables en los alimentos a temperaturas elevadas. La degradación de carotenoides se acelera con los radicales libres que se forman de la oxidación lipídica generados por temperaturas altas, metales, luz y enzimas lo cual se reduce con la adición de antioxidantes y secuestrantes (ácido ascórbico, EDTA y SO₂ entre otros). Especial interés tiene el fenómeno de cooxidación por determinadas lipoxigenasas (Belitz y Grosh, 1988).

Crouzet y Kanasawad (1992) han realizado estudios sobre los compuestos que se forman a partir de licopeno y β-caroteno cuando éstos fueron sometidos a la acción de la temperatura y el oxígeno, reportando como principales componentes de degradación a los volátiles: dihidroactinidiolida (DHA), 5,6 epoxi-β-ionona, β-ionona, 2,6,6 trimetil ciclohexanona, 2-metil-2 hepten-6 ona, neral y geranial y no volátiles a 5-6 epoxi-β-caroteno, aurocromo, mutacromo.

La intensidad de la oxidación depende del hecho de que el pigmento se encuentra *in situ* o *in vitro* y de las condiciones ambientales. En los tejidos vivos intactos la estabilidad de los pigmentos probablemente es función de la permeabilidad celular y de la presencia de componentes protectores aunque existen en muchos tejidos sistemas enzimáticos que degradan rápidamente a los carotenoides (Fennema, 1993). En los alimentos procesados, el mecanismo de oxidación es complejo y depende de muchos factores. Los pigmentos se pueden autooxidar por reacción de oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, y a la presencia de pro y

antioxidantes. Se cree que las reacciones son debidas a la formación de radicales libres en tres etapas distintas. Los carotenoides sufren la oxidación acoplada en presencia de lípidos a velocidades que dependen del sistema. Generalmente son más estables con alto grado de insaturación, posiblemente porque el sistema lipídico por si mismo acepta los radicales libres mas fácilmente que el caroteno. Al contrario los carotenos son menos estables en sistemas lipídicos con bajo grado de insaturación (Fennema, 1993). Por su parte las xantofilas son muy susceptibles a la degradación oxidativa por un proceso de oxidación del ácido linoleico catalizado por una lipoxigenasa (Biacs y col., 1992).

1.1.4. Separación, cuantificación e identificación de carotenoides.

Se han desarrollado varios métodos para determinar carotenos y xantofilas en plantas secas y mezclas alimentarias; la incorporación de nitrógeno y antioxidantes tales como BHT (2,6-di-terbutilhidroxitolueno) durante la extracción y saponificación incrementa el contenido extraído de carotenos y xantofilas del 2-4% y del 19-30% respectivamente (Chen y Yang, 1992).

La cuantificación involucra extracción y cromatografía con disolventes orgánicos. Se ha reconocido que existe una cantidad considerable de pérdidas de pigmentos durante el muestreo, extracción y saponificación y los métodos de cuantificación definitivos no han sido descritos satisfactoriamente, ya que se sabe que la respuesta

de los carotenoides puede ser afectada durante la cromatografía por la reacción de los carotenoides con metales particularmente el acero inoxidable y durante la inyección de disolventes y la fase móvil (Scott, 1993).

Algunos investigadores coinciden en que el método más adecuado para separar y cuantificar pigmentos carotenoides es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sin embargo algunos otros continúan utilizando métodos tradicionales como la cromatografía en capa fina (Chiralt y col., 1990a) y cromatografía en columna abierta (Adewusi y Bradbury, 1993). Estos últimos autores hicieron una comparación de los métodos de cromatografía en columna abierta y HPLC y comentan que una gran ventaja que tiene la separación en columna abierta es el uso de equipo simple y de bajo costo. En contraparte el HPLC es mas caro, requiere cuidadoso mantenimiento, alta pureza y disolventes caros (Adewusi y Bradbury, 1993). Los progresos en los últimos años en el análisis y separación de los pigmentos carotenoides se debe principalmente a la introducción de nuevos métodos tales como NARP-LC (Fase reversa no acuosa) y SFC (Flúidos supercríticos) así como la detección en línea por multilongitud de onda en HPLC con detector de arreglo de díodos.

Reacciones de grupos funcionales para la identificación de carotenoides.

Las xantofilas ofrecen reacciones químicas que sirven como pruebas simples para identificar los carotenoides, muchas de las reacciones químicas empleadas al final de los años 60's y principios de los 70's, han sido ahora suplantadas por espectrometría

de masas y resonancia magnética nuclear. Sin embargo, algunas reacciones aún son útiles y se realizan rápidamente con sólo una pequeña cantidad de la muestra y realizar un rápido monitoreo por espectrofotometría ultravioleta o visible, cromatografía en capa fina ó HPLC (Rodríguez- Amaya, 1999; Yen y Chen, 1995).

Los grupos hidroxilo primarios y secundarios, son acetilados por anhídrido acético en piridina. Los hidroxilos alílicos son metilados con metanol ácido en ambas reacciones una respuesta positiva se muestra por un incremento en el valor de R_f en cromatografía en capa fina y en el tiempo de retención en HPLC fase inversa, donde la cantidad del incremento depende del número de sustituyentes hidróxi (Rodríguez-Amaya. 1999), a continuación se mencionan algunas reacciones químicas que aún son usadas por investigadores para la identificación de compuestos carotenoides.

- Esterificación.

Los grupos hidroxilo primarios y secundarios son fácilmente acetilados a temperatura ambiente por anhídrido acético en presencia de piridina seca, mientras que los grupos hidroxilo terciarios no reaccionen bajo estas condiciones. Cuando se realiza la acetilación el número de acetatos intermediarios formados dan información acerca del número de grupos hidroxilo presentes. Así mientras un monool puede dar solo un acetato, un diol puede formar un acetato intermediario si la molécula es simétrica, y dos si no lo es, en adición al diacetato (Liaen-Jensen, 1971).

- Reducción.

Los productos de la reducción se distinguen fácilmente a partir de un compuesto base, por su incremento en la polaridad y el desplazamiento hipsocrómico.

Para la reducción de grupos carbonilo se usan hidruros metálicos ya sea de litio ó aluminio en éter ó en tetrahidrofurano, o borohidruro de sodio (Fisher y Kocis, 1987).

Los grupos epoxi en las posiciones 5,6 o 5',6' son fácilmente detectados por su fácil conversión a los derivados furanoides en la presencia de un catalizador ácido, reflejado por un desplazamiento hipsocrómico de 20-25 ó 50 nm, respectivamente.

Los cetocarotenoides, tales como echinenona, cantaxantina y apocarotenales sufren reducción con LiAlH_4 o NaBH_4 y manifiestan su presencia por la aparición en el espectro de tres máximos de los hidroxicarotenoides resultantes (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993).

- Rearreglo epóxido-furanoide.

Los 5,6-epóxidos en general y los carotenoides hidrofuranoides, producen un color azul estable al reaccionar con ácido clorhídrico acuoso al 20% y éter, algunos carotenales y polioles también dan colores azules. Varias modificaciones a la prueba de color incluyen las espectrofotométricas basadas en el tratamiento con cloruro mercúrico y las de rearrreglos del epóxido-furanoide (Liaen-Jensen, 1971; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993).

Los epóxidos 5,6 se rearreglan fácilmente al tratarse con ácidos diluidos por la expansión de anillos a un sistema hidrofuranoide, y pequeñas cantidades de los hidrocarburos base siendo subproductos en estos arreglos ácidos.

La reacción recuentemente se realiza en cloroformo conteniendo ácido clorhídrico pero ácidos orgánicos también pueden ser usados, esta es una reacción muy rápida que causa un desplazamiento hipsocrómico marcado del espectro de absorción de luz visible. Los óxidos furanoides no se afectan por el tratamiento con ácidos diluidos bajo condiciones controladas (Wills y Rangga, 1996, Adewusi y Bradbury, 1993, Yen y Chen, 1995).

1.1.5. Usos y aplicaciones de los carotenoides.

Los carotenoides se utilizan en una gran variedad de productos alimenticios a base de agua (jugos, refrescos, sopas, gelatinas, postres, pastas y productos de repostería, de panadería, productos cárnicos, de huevo y sustitutos cárnicos) y a base de triglicéridos (margarina, aceites, mantecas vegetales, mantequillas, quesos, productos lácteos y yema de huevo) (Hayward, 1992), así como para colorear tejidos de organismos acuáticos tales como salmónidos (Sommer, 1992), y en productos farmacéuticos y cosméticos tales como suspensiones, emulsiones, lociones, labiales y bases de polvo.

Entre los carotenoides de uso comercial en la actualidad están principalmente α y β caroteno (II y III), licopeno (I), luteína (V), zeaxantina (VII), astaxantina (X), cantaxantina (IX) y capsantina (XI).

Yen y Chen (1995) reportaron el efecto de xantofilas de cáscara de naranja añadidas a aceite de soya para probar la acción antioxidante de éstos, en almacenamiento y presencia de luz. Encontraron como pigmentos mayoritarios a la violeoxantina, misma que se añadió al aceite de soya, así como el extracto completo conteniendo violeoxantina, violaxantina, luteína, epoxiluteína, y β -criptoxantina. Asimismo, se añadieron compuestos comerciales de β -caroteno, α -caroteno y luteína encontrando que todos los pigmentos poseían capacidad antioxidante, que se

incrementó con la concentración dando menor contenido de peróxido y ácido tiobarbitúrico (TBA).

Sapers (1994) coloreó cerezas con cantaxantina y apo-carotenal y las comparó con respecto al color impartido por rojo No. 3 y carmín, encontrando que los carotenoides no produjeron pérdida de color y permanecieron estables durante el almacenamiento, siendo más estable el apo-carotenal, ya que la cantaxantina es menos estable en presencia de iones metálicos. La estabilidad podría incrementarse adicionando EDTA al jarabe.

Por otra parte Gloria y col., (1995) realizaron pruebas de estabilidad de bixina almacenada bajo aire/oscuridad, nitrógeno/luz, nitrógeno/oscuridad y aire/luz, a diferentes actividades de agua, encontrando que la estabilidad del color fué más alta con una actividad de agua intermedia, 0.75, en aire/oscuridad y nitrógeno/luz. Sin embargo, bajo en nitrógeno/oscuridad y aire/luz, la estabilidad fué más alta a actividad de agua mayor.

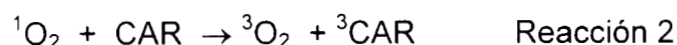
1.1.6. Mecanismo del efecto antioxidante.

Se han revisado los mecanismos por los cuales los carotenoides pueden actuar como agentes protectores y éstos pueden resumirse por la capacidad de las moléculas para actuar ya sea como agentes fotoprotectores contra los efectos de la luz, oxígeno y pigmentos fotosensibilizantes ó como compuestos reactivos contra

especies químicas generadas dentro de las células que son capaces de inducir daño oxidativo (Woodall y col., 1997).

Fotoprotección.

La base para la protección de carotenoides (CAR) contra reacciones de fotosensibilidad es la capacidad de éstos pigmentos para suprimir por un proceso de transferencia de energía ya sea los tripletes sensibilizadores (3S) (reacción 1) ó el 1O_2 (reacción 2), generado vía transferencia de energía desde el triplete de (3S) al oxígeno en su estado basal (3O_2).



Estas reacciones limitan los efectos del daño potencial que el 3S es capaz de inducir ya sea el proceso tipo I que inicia con la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno a partir de un sustrato a 3S , ó un tipo II que genera el altamente reactivo 1O_2 (Palozza y Krinsky, 1992). 1O_2 puede ser producido no solo por la fotoexcitación, sino por los procesos no fotoquímicos, tales como la reacción de ozono con varias moléculas biológicas. La generación y posibles consecuencias patológicas del 1O_2 en sistemas biológicos, han sido descritos y se ha aclarado que el 1O_2 ha sido implicado claramente en la inactivación de proteínas, en la peroxidación de lípidos biológicos y en el daño del ADN (Palozza y Krinsky, 1992).

La capacidad de los carotenoides para suprimir al $^1\text{O}_2$, está relacionada con el número de dobles enlaces conjugados, con la protección máxima mostrada por los pigmentos que tienen 9 ó más dobles enlaces conjugados, y a los grupos funcionales presentes en los pigmentos.

En las reacciones arriba indicadas, los tripletes de los carotenoides que se forman pueden fácilmente perder su energía al medio ambiente y regresar a su forma original (reacción 3).

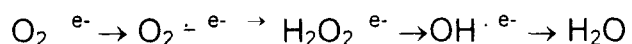


Reacción 3

Estas características hacen de los carotenoides agentes protectores muy potentes contra reacciones de fotosensitividad (Woodall y col. 1997).

Reacción con radicales oxígeno.

En las células se generan varias formas de oxígeno reactivo como un resultado de varios procesos metabólicos o siguiendo a la exposición de xenobióticos. Los productos superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (HO^\cdot) se muestran en la reacción 4.



Reacción 4

Todas éstas especies químicas han mostrado que alteran la estructura del ADN, producen lípidos peroxidados, alteran la actividad enzimática, despolimerizan polisacáridos y, en consecuencia, matan a las células (Simic, 1992).

Terao y col., (1992) han indicado que los carotenoides son capaces de limitar el daño oxidativo inducido por los sistemas que generan el radical oxi. Esta protección involucra tanto a moléculas nucleares como lipídicas. El β -caroteno es capaz de reducir la extensión del daño celular inducido por la xantinoxidasa/hipoxantina o por leucocitos polimorfonucleares activados, así como inhibir la peroxidación lipídica inducida ya sea por fuentes enzimáticas de radicales oxi, tales como el sistema xantinoxidasa y NADPH/citocromo P-450 reductasa o por fuentes no enzimáticas como las sales de metales de transición (Palozza y Krinsky, 1992).

Existe evidencia experimental (Palozza y Krinsky, 1992), que indica la eficiencia de los carotenoides para inhibir la peroxidación lipídica inducida por el Paraquat™ y la Adriamycina™, ambos agentes conocidos como implicados en la producción de radicales oxi.

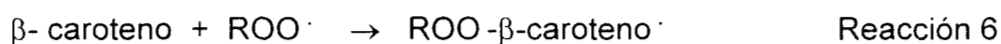
Reacciones con radicales peroxilo.

Es bien conocido que los radicales peroxilo, debido a la selectividad de sus reacciones y su capacidad para difundirse en sistemas biológicos, son potencialmente más dañinos que muchos otros tipos de radicales. Se ha sugerido que éstas especies pueden estar implicadas en la acción tóxica de muchos agentes químicos y ambientales y pueden estar conectados con una gran variedad de eventos patológicos, tales como enfermedades del corazón, cáncer y el proceso de envejecimiento (Terao y col., 1992).

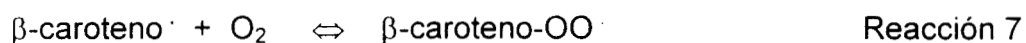
Hay una evidencia muy amplia de que los carotenoides son muy efectivos como supresores de radicales peroxilo, pero el mecanismo de su acción antioxidante, todavía no está bien definida. Una hipótesis se basa en la reacción de β -caroteno con un radical peróxido que formaría una especie de radical carotenoide (Burton, 1989).



Se ha propuesto que el β -caroteno podría reaccionar directamente con un radical peroxilo para formar un radical centrado en el carbono y estabilizado por resonancia.



La combinación de los radicales carotenoides con el oxígeno podrían llevar a la formación de radicales peroxil-carotenoide, ésta reacción sería dependiente de la presión de O₂ en el sistema. Si la presión de O₂ es suficientemente baja, la reacción de equilibrio se desplaza a la izquierda, reduciendo la cantidad de la cadena que acarrea el radical peroxilo.



En suma, el complejo β -caroteno-peroxilo reaccionaría con otro radical peroxilo, llevando a la terminación de la reacción, de acuerdo a la siguiente reacción:



Por otro lado, si la presión de O₂ es alta, el equilibrio de la reacción se desplaza a la derecha y el β -caroteno, debido a la autooxidación, forma un radical peroxilo capaz de actuar como un prooxidante.

1.1.7. Actividad antioxidante de los carotenoides.

Pérdida de color de los carotenoides.

Tanto la oxidación espontánea como la oxidación iniciada por radicales de los carotenoides han sido observadas sobre todo en relación a la pérdida de color (blanqueo) en la región visible del espectro. Este blanqueo, así como el análisis de los productos de oxidación de los carotenoides, han sido estudiadas en un intento por evaluar su capacidad antioxidante de estos compuestos cuando reaccionan directamente con radicales, y establecer la cinética de las interacciones radical-carotenoides (Handelman y col. 1991). Algunos de los compuestos o técnicas usadas para estudiar el blanqueo o la formación de los productos de oxidación inducidas por fuentes enzimáticas o no enzimáticas de radicales, se presentan resumidos en la Tabla 2 (Kanner y Kinsella, 1983; Handelman y col., 1991).

Productos de autooxidación y oxidaciones inducidas.

Se han investigado los productos obtenidos cuando el β -caroteno reacciona con fuentes de radicales (Tabla 3). El renovado interés en la naturaleza de éstos productos es indicativo de un intento por entender como los carotenoides interactúan y por lo tanto eliminan especies radicales (Palozza y Krinsky, 1992).

Tabla 2. Pérdida de color u oxidación de productos carotenoides

Fuente de Radicales	Especies de Radicales	Decoloración	Productos de Oxidación
<u>No enzimática</u>			
AIBN	Radicales peroxilo	+	
AMVN	Radicales peroxilo		+
NaOCl	Radicales oxígeno		+
t-BOOH	t-BOO [·]	+	
TPPO	Oxígeno cubierto		+
Radiólisis de CCl ₄	CCl ₃ O [·]	+	
Fotólisis de t-BOOH ó hidroperóxidos de ácidos grasos	Radicales alcoxilos	+	
<u>Enzimática</u>			
Lactoperoxidasa	No demostrada	+	
Mieloperoxidasa	No demostrada	+	

AIBN (Azo-bis isobutil nitrilo), AMVN (2,2 Azobis 2,4 dimetilvaleronitrilo), t-BOOH (Terbutil hidroperóxido), TPPO (Trifenilfosfito ozono). (+) Se produce decoloración ó productos de oxidación.

227511

Tabla 3. Productos de oxidación de β -Caroteno cuando se expone a autooxidación, ataque de radicales u oxidación pareada. (Palozza y Krinsky, 1992).

Producto	Autooxidación	Ataque Radicales	Oxidación pareada
Hidrocarburos			
Cis- β -caroteno	+	+	+
Epoxicarotenoides			
5,6 epoxi- β -caroteno	+	+	+
5,8 epoxi- β -caroteno	+	+	
5,6-5',6'-diepoxi- β -caroteno	+	+	+
5,6-5',8'-diepoxi- β -caroteno	+	+	
5,8-5',8'-diepoxi- β -caroteno	+	+	+/-
15,15'-epoxi- β -caroteno	+		
Criptoflavina			+
Carbonilos			
Semi- β -carotenona	+	+	
β -carotenona	+	+	
β -apo-13 carotenona	+	+	
β -apo-10'-carotenal	+		
β -apo-12'-carotenal			+/-
β -apo-14' -carotenal	+		
β -apo-15-carotenal (Retinal)	+	+	
Retro-dehidro- β -carotenona			+

(+) Se presenta (n) la (s) reacción (es) indicada (s)

1.1.8. Efecto antioxidante de carotenoides *in vitro*.

Inhibición de la peroxidación de lípidos.

La posibilidad de usar compuestos azo solubles en lípidos para generar radicales peroxil después de la descomposición térmica ha conducido a estudios de la efectividad de los carotenoides como inhibidores de éstas especies reactivas. El uso de soluciones homogéneas para estudiar la protección carotenoide de los sustratos lipídicos tiene la ventaja de simplificar el ensayo, debido a que tanto los carotenoides como los lípidos son disueltos en disolventes orgánicos (Woodall y col., 1997).

La evidencia experimental obtenida en soluciones orgánicas, muestra que la actividad antioxidante de éstos pigmentos está relacionada con la concentración de O_2 en las estructuras químicas de los carotenoides y la presencia concomitante de otros antioxidantes (Fennema, 1993).

Burton (1989) realizó estudios acerca de la actividad antioxidante del β -caroteno en soluciones homogéneas, en presencia de O_2 en el cuál el azo-bis-isobutil nitrilo (AIBN), induce la oxidación del linoleato de metilo. A baja presión de O_2 el β -caroteno es efectivo como antioxidante, pero a altas presiones de O_2 la actividad antioxidante inicial es seguida por una acción prooxidante del β -caroteno. Los datos apoyan la teoría de que el β -caroteno podría ser más efectivo como un antioxidante

que rompe la cadena en un medio ambiente a bajas presiones de O₂, que el α -tocoferol y bilirrubina.

Palozza y Krinsky (1991) estudiaron la reactividad de una mezcla de lípidos aislados a partir de membranas microsomales de hígados de ratas, donde comprobaron que tanto el α -tocoferol y el β -caroteno fueron buenos bloqueadores de la prooxidación de lípidos, no obstante que α -tocoferol fue mas efectivo al aumentar la presión.

Debido a que las presiones de O₂ encontrados en los tejidos de mamíferos son bajos, estas observaciones parecen sugerir un papel importante del β -caroteno como un antioxidante en tales ambientes y la posibilidad de papeles complementarios entre antioxidantes *in vivo* (Palozza y Krinsky, 1991).

La estructura de los carotenoides ha sido comparada con la actividad antioxidante de β -caroteno, cantaxantina, astaxantina y zeaxantina, con el fin de evaluar su capacidad de inhibir la formación de hidroperóxidos de linoleato de metilo en un sistema iniciado por radicales. La actividad antioxidante de la cantaxantina y la astaxantina, fueron mejores y mucho mas fuertes que la del β -caroteno o la zeaxantina, sugiriendose la presencia de un grupo ceto-conjugado que incrementa la eficiencia de la capacidad de atrapar radicales peroxilo de los carotenoides (Terao, 1989).

Miki (1991) observó la efectividad de los grupos ceto-conjugados en β -caroteno, luteína, zeaxantina, astaxantina, tunaxantina y canthaxantina, en comparación con el α -tocoferol, usando un complejo heme-proteína- Fe^{2+} como un generador de radicales y midiendo la producción de ácido tiobarbitúrico.

Además la presencia de δ -tocoferol incrementa el efecto protector del β -caroteno sobre la fotooxidación iniciada por el $^1\text{O}_2$ de linoleato de metilo. (Palozza y Krinsky, 1991).

El uso de liposomas en el estudio de la inhibición de la peroxidación de lípidos por carotenoides permite la manipulación de la composición de los lípidos, pH y temperatura y evita la introducción de los carotenoides liposolubles dentro de las membrana (Palozza y Krinsky, 1991).

1.1.9. Efecto antioxidante de carotenoides *in vivo*.-

Inhibición de la peroxidación de lípidos.

Se han incrementado las evidencias de que los carotenoides funcionan como antioxidantes *in vivo* (Zamora y col., 1991), para lo cual se han hecho estudios en modelos animales a los cuales se administran los pigmentos carotenoides ya sea inyectados u oralmente, y a éstos se les induce la peroxidación de lípidos. No

obstante que no se reporta información en los niveles de carotenoides en plasma ó tejidos, sí hay una disminución de productos de peroxidación de lípidos. Es posible que existan interacciones con otros compuestos y que estén involucrados en ésta protección ya que la adición de cantaxantina en la dieta de pollos deficientes en vitamina E y selenio aumenta la resistencia a peroxidasa de lípidos por incrementos en niveles de α -tocoferol en membranas y proveen actividad antioxidante (Zamora y col., 1991; Mayne y Parker, 1989). Se ha confirmado que el β -caroteno puede modular el incremento de superóxido dismutasa inducida por radicales peróxilo producidas por dietas altas en grasas (Blakely y col., 1988). También se han sugerido una clara acción sinérgica entre β -caroteno y otros antioxidantes en la protección de diferentes órganos de ratas (Leibovits y col., 1990).

1.1.10. Los bioflavonoides y sus propiedades.

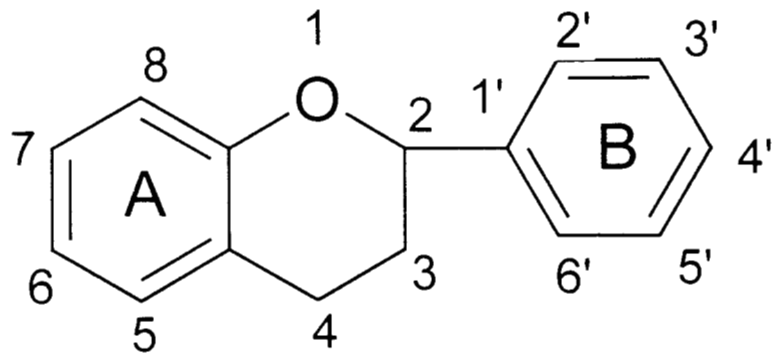
Los bioflavonoides son una familia de alrededor de 4000 metabolitos secundarios de las plantas que comprenden a antocianinas, flavonoles, flavonas, catequinas y flavononas (Hertog y col., 1992a). Sus estructuras derivan del núcleo aromático flavano ó 2-benzopirano; son compuestos de la serie $C_6 - C_3 - C_6$ por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C_6 que son anillos de benceno unidos por una cadena alifática de tres carbonos (Figura 6), (Fennema, 1993).

Se encuentran en las plantas por lo que muchas frutas y verduras los contienen tales como la manzana, brócoli, chayote, uvas, cerezas y frambuesas, frutos cítricos,

cebolla y té. También se han extraído de árboles como el roble y el eucalipto (Gary, 1998).

En la naturaleza algunos flavonoides se encuentran en forma de glucósidos, de los que el más simple es la flavona, la unión del azúcar al bioflavonoide, que proporciona a éstos compuestos la propiedad de ser solubles en agua, por lo que se localizan principalmente en las vacuolas. Los bioflavonoides también pueden tener los grupos hidroxilos protegidos por metilación haciéndolos liposolubles, ubicándose en el protoplasma (Valencia, 1995). Estos compuestos se dividen en varias clases de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano. Las dos clases más importantes son los flavonoles ó 3-hidroxi flavonas y las antocianidinas. Si se considera la variación del anillo más reducido al más oxidado, se tienen los flavonoides que se indican en la Figura 7.

Algunos Investigadores han reportado efectos bioquímicos y farmacológicos incluyendo antiinflamatorios, antialérgicos y antioxidantes, éstos compuestos al ser incluidos en la dieta ofrecen protección efectiva al daño peroxidativo en sistemas vivos por lo que juegan un papel importante en la prevención de carcinogénesis, arterosclerosis y actúan previniendo el envejecimiento (Miyake y col., 1997; Gordon y An, 1995; Crozier y col., 1997)



Flavano

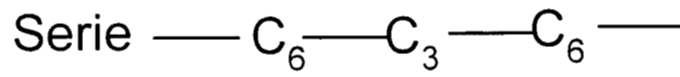
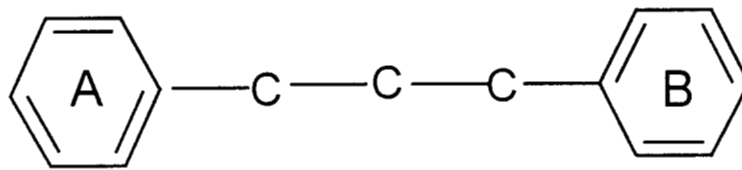
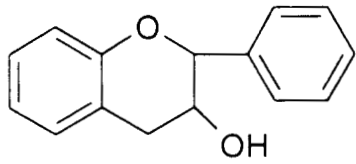
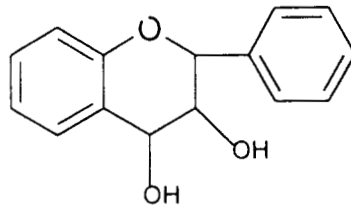


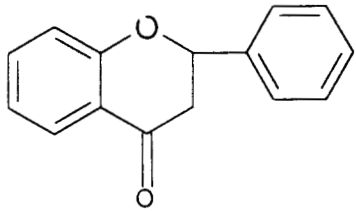
Figura 6.- Estructura básica de Flavonoides



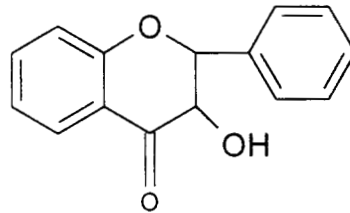
Catequinas (XII)



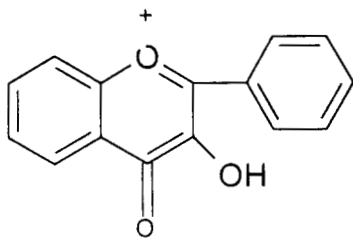
Leucoantocianidinas (XIII)



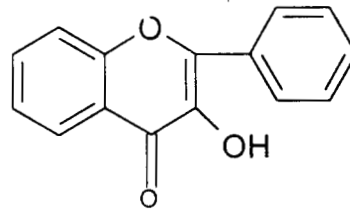
Flavanonas (XIV)



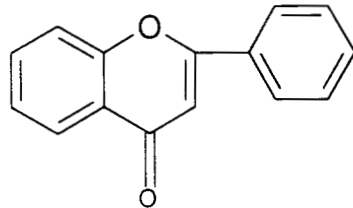
Flavanonoles (XV)



Antocianidinas (XVI)



Flavonoles (XVII)



Flavonas (XVIII)

Figura 7. Estructuras de Flavonoides.

Los bioflavonoides inhiben enzimas tales como la sintasa prostaglandina, lipoxigenasa y ciclooxigenasa (Laughton y col., 1991), además pueden también inducir a la detoxificación de sistemas enzimáticos tales como glutatión s-transferasa (Lee y col., 1995). Anteriormente se mencionaba que los bioflavonoides daban efectos benéficos contra la fragilidad y permeabilidad capilar por lo que fueron conocidos como vitamina P (Fennema, 1992; Miyake y col., 1997).

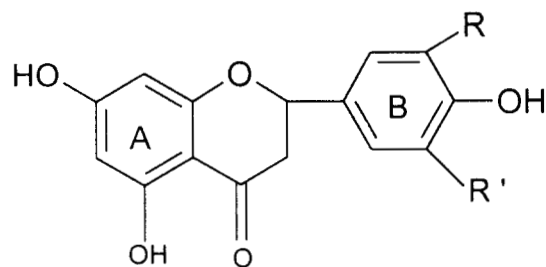
Los bioflavonoides por ser compuestos fenólicos, pueden cambiar de color cuando se tratan con bases o con amoníaco. Contienen sistemas aromáticos conjugados, por lo que muestran bandas de absorción en las regiones visible y ultravioleta del espectro. El máximo de absorción UV-VIS varía de acuerdo al estado de oxidación del anillo central y del número y posición de los grupos OR, como resultado de los sistemas conjugados. Al adicionar soluciones alcalinas los OH libres causan desplazamiento batocrómico (Tabla 4).

Tabla 4. Variación en la Absorción UV-VIS de los Flavonoides (nm).
(Marcano y Hasegawa, 1991).

Estructuras	Metanol	Hidróxido de sodio	Acetato de sodio	Cloruro de aluminio
Flavonas	315-350	40-60	-	25-40
Flavonoles	350-385	40-60	-	40-60
Flavanonas	275-295	30-40	30-40	20-30
Isoflavonas	250-270	10-15	5-15	10-20
Chalconas	370-395	40-60	-	50-65
Auronas	385-415	40-60	-	50-65
Antocianinas	475-545	Inest.	Inest.	15-50

Aunque se han aislado cerca de 150 aglucones flavonoides diferentes de las plantas, solamente 11 de ellos son los más comunes. En su estructura se observa que su patrón de hidroxilación básica es similar y solo difieren en los grupos hidroxilos unidos al anillo B. Uno de los grupos más importantes derivados del flavano está constituido por los antocianos o antocianinas, glucósidos que forman parte de los pigmentos rojos y azules de las flores y frutos, sus aglucones, las antocianidinas, se dividen en tres grupos, pelargonidina, cianidina y delphinidina.

Los flavonoles que corresponden a los tres tipos principales de antocianidinas son kaempferol, quercetina y miricetina, (Figura 8).



Kaempferol R = R' = H (XIX)

Quercetina R = OH, R' = H (XX)

Miricetina R = R' = OH (XXI)

Figura 8. Flavonoles derivados de antocianidinas

227611

Generalmente los flavonoides son incoloros al pH de las células vivas y no contribuyen significativamente al color que presentan las flores, encontrándose con mucha frecuencia en las hojas. En un estudio efectuado con hojas de 1000 especies diferentes se encontró que 48% de ellas contenían kaempferol, 56% quercetina y 10% miricetina (Valencia, 1995). La Figura 9 muestra el espectro de absorción UV-VIS de la quercetina en acetona, con longitud de onda máxima de 370 nm.

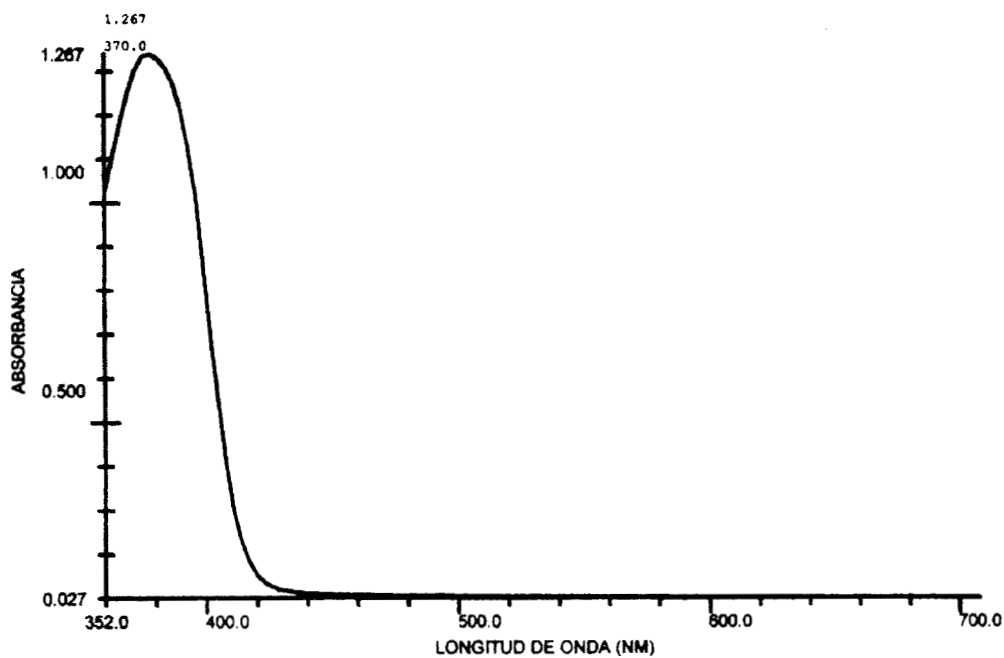


Figura 9. Quercetina en acetona (Sigma Chemical Co).

Los bioflavonoides están relacionados biosintéticamente con los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, via los correspondientes ácidos cinámicos. Por experimentos con átomos marcados, se ha establecido que el anillo B se forma a

partir del ácido shikímico (Fennema, 1993). El anillo A se forma por la unión cabeza-cola de tres moléculas de acetato, la cadena alifática de tres carbonos, probablemente se añade al anillo B para producir el sistema C₆ - C₃ antes de que se forme el anillo A. Se presume que todos los anillos aromáticos que poseen grupos hidroxilo en posición orto, tienen como precursor al ácido shikímico, mientras que los anillos aromáticos con grupos hidroxilo meta, vienen del acetato. Tales sistemas C₆ - C₃ como la fenilalanina, el ácido cinámico y el ácido ferúlico, son los que forman la porción C₆ (B) - C₃ de los flavonoides. La acumulación de derivados del ácido p-cumárico justo antes de la formación de las antocianinas, sugiere que éste ácido también es un precursor de dichos pigmentos. Se ha observado que el ácido shikímico, puede formar flavonoides sin la participación de aminoácidos o ácidos cinámicos (Marcano y Hasegawa, 1991; Valencia, 1995).

La interconversión chalcona-flavanona quizás se produce enzimáticamente *in vivo*, pero debido a la rápida interconversión de chalconas y flavonas no se ha podido determinar si las chalconas son intermediarios entre las flavanonas (XIV) y otras clases de flavonoides. La deshidrogenación directa de una flavanona puede dar la correspondiente flavona (XVIII); las chalconas parecen ser precursores directos de las auronas, y ya sea directa o indirectamente pueden serlo también de otros flavonoides (Valencia, 1995).

1.2. Obtención de pigmentos

1.2.1. Métodos de extracción.

La extracción de bioflavonoides generalmente se realiza en metanol a temperatura ambiente. Algunos autores tratan con hexano para remover lípidos, carotenoides y clorofilas, separan por centrifugación alrededor de 6000 rpm, filtran a vacío y llevan a pH 3 con ácido clorhídrico ó ácido trifluoroacético (Guyot y col., 1998; Martos y col., 1997; Lewis y col., 1998). Otros investigadores reportan la adición de dietil ditiocarbamato de sodio como antioxidante (Crozier y col., 1997). Posteriormente se puede purificar a través de cartuchos sep-pack, ó columnas cosmosil™ para eliminar interferencias polares tales como ácido ascórbico (Lee y Howard, 1995; Miyake y col., 1997).

La separación se realiza por cromatografía de líquidos en columnas tales como YMC pack™, simmetry™, novapack™, Lichrosorb™, todas ellas fase inversa C₁₈ a longitud de onda desde 350-370 nm, y como fase móvil diversos disolventes tales como acetonitrilo, metanol y agua (García-Viguera y col., 1998; Ferreres y col., 1998; Miyake y col., 1997; Crozier y col., 1997 y Andrade y col., 1998).

Técnicas espectrométricas como impacto de electrones-espectrometría de masas (EI-MS) han proporcionado información molecular y estructural de flavonoides, sin embargo los flavonoles y glicósidos de flavonoles no son suficientemente volátiles y

deben ser derivatizados para mejorar su volatilidad. La permetilación y trimetilación son los métodos comunmente usados, pero ellos incrementan el peso molecular y con frecuencia producen mezclas de compuestos parcialmente derivatizados que requieren un paso subsecuente de purificación. Recientemente, los estándares fenólicos han sido analizados usando bombardeo rápido de átomos (FAB) y termospray en espectrometría de masas (TS-MS) y hay una concordancia general para caracterizar por éste método los compuestos fenólicos, usando técnicas de ionización suave que no requieren derivatización química antes del análisis (Ponce y Taylor, 1999).

Con respecto a la actividad antioxidante, Miyake y col., (1997) aislaron eriocitrina y eriodictiol de cáscara de lima y limón, utilizando como referencia a ácido linoleico y encontraron actividad antioxidante más fuerte que la de α -tocoferol. Se han probado los efectos antioxidantes de cebolla rica en quercetina, evaluándose la estabilidad en almacenamiento de productos a base de carne de pollo la cual fue cocinada y enfriada, se encontró que existe un retardo en los cambios oxidativos por lo que podría ser utilizada como antioxidante natural. La autoxidación fue seguida usando la prueba del ácido tiobarbitúrico (Karastogiannidou, 1999).

Lee y col., (1995), reportaron altos porcentajes de quercetina en cebolla (alrededor de 284-486 mg/Kg), en frijol fresco (32-45 mg/Kg), (col 110 mg/kg) y brócoli (30 mg/kg). Gordon y An (1995) extrajeron los bioflavonoides de raíz de regaliz a los

b) Extracción con fluidos supercríticos.

c) Síntesis química.

d) Producción microbiana.

Extracción con disolventes.

Se lleva a cabo por un proceso sólido-líquido el cual es una operación básica en la que uno o varios componentes de una fase sólida se transfieren a una fase líquida. El sentido de la transferencia es siempre del sólido al líquido. Esta operación se conoce también con los nombres de lixiviación, lavado o percolado. El soluto puede ser un sólido disperso en el interior del material insoluble o puede estar recubriendo su superficie. Puede ser un líquido adherido o retenido por el sólido o estar contenido dentro de su estructura celular (Brenan, 1990).

Las diversas formas en que el soluto puede estar contenido en el sólido inerte influyen sobre la mayor o menor facilidad con que puede llegar el disolvente hasta él, y por lo tanto depende de las leyes físicas que regulan la operación.

El proceso de extracción tiene lugar a lo largo de tres etapas:

a) Cambio de fase del soluto (paso del soluto a la disolución)

b) Difusión del soluto a través del disolvente contenido en los poros del sólido

c) Transferencia del soluto desde la superficie de las partículas del sólido al seno del líquido

Durante el contacto tiene lugar la transferencia entre los componentes de las fases y se va realizando la aproximación al estado de equilibrio. El cual se alcanza cuando la solución que está en contacto con el sólido está saturada. En el equilibrio se separan dos fases denominadas extracto y refinado. El extracto es la fase constituida por soluto y disolvente y el refinado está formado por el sólido no soluble y una cierta cantidad de solución retenida por él.

El sistema está formado por:

Soluto (S) Compuesto ó compuestos insolubles

Disolvente (L) Líquido ó mezcla de ellos utilizados en la extracción del soluto

Inerte (I) Toda la materia sólida que resulta insoluble en el disolvente

Realizando los balances de masa respectivos se conoce la composición de la mezcla a partir de las masas y composiciones de las corrientes de entrada y salida (Brenan, 1990; Charm, 1985; Chiralt y col., 1990b), como se muestra en la Figura 10.

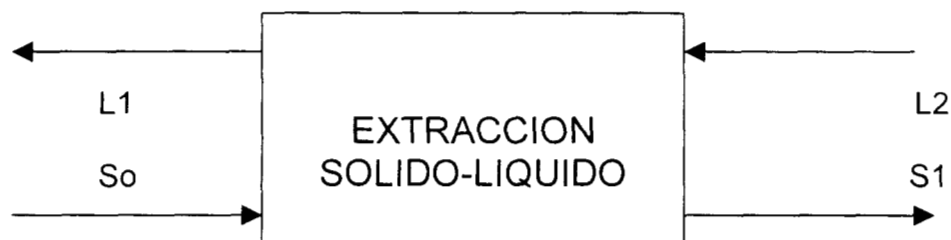


Figura 10. Etapa de equilibrio en extracción sólido-líquido

La etapa de equilibrio está representada por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{S_0}{L_2} = \frac{Ya_2 - Za_1}{Za_1 - Za_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\frac{S_0}{L_2} = \frac{Yb_2 - Zb_2}{Zb_1 - Xb_0} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

S_0 = Masa total (moles) de fase sólida a la entrada de la extracción

S_1 = Masa total de la fase sólida a la salida de la extracción

L_1 = Masa total (moles) de fase líquida a la salida de la extracción

L_2 = Masa total (moles) de fase líquida a la entrada de la extracción

Ya_2 ; Yb_2 = Fracción molar en el flujo L de a y b

Za_1 ; Zb_1 = Fracción molar del componente en la mezcla

Xa_0 ; Xb_0 = Fracción molar en el flujo S

La extracción de productos vegetales tales como carotenoides y bioflavonoides conlleva una serie de procesos adicionales antes y durante la extracción ya que éstos compuestos son sensibles a la luz, altas temperaturas, oxígeno, humedad etc, de tal manera que todas las operaciones deben ser conducidas con especiales precauciones (baja temperatura, luz atenuada, adición de antioxidantes).

Otros factores que pueden favorecer las modificaciones en la estructura de los pigmentos de la muestra son la solubilización de éstos, presencia de ácidos u oxidación enzimática. Para prevenir o minimizar la degradación de éstos productos se utilizan pretratamientos durante su extracción, ya que la isomerización empieza tan pronto como ellos son solubilizados (Braverman y col., 1980; Fennema, 1993).

Para inactivar sistemas enzimáticos tales como lipoxigenasa y peroxidasa, los vegetales son escaldados antes de la extracción requiriendo 90 segundos en agua caliente (Cheftel y Cheftel, 1984).

La adición de antioxidantes como butilhidroxianisol (BHA) inhibe a lipoxigenasas, de forma similar se usa, 2,6-di-ter-butilhidroxitolueno (BHT) adicionado al disolvente de extracción para evitar la formación de peróxidos (Khachik y col., 1992). Para el mismo fin han propuesto el lavado del disolvente con solución acuosa de bicarbonato de sodio (Britton y col., 1995).

La acción de los ácidos puede causar la decoloración o cambio de color total de la solución, la isomerización de trans- β -caroteno ha sido observada en presencia de HCl, para neutralizarla se utiliza solución al 1% de $MgCO_3$ (Lesellier y col., 1993).

En algunas ocasiones es conveniente realizar en el material vegetal una saponificación para lo cual el extracto es disuelto en metanol o isopropanol y se adiciona hidróxido de potasio (60% P/V), se burbujea con nitrógeno e incuba a

temperatura ambiente de 1 a 2 h, lo cual es suficiente para destruir todas las clorofilas presentes (Ittah y col., 1993). Si el material extraído procede de muestras con mucha cera, se sugiere dejar la saponificación toda la noche para hidrolizar todos los ésteres de las ceras (Britton, 1995). Después de la saponificación el extracto es lavado varias veces con agua para remover el álcali, productos de degradación de clorofilas y ácidos grasos, el color amarillo claro que aparece confirma la saponificación (Kull y Pfander, 1995). El extracto es evaporado a sequedad, conteniendo el extracto saponificado o materia insaponificable la cual es usada para la separación cromatográfica o almacenamiento bajo nitrógeno a -20°C (Adewussi y Bradbury, 1993).

Ha habido discrepancia en el resultado del procedimiento de la saponificación para la determinación de carotenoides y para demostrarlo se han empleado carotenoides sintéticos (β -caroteno y β -apo 8' carotenal) y frutas y vegetales naturales (papaya, tomate y col), encontrando pérdidas cuantitativas por isomerización trans-cis y epoxidación (Kimura y col., 1990). Ittah y col., (1993) recomiendan emplear metóxido de sodio en lugar de hidróxido de potasio durante la saponificación, ya que el hidróxido de potasio es una base más fuerte que destruye los carotenoides lábiles, éstos autores encontraron una disminución del 50% de contenido de β - caroteno al emplear ésta base fuerte en comparación con metóxido de sodio.

227611

Extracción con fluidos supercríticos.

Una tecnología reciente para extraer moléculas o compuestos a partir de una mezcla es la extracción con fluidos supercríticos la cual solo se practica a escala industrial. Es similar a una operación convencional de extracción pero el disolvente que se utiliza, es un fluido en estado supercrítico (Cadoni y col., 2000). En la Figura 11 se muestra el diagrama de fases o diagrama presión-temperatura (P-T) para un compuesto puro con las diferentes fases, las líneas de equilibrio en el punto crítico y la región supercrítica.

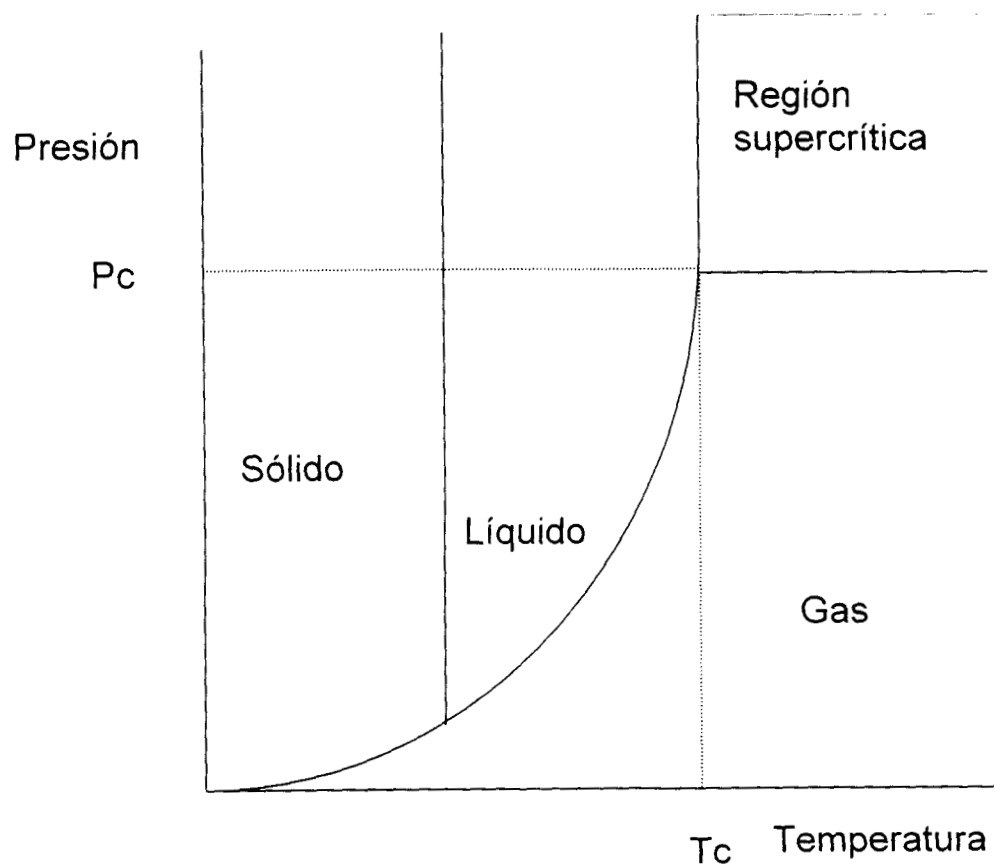


Figura 11. Diagrama Presión-Temperatura para un compuesto puro

El punto crítico es definido como el par de valores de presión y temperatura al cual la sustancia ya no muestra sus características propias, tales como densidad, viscosidad ó difusividad, por el contrario un fluido supercrítico presentará características diferentes a las del gas o del líquido que le dio origen (Reid y col., 1988).

Los fluidos supercríticos presentan el orden de magnitud de esas propiedades como un valor intermedio entre la fase líquida y la gaseosa. El poder de disolución mejorado en los fluidos supercríticos se debe a la alta densidad que presenta el disolvente en la región crítica, referida como una densidad parecida a la de los líquidos, mientras que la viscosidad dificultaría la extracción en los fluidos supercríticos que es más bien baja, referida como una viscosidad similar a la de los gases (Bruno y col., 1993; Ponce e Izcapa, 1989). Esta combinación de alta densidad y baja viscosidad tiene como consecuencia una alta difusividad, cercana a la de los gases, factor importante en la extracción, sin presentar los problemas de alta viscosidad como en los líquidos (Ponce e Izcapa, 1989). La combinación única de las propiedades de los fluidos supercríticos es la que los hace tener un mejor poder de disolución y por lo tanto atractivos para las operaciones de extracción en la región supercrítica (Lesellier y col., 1993).

Debido a la temperatura crítica (T_c) baja del CO_2 éste gas es uno de los mas usados en la extracción supercrítica, además éste compuesto es no polar y actúa por lo tanto como si fuera un disolvente apolar, de aquí que es un excelente disolvente para

materiales con baja presión de vapor, sólidos a temperatura ambiente y apolares tales como aceites, grasas, colesterol, cetonas, aldehídos, ésteres, colorantes etc. (Lesellier y col., 1993). Se considera además que el CO₂ tiene una T_c cercana al ambiente y P_c relativamente baja, es compuesto libre de tóxicos y es un producto del metabolismo; se encuentra ampliamente distribuido en la atmósfera y tiene un costo relativamente bajo, recuperándose fácilmente después de la operación. En la operación de extracción supercrítica intervienen las mismas variables que en la extracción tradicional tales como el área de transferencia, el tiempo de contacto, la difusividad, el tamaño de partícula, las relaciones en el equilibrio etc. En éste tipo de extracción solo hay que considerar que se requieren condiciones para tener el fluido en estado supercrítico, es decir alta presión y temperatura (De la Torre y Robles, 1999).

En resumen el fluido supercrítico es un disolvente ideal para alimentos, colorantes, industria farmacéutica y cosmética donde es esencial obtener productos de alto grado de pureza (Cadoni y col., 2000; Obaya y Guerrero, 1992).

Síntesis química de compuestos carotenoides.

Los procesos de producción industrial están basados en componentes básicos a partir de los cuales se sintetizan químicamente, tal es el caso de los carotenoides en el cual la β-ionona es un intermediario importante de la industria de la perfumería.

Este puede ser obtenido por síntesis total de acetona y acetileno vía dehidrolinalol ó por síntesis parcial de β -pineno vía citral. El β -caroteno sintético fue introducido comercialmente por Roche en 1954, para la fortificación de margarina, de igual forma ésta empresa introdujo en 1960 β -apo-8' carotenal y en 1964 a la cantaxantina (Noonan, 1972). Los principales tipos de reacciones que han sido empleados para la síntesis del esqueleto de carotenoides e intermediarios son (Mayer e Isler, 1995; Ito y col., 1992):

- Condensación de compuestos carbonilos con haluros de fenilfosfonio y fosfonatos dialquilos en presencia de litiofenil n-butillitio y óxidos de metales alcalinos
- Reacciones de Grignard de compuestos carbonilo con metales acetilados
- Condensación de enol-éteres en presencia de cloruro de zinc ó trifluoruro de boro
- Condensación aldólica de dos compuestos carbonilos
- Reacciones de dimerización reductiva y oxidativa
- Formación de hidrocarburos de haluros de alquilo y metales álcalis

En la actualidad, la mayoría de los carotenoides se obtienen sintéticamente ya que resulta más económico, sin embargo debido a las restricciones legislativas, cada vez se emplean más los de origen natural.

Producción microbiana de compuestos carotenoides.

El incremento y mejora constante, de los procesos fermentativos y otras técnicas biológicas, han permitido que las bacterias, los hongos y los protozoarios (incluyendo el plancton fotosintético), ofrezcan un nuevo enfoque para la producción comercial de pigmentos. La mayoría de los prospectos futuros, usando técnicas de transformación de genes, permiten en teoría, la producción biológica de casi cualquier pigmento natural estable (Hendry y Houghton, 1996). Las microalgas constituyen un reservorio de sustancias naturales de valor comercial, su explotación está basada en su eficiente maquinaria fotosintética. Entre ellas están las denominadas *Phycobiliproteínas* y *Rhodophytas* caracterizadas por sus pigmentos rojos ó azules, tales como *Porphyra* y *Eucheuma* que son cosechadas en grandes cantidades (Arad y Yaron, 1992; Hendry y Houghton, 1996), *Haematococcus pluvialis* (Parajó y col., 1997). El contenido de carotenos varía ampliamente entre especies de algas *Euglena gracilis* contiene 800 µg/g de peso seco, mientras que *Chlorella vulgaris* contiene 0.18 mg de xantofilas (Atkinson y Mavituna, 1989).

Quizás la fuente más rica de pigmentos recolectados esté entre el reino fungal, muchos de éstos incluyendo a ficomicetos, están altamente pigmentados. Los pigmentos bacterianos incluyendo antibióticos pigmentados ya son producidos industrialmente (Liann-Jensen y Andrews, 1972). Los carotenoides metoxilados son peculiares de ciertas bacterias fotosintéticas como *Athiorhodaceae* y *Thioirhodaceae*

spp. Se ha demostrado la producción de carotenoides como zeaxantina por Flavobacterias marinas. Cuando éstas crecen en medio basado en glucosa y agua de maíz, la cantidad contenida de zeaxantina es de 10-40 mg/l, si se suministran ésteres palmíticos, metionina, piridoxina y sales ferrosas, el rendimiento aumenta a 190 mg/l (Liann-Jensen y Andrews, 1972). Asimismo, se ha obtenido astaxantina de madera, con *Xanthophylomyces dendrorhous*, la cuál fue previamente hidrolizada con *Trichoderma reesei* (Parajó y col., 1997).

Algunas levaduras han sido reportadas como productoras de β -caroteno entre otras *Rhodotorula flava*, *gracilis* y *sannieli*, pero debido a sus bajos rendimientos y a mejores perspectivas que ofrecen los ficomicetos, el desarrollo de ésta alternativa, se ha restringido (García y col., 1993).

1.3. Separación y Análisis cromatográfico.

1.3.1. Consideraciones analíticas generales.

El notable aumento de la calidad del relleno de las columnas y el avance de la instrumentación llevaron a la modalidad de HPLC ó cromatografía líquida de alta resolución, en el cual los principales logros se concentraron en tres parámetros fundamentales: resolución, reproducibilidad y rapidez.

Actualmente el método dominante es la cromatografía líquida en fase enlazada (BPC, bonded phase chromatography) que puede clasificarse en fase normal (NP-BPC) y fase reversa (RP-BPC), de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. En la cromatografía en fase enlazada la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales, octadecilsilano (ODS ó C₁₈), octilsilano (C₈), fenilo, ciano (CN), amino, diol etc. (Quattrocchi y col., 1992).

La cromatografía en fase normal es la clásica forma de separación que usa fase estacionaria polar y fase móvil no polar, el soluto es retenido por la interacción de sus grupos funcionales polares con los grupos polares de la superficie del empaque generalmente se ha empleado sílica no enlazada y alúmina.

La cromatografía fase reversa ha empezado a ser la forma más popular de la cromatografía en éste tipo de separación, aquí la fase móvil es polar y la estacionaria no polar. Las ventajas de la cromatografía reversa se resumen en:

- Compuestos no iónicos, iónicos o ionizables que pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil
- La adsorción irreversible, frecuente de la silicagel, raramente ocurre
- La fase móvil predominante es agua la cual es abundante y económica

- El modificador orgánico predominante, es accesible en calidad y precio. El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil

La fase móvil en cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) está en general constituida por un disolvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que se agregan aditivos, sales o buffers. A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención y a mayor cantidad de agua, mayor retención. Se considera que la selectividad del sistema está dada por el modificador, en función de su capacidad aceptora o dadora de protones y momento dipolar, propiedades que determinarán el tipo y magnitud de la interacción con la muestra. Los disolventes de uso habitual en HPLC han sido clasificados en 8 grupos según el tipo y magnitud de éstas interacciones y están representados en un diagrama triangular (Figura 12).

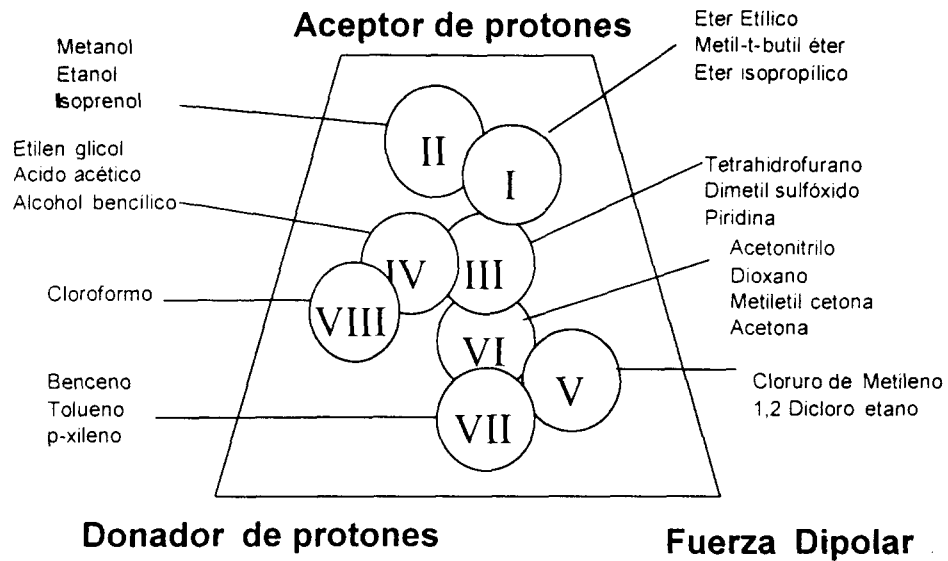


Figura 12. Triángulo de selectividad de disolventes propuestos Snyder según el tipo y magnitud de interacción (Quattrocchi, 1992)

Los disolventes de mayor empleo en RPLC son además del agua, el metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano, los cuales están situados en grupos diferentes y opuestos en el diagrama triangular de la clasificación propuesta por Snyder (Quattrocchi y col., 1992). Se considera que el agua actúa como acarreador y no aporta selectividad al sistema, la que está dada por el modificador orgánico, los aditivos y el pH. (García de Marina y Castillo, 1988). Sin embargo debe de tenerse en cuenta que éstas condiciones pueden no ser siempre aplicadas. El metanol, el acetonitrilo y tetrahidrofurano pueden considerarse, como los vértices del triángulo de selectividades en fase reversa de modo que constituyen la batería necesaria y en general suficiente para obtener la resolución adecuada en este sistema. Otros disolventes que se usan en menor grado son: acetona, dioxano, dimetilsulfóxido e isopropanol, cuyo empleo está en algunos casos limitado por la transparencia al UV y la viscosidad, aunque la adición de pequeñas proporciones de los mismos puede mejorar la selectividad sin mayor perturbación del sistema. (Quattrocchi y col. 1992). La fase estacionaria puede ser sílica enlazada con hidrocarburos alifáticos como ligandos. Otras fases estacionarias empleadas son carbón grafitizado y estireno o divinil benceno.

Como se indica en la Tabla 5 el tipo de sustituyente más empleado en la fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C_{18} y en menor proporción C_8 , con o sin recubrimiento ("end capping"), con menor o mayor grado de cobertura (capa monomérica y polimérica). En RPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud de

227611

cadena alquílica, a mayor cobertura, mayor retención. El análisis de fase reversa depende también de la actividad de residuos de silanol. Los silanoles interactúan con el grupo funcional polar de los solutos, también hay empaques que muestran diferentes selectividades dependiendo de la actividad de los silanoles. El sesgo de los picos es frecuentemente observado para compuestos básicos en empaques con un alto nivel de actividad silanol.

Tabla 5. Tipos de relleno usados en cromatografía en fase ligada.

Modificación	Grupo Ligado a Silicagel	Aplicaciones y comentarios
C1	- CH ₃	metil RP Para compuestos muy
C ₂	- CH ₂ -CH ₃	etil retenidos en C ₁₈
C ₄	- (CH ₂) ₃ -CH ₃	butil Análisis más rápidos que con C ₁₈
C ₆	- (CH ₂) ₅ -CH ₃	hexil Análisis de péptidos y proteínas.
C ₈	- (CH ₂) ₇ -CH ₃	octil RP de empleo general. Algo menos en IPC. Menos retentiva y mas rápida que C ₁₈
C ₁₈	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	octadecil (ODS) RP y IPC de empleo general. Es el relleno mas empleado en HPLC
Fenil	-(CH ₂) ₃ -Phe	fenilpropil RP e IPC (menos): Para compuestos moderadamente polares. Retención similar a C ₈ , pero con mayor selectividad hacia compuestos aromáticos.
Ciano	-(CH ₂) ₃ -CN	cianopropil RP (Disolventes polares) y NP (Disolventes no polares). Retención moderada, con selectividad hacia dobles y triples enlaces.
Nitro	-(CH ₂)Phe-NO ₂	nitrofenilpropil Separación de compuestos con dobles enlaces y aromáticos en NP.
Amino	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	aminopropil Material multipropósito: en NP como alternativa de selectividad a CN, NO ₂ y silicagel; en RP muy empleada en análisis de carbohidratos;
Diol	-(CH ₂) ₃ -O-CH-CH ₂ OH OH	NP, RP y SEC. Menos polar que la silicagel no modificada, pero mas polar que CN. Retención moderada en RP. Menos estable
N(CH ₃) ₂	-(CH ₂) ₃ - N(CH ₃) ₂	Intercambiador aniónico débil
-SO ₃ Na	-(CH ₃) ₃ - Phe-SO ₃ -	Intercambiador catiónico fuerte
-N(CH ₃) ₃ ⁺	-(CH ₂) ₃ - Phe-N(Me) ₃ ⁺	Intercambiador aniónico fuerte
-COONa	-COO	Intercambiador catiónico débil

RP = Fase reversa, IPC = Apareamiento iónico, NP = Fase normal, SEC = Exclusión por tamaño.

extracolumnar, responder a todos los solutos, tener sensibilidad apropiada, no afectarse con cambios de temperatura, poseer buena relación señal/ruido, no destruir la muestra, tener una constante de tiempo baja. Entre los detectores están los denominados generales y selectivos éstos últimos son sensibles a alguna propiedad propia del soluto, como los de UV, que producen una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda, éste es el más usado en HPLC y reúne las características arriba mencionadas; dentro de éstos se encuentra el detector de arreglo de diodos (Figura 14), que es uno de los últimos adelantos en los dispositivos convencionales, la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red; en el de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido, la celda se ilumina con luz blanca, la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio, de ésta forma se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real (Quattrocchi y col., 1992; Leenher y Nelis, 1992; Siouffi, 1992)).

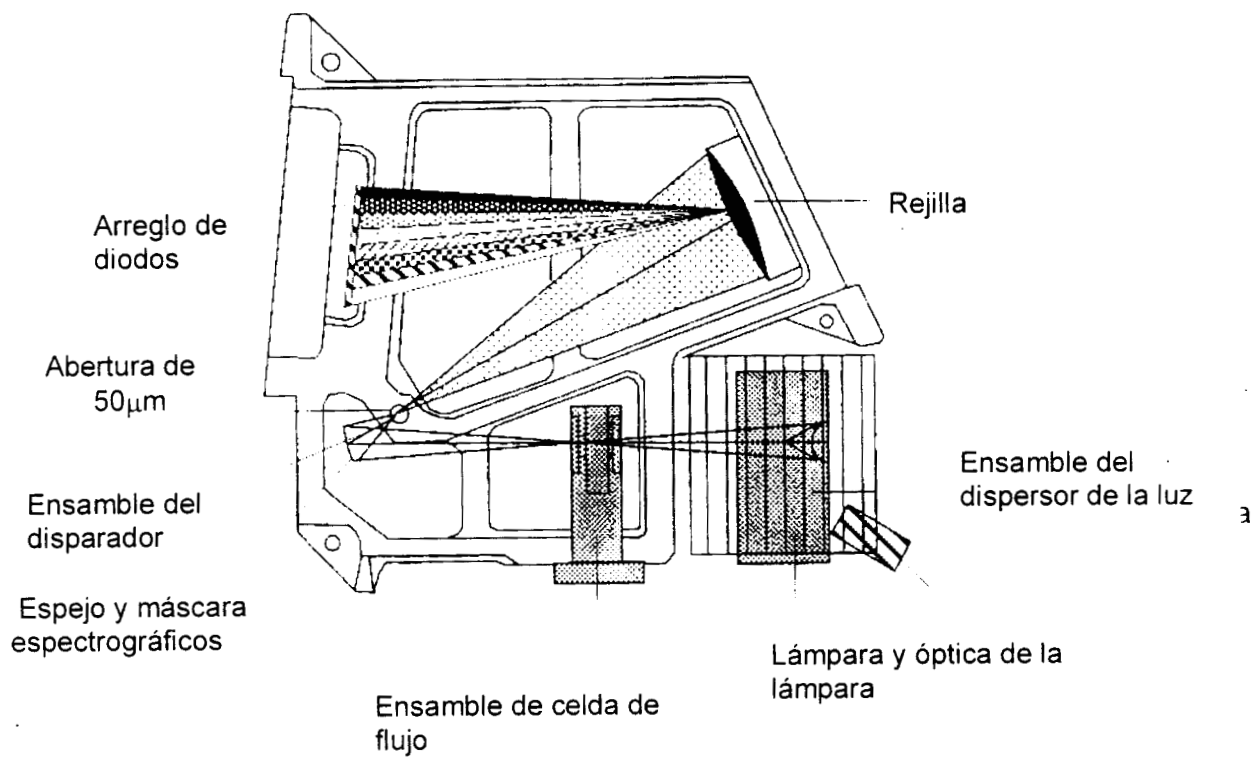


Figura 14. Detector de Arreglo de Diodos (Waters, 1997).

2. JUSTIFICACION.

En la centuria de 1900 el reino vegetal y animal proveía todos los materiales colorantes para la industria textil, cosmética, pinturas y alimentos. Animales y plantas en estado silvestre y cultivadas así como su procesamiento y comercio fueron de una enorme importancia socioeconómica para muchas comunidades de la época. Este patrón comenzó a cambiar muy rápidamente seguido por el descubrimiento de los colorantes sintéticos. El impacto inicial fue sentido en la industria textil para los colorantes naturales los cuales perdieron su mercado.

Progresivamente una amplia variedad de colorantes sintéticos fueron manufacturados y éstos desplazaron a muchos de los colorantes para alimentos y cosméticos que se venían utilizando ya que éstos fueron comparativamente más baratos, mayor consistencia en la calidad, mejor facilidad de obtención, mejores atributos de calidad y estabilidad superior en sistemas alimentarios.

Hoy en día pocos colorantes naturales han retenido una posición significativa en su empleo en el sector textil sobre todo por su calidad única, sin embargo debe aceptarse que el dominio de los colorantes sintéticos es irreversible en la industria textil.

En lo que respecta al sector alimentario, éste está experimentando un regreso al mercado de colorantes naturales, éste cambio no ha sido manejado directamente por

la industria alimentaria sino por los consumidores de países desarrollados, los cuales están informados y preocupados sobre posibles riesgos a su salud asociados con aditivos alimentarios sintéticos.

De acuerdo a datos registrados por el Banco Nacional de Comercio Exterior (BANCOMEXT, 1999), el volumen de las importaciones a México de materiales colorantes de origen animal y vegetal aumentaron de 1995 a 1998 en un 61.96%, de 324.5 ton a 1382.190 ton. Por otro lado las exportaciones bajaron en un 32% (4,481.786 ton en 1995 a 1998, 2,283.037 ton en 1998).

El aumento en las importaciones y la baja en las exportaciones de materiales colorantes naturales, demuestra la necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de colorantes de origen natural, así como mejorar y optimizar los procesos existentes que reduzcan los costos actuales y ser más competitivos en el mercado internacional.

Una alternativa para optimizar costos lo constituyen los materiales colorantes asociados con productos nutraceuticos, tales como carotenoides y flavonoides, los cuales presentan un potencial con propiedades terapéuticas que ha llamado la atención recientemente a investigadores interesados en la salud humana (Helguera, 1999; Yanun, 1999).

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Estudiar el potencial de un vegetal ampliamente distribuido en el estado de Tabasco con posibilidades para la extracción de pigmentos naturales; identificando a éstos pigmentos y evaluando su estabilidad.

3.2. Objetivos específicos.

- Hacer una evaluación preliminar de algunos vegetales con posibilidades de ser una nueva fuente de colorantes naturales.
- Seleccionar el vegetal con las mejores características para extracción de pigmentos naturales y evaluar el contenido de éstos.
- Determinar en el vegetal seleccionado los parámetros de extracción de pigmentos.
- Identificar mediante pruebas espectrofotométricas el grupo ó grupos de compuestos a los que pertenecen los pigmentos extraídos.
- Analizar la composición química del vegetal para determinar la posible asociación con proteínas ó carbohidratos.
- Separar y purificar por técnicas cromatográficas los pigmentos extraídos.

- Identificar por métodos químicos e instrumentales a los componentes del pigmento.
- Evaluar la estabilidad de los pigmentos extraídos a diferentes temperaturas de almacenamiento en presencia y ausencia de iluminación y de antioxidantes.
- Evaluar la estabilidad de los pigmentos extraídos al adicionarlos en un aceite comestible en base a los resultados obtenidos en el objetivo anterior.

4. METODOLOGIA.

4.1. Recolección y selección de material vegetal.

Se seleccionó la materia prima de origen vegetal que presentaba color, existente en el Estado de Tabasco, como una posible fuente para extraer pigmentos naturales.

Los materiales se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Especies vegetales muestreadas en el estado de Tabasco que presentan pigmentos naturales. (Magaña, 1995; Vargas y col., 1992).

	NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	COLOR
Flor	Macuilis	<i>Tabebuia rosea</i>	Rosado
Hoja	Croto	<i>Codiaeum variegatum</i>	Rojo
Hoja	Amarillo	<i>Terminalia amagonia</i>	Amarillo
Raíz	Sasafrán	<i>Curcuma longa</i>	Amarillo
Hoja	Almendro	<i>Terminalia catappa</i>	Rojo- amarillo
Hoja	Matalí	<i>Tradescantia zebrina</i>	Rojo
Hoja	Maguey morado	<i>Tradescantia spathacea</i>	Morado
Flor	Guayacán	<i>Tabebuia guayacán</i>	Naranja
Flor	Copa de oro	<i>Salandra grandiflora</i>	Amarillo
Hoja	Crucetilla	<i>Randia aculeata</i>	Amarillo

A éstos vegetales se le realizaron pruebas de extracción, utilizando por separado los siguientes disolventes orgánicos: acetona, etanol, hexano y agua, realizando en

ellos espectros de absorción desde 300 a 700 nm en un espectrofotómetro Spectronic[®] Genesys[™] 2 PC. (Rochester, Nueva York, E.U.A.) para conocer en forma aproximada el tipo de compuestos mayoritarios que pudieran encontrarse en el producto así como la intensidad de color extraído y la estabilidad a la exposición al aire, éstos dos últimos de una manera visual. De cada especie recolectada se tomaron 10 muestras de 4.0 g las cuales se extrajeron en un homogenizador Waring Blender modelo 36 BLS4 (New Harford, Connecticut, E.U.A.) con 200 mL de los diversos disolventes.

4.2. Selección de los parámetros de extracción: disolvente-tiempo de extracción.

4.2.1. Primera etapa de extracción.

Se realizó una primera fase experimental de extracción de los pigmentos de hoja amarilla y roja de *T. catappa*, Se partió de disolventes reportados por otros investigadores (Tabla 7) y a partir de ellos se determinó la mezcla de mayor rendimiento en base al porcentaje de color extraído.

Se realizaron extracciones consecutivas 10 veces con cada mezcla de disolventes y se determinó en cada una de ellas la absorbancia a la longitud de onda máxima y su espectro de absorción desde 300-700 nm en un espectrofotómetro Spectronic[®] Genesys[™] 2 PC. (Rochester, Nueva York, E.U.A.).

227611

Tabla 7. Disolventes empleados en la extracción de pigmentos de *T. Catappa* durante la primera fase experimental.

CODIGO	DISOLVENTES	REFERENCIA
V	Acetona-Etanol (50:50)	Wills y Rangga (1996); Mínguez y Hornero (1993)
W	Acetona (100)	Philip y Chen(1988); Lesellier y col., (1993)
X	Hexano-Acetona-Etanol-Tolueno(10:7:6:7)	Yen y Chen (1995); Chen y Chen (1993)
Y	Acetona-Isopropanol (50:50)	Biacs y col., (1992)
Z	Acetona-Eter de Petróleo (50:50)	López y col., (1993)

4.2.2. Segunda etapa de extracción.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa de extracción en la cual resultó ser la mejor mezcla acetona-éter de petróleo (Z), se realizó una segunda etapa en la cual se incorporó una nueva mezcla de disolventes formada por acetona- hexano, con la finalidad de poder utilizar otro disolvente similar, más económico y de menor punto de ebullición a la vez de seleccionar de entre éstos dos sistemas la mayor extracción de pigmentos. Todos los disolventes empleados en la extracción fueron grado reactivo (Baker, Phillipsburg, Nueva York, E.U.A.).

Para ésta etapa de extracción a 30 g de muestra fresca, se adicionó como antioxidante 0.1% de butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma, St. Louis, E.U.A.) 3 g de

CaCO₃ para neutralizar la reacción y evitar la isomerización de carotenoides (Britton y col., 1995), 10 g de Na₂SO₄ anhidro (Baker, Xalostoc, México), para absorber el agua presente en la muestra (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993) y 400 mL de mezcla de disolvente. Se homogenizó por 15 seg en un homogenizador Waring Blender modelo 36 BLS4 (New Harford, Connecticut, E.U.A.) (Cano y Marroquín, 1991).

Se usaron mezclas de disolventes éter de petróleo-acetona y hexano-acetona en proporciones de 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 y 0:100, con 10 repeticiones cada una. Después de la homogenización las muestras se mantuvieron en reposo 2.5 h en ausencia de luz y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1. Se aforó al volumen original y se realizaron las mediciones espectrofotométricas, para evaluar el porcentaje de pigmento extraído, se evaluaron también los espectros de absorción máxima desde 300-700 nm. Los datos fueron validados con el análisis de varianza empleando *t de student*. Por otra parte, se llevó a cabo una saponificación para eliminar clorofilas que interfirieran en la determinación espectrofotométrica (Lesellier y col., 1993).

4.2.3. Saponificación.

La saponificación se llevó a cabo en extractos obtenidos con hexano-acetona (70:30). El extracto conteniendo los pigmentos se filtró a vacío y se concentró en un evaporador rotatorio Büchi Laborthechnik AG (Flawil, Suiza) a 40°C, a 100 mL del extracto concentrado se le adicionaron 20 mL de KOH metanólico al 20%. Se dejó

actuar durante 30 min a 50°C con agitación en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se lavó con agua desionizada hasta pH neutro (Rivas, 1989; Lesellier, 1993; Hart, 1994; Britton y col., 1995).

Una segunda extracción se realizó con hexano (100%) hasta que la muestra quedó incolora, para el proceso de extracción nuevamente se adicionó Na₂SO₄ anhidro (Baker, Xalostoc, México) a la muestra. A partir de los resultados obtenidos se probó una modificación al proceso de saponificación en presencia de nitrógeno y reducción de KOH metanólico al 10% para hacer menos agresivo el proceso. Finalmente la muestra se filtró a través de membranas acrodisc Gelman de 0.45 µm para posteriormente llevar a cabo el análisis espectrofotométrico y cromatográfico.

4.2.4. Identificación de los grupos de compuestos a los cuales pertenecen los pigmentos extraídos.

Esta se llevó a cabo mediante la caracterización espectrofotométrica y comparación de espectros de absorción UV-VIS reportados para clorofilas, antocianinas, flavonoides y carotenoides (Hendry y Houghton, 1996; Fennema, 1993), corroborando con espectros de compuestos similares tales como β-caroteno y quercetina (Sigma Chemical, Co. St. Louis, M.O. E.U.A.).

4.3. Identificación de posibles compuestos asociados al pigmento.

4.3.1. Análisis fisicoquímico.

Con la finalidad de encontrar compuestos asociados al pigmento se realizó el análisis fisicoquímico a la hoja fresca de almendro (*T. catappa*) determinando el porcentaje de humedad y lípidos totales y proteína por el método de AOAC (1990), contenido de carotenoides totales a 450 nm, extrayendo con hexano y teniendo como referencia a β -caroteno (Sigma, St. Louis, E.U.) Hart y Scott, (1995) y proteína en el extracto por método de Lowry, éste último utilizando albúmina de suero bovino disuelta en cloruro de sodio al 0.9% para construir la curva patrón (Müller y Schweizer, 1994; Robyt y White, 1990).

4.4. Separación, purificación e identificación de pigmentos extraídos de la hoja de *T. catappa*.

4.4.1. Separación cromatográfica en capa fina.

Para identificar los pigmentos de hoja de *T. catappa* se llevó a cabo la separación cromatográfica en capa fina tomando en cuenta los R_f de las muestras y comparándolos con los de estándares de carotenoides así como los reportados en la literatura.

Los pigmentos extraídos de acuerdo a la metodología mencionada, se evaporaron a vacío a 40°C. Se realizaron separaciones por cromatografía en capa fina, empleando placas de silicagel G 250, (Baker, Phillipsburg, Nueva York), con indicador de fluoresceína de 20X20 cm y 10X5 cm activadas a 100°C (Weissenberg y col., 1997) probando diferentes fases móviles (Tabla 8) de acuerdo al método reportado por (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993; Chiralt y col., 1990a)

Tabla 8. Sistemas de disolventes empleados para separación de pigmentos por cromatografía en capa fina.

fase móvil	Proporción
Eter de petróleo-acetona- cloroformo	50:50:40
Acetato de etilo-agua- metanol	10:2:1
Hexano-acetato de etilo-etanol-acetona	95:3:2:2
Hexano-acetato de etilo	50:50

En una primera parte las separaciones se realizaron con extractos procedentes de diferentes concentraciones de disolventes empleadas en su extracción y las fases móviles éter de petróleo-acetona-cloroformo denominado disolvente A y con acetato de etilo- agua- metanol como disolvente B.

En una segunda parte se utilizó para la separación el extracto procedente de hexano-acetona 60-40 con las fases móviles hexano-acetato de etilo-etanol-acetona y hexano-acetato de etilo, como lo muestra la Tabla 8.

Además se realizaron separaciones con muestras saponificadas y no saponificadas, teniendo como referencia estándares de carotenoides licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, 8'-apocarotenal, cantaxantina, zeaxantina y luteína, proporcionados por Hoffman-Laroche (Bessel, Suiza).

4.4.2. Separación cromatográfica en columna por adsorción en sistema a baja presión (Columna abierta).

Los extractos concentrados fueron purificados y separados en una columna de 250 mm X 10 mm rellena de silicagel G 250, 40-140 mallas (Baker, Phillipsburg, Nueva York), se utilizó la fase móvil Hexano-acetato de etilo 50:50 de acuerdo a la experiencia realizada en cromatografía en capa fina. Se recolectaron fracciones entre 20 y 30 mL a la salida de la columna, teniendo una velocidad de flujo de 0.6 mL/min, a una temperatura alrededor de 20°C a los que se les determinó su espectro de absorción (Adewusi y Bradbury, 1993; Marcano y Hasegawa, 1991).

4.4.3. Separación e identificación de compuestos por cromatografía líquida.

Para la identificación de los compuestos carotenoides del pigmento de *T. catappa* se utilizaron estándares de licopeno (I), β -caroteno (III), γ -caroteno, 8'-apocarotenal, cantaxantina (IX), zeaxantina (VII) y luteína (V), proporcionados por Hoffman-Laroche (Bessel, Suiza).

Volúmenes de 20 μ L fueron inyectados en un sistema de cromatografía de alta presión (HPLC) (Waters, Milford, Massachussetts) modelo 2487 acoplado a un detector de arreglo de diodos modelo 996 y un controlador programador 600, integrados con el software Millenium[®]³²

Se utilizó una columna de fase inversa C18, Symmetry^{MR} con tamaño de partícula de 5.0 μ m y 4.6 mm de diámetro interno por 250.0 mm de largo (Waters Milford, Massachussetts). Para proteger la columna se empleó una precolumna del mismo material (50.0 mm de largo por 4.0 mm de diámetro interno); el detector se operó a 450 nm, misma longitud de onda en la que se obtuvo el cromatograma.

Se probaron diversas condiciones de fases móviles basadas en acetona-agua, metanol-acetonitrilo-agua (Mínguez y Hornero., 1993; Bhaskarachary, 1995; Nyambaka, 1996) en condiciones isocráticas y en gradiente variando las

concentraciones de tiempos y velocidad de flujo, hasta encontrar las mejores condiciones, las cuales se indican en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del método de gradiente en HPLC empleado en la detección de carotenoides.

Tiempo (min)	Flujo (mL)	% agua (A)	% acetona (B)
Inicial	1.5	25	75
10	1.5	25	75
15	1.5	25	75
20	1.5	5	95
27	1.5	5	95
32	1.5	0	100
37	1.5	25	75

Se realizaron curvas patrón de los diferentes estándares basándose en áreas de pico-concentración. La identificación de los picos se llevó a cabo a través de la inclusión de un estándar a la muestra.

En las etapas de extracción y separación cromatográfica se identificó la presencia de compuestos flavonoides, los cuales fueron verificados extrayendo los pigmentos con mezcla de disolventes hexano-acetona 30:70, evaporados a vacío a 40°C, en un rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) y redisolviendo en metanol.

Se realizaron los espectros de absorción y los pigmentos purificados fueron separados por HPLC en columna Novapack C₁₈, con los gradientes y tiempos de elución indicados en la Tabla 10 empleando como fase móvil, metanol-agua y con la metodología similar a la empleada en la separación de carotenoides. Se empleó quercetina (XX), (Sigma, St. Louis, E.U, A.) como patrón de referencia y leyendo a una longitud de onda de 370 nm.

Tabla 10. Condiciones del método de gradiente en HPLC empleado en la detección de flavonoides.

Tiempo (min)	flujo(mL)	% agua (A)	% metanol (B)
Inicial	1.5	25	75
10	1.5	25	75
15	1.5	25	75
20	1.5	5	95
27	1.5	5	95
32	1.5	0	100
37	1.5	25	75

4.5. Pruebas de estabilidad en el extracto.

La estabilidad de los pigmentos fue probada en extractos puros almacenados bajo las siguientes condiciones: adición de antioxidante (BHT al 0.1% P/P) y sin antioxidante, condición con y sin iluminación así como en presencia y ausencia de

aire, temperaturas de 4°C, 25°C y 40 °C. Una condición de almacenamiento a 62°C fué probada únicamente en oscuridad.

Las pruebas de iluminación se realizaron usando una lámpara circular de 21 cm de diámetro de 22 W (Phillips) Mod TLE a 300 mm de distancia de las muestras, 1105 lm, y las de oscuridad fueron almacenadas en frascos ámbar, adaptando metodologías anteriores (Baublis y col., 1994). Todas las muestras fueron almacenadas en condiciones atmosféricas y de nitrógeno. El contenido total de carotenoides se expresó como β -caroteno y fue analizado a los cero, 10, 20 y 30 días de almacenamiento, con 4 repeticiones los valores obtenidos se analizan en los resultados.

Las muestras se asignaron en forma completamente al azar con arreglo factorial de $2^2 \times 4^2$ (Ambiente, adición de antioxidante, iluminación, temperatura y tiempo de almacenamiento). Los resultados fueron analizados con el software Statistica Versión 5, Statsoft (Gorodo, 2000; Nuncio, 2000).

4.6. Pruebas de estabilidad del pigmento adicionado a un aceite comestible.

Se probó la estabilidad de los pigmentos extraídos con la mezcla de disolventes hexano-acetona (70:30), los cuales fueron evaporados a sequedad en un rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) a 40°C, y redisoluidos en etanol. Posteriormente fueron

añadidos en aceite de ajonjolí (*Sesamum orientale L.*) (Muñoz y col, 1996) el cual fue extraído en el laboratorio por el método de Soxhlet, empleando hexano como disolvente.

Las muestras fueron sometidas a tratamientos similares a los indicados en la sección 4.5 utilizando antioxidante, luz-oscuridad, y temperaturas de 4°C, 25°C, 40°C y 62°C, ampliando el período de almacenamiento a 50 días. Los resultados fueron analizados con el software Statistica Versión 5, Statsoft (Gorodo,2000; Nuncio, 2000).

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1. Recolección y selección de material vegetal.

Los extractos obtenidos del material vegetal seleccionado mostró las características que se resumen en la Tabla 11. La flor de macuilís (*Tabebuia rosea*) es un árbol muy abundante con una flor color violeta pálido, que crece en el estado de Tabasco en los meses de marzo y abril. Al extraer los pigmentos con una mezcla de acetona y etanol, el extracto produjo un intenso color violeta uva, sin embargo éste se oxida rápidamente cuando está en solución acuosa, tornándose café. La Figura 15 muestra el espectro de absorción obtenido en el extracto de macuilís con acetona, obteniendo una longitud de onda máxima a 352 nm, con una curva similar a la de los flavonoides (Gordon y An, 1995).

Tabla 11. Características de los pigmentos extraídos a partir de especies vegetales.

Especie vegetal	Extracción con disolventes				Color	Estabilidad	Intensidad
	Acetona	Etanol	Hexano	Agua			
Macuilís	X	X	-	-	Violeta	Inestable	Alta
Croto	X	X	-	-	Rojo	Se oxida	Baja
Amarillo	X	X	X	-	Amarillo	Decolora	Baja
Sasafrán	-	X	-	X	Amarillo	Estable	Alta
Almendro	X	-	X	-	Amarillo	Estable	Alta
Matalí	X	X	-	X	Violeta	Decolora	Baja
Maguey	X	X	-	X	Violeta	Decolora	Baja
Guayacán	X	X	X	-	Amarillo	Se oxida	Baja
Copa de oro	X	X	-	-	Amarillo	Inestable	Media
Crucetilla	X	X	-	-	Amarillo	Inestable	Media

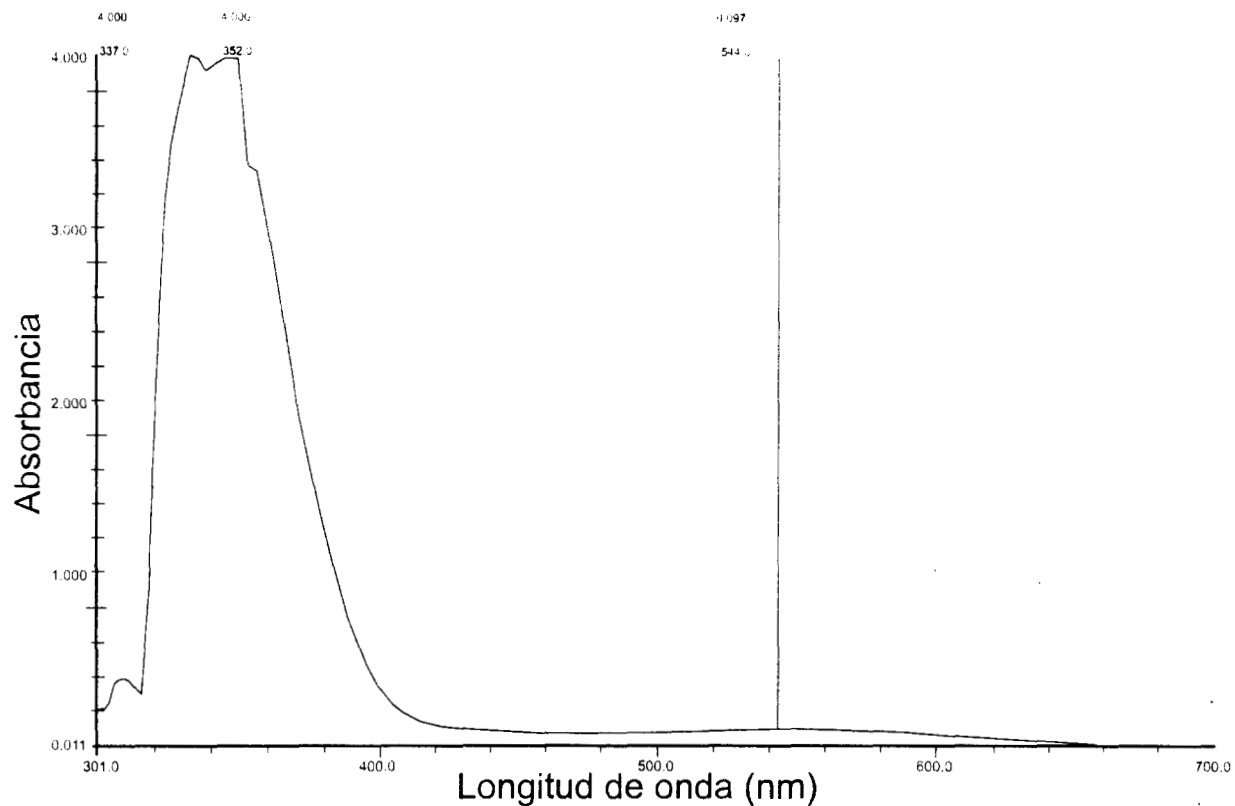


Figura 15. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de flor de macuilis (*Tabebuia rosea*), en acetona.

El croto (*Codiaeum variegatum*) es un arbusto de hojas rojizas del cual se extrajeron sus compuestos coloridos con acetona, obteniéndose un color rojo tenue cambiando a violeta. Sin embargo su estabilidad fué muy pobre con tendencia a la decoloración con la luz. El pigmento no se pudo extraer con etanol. La Figura 16 muestra el espectro de absorción con una longitud de onda máxima a 346 nm, en el rango de los flavonoides (Marcano y Hasegawa, 1991).

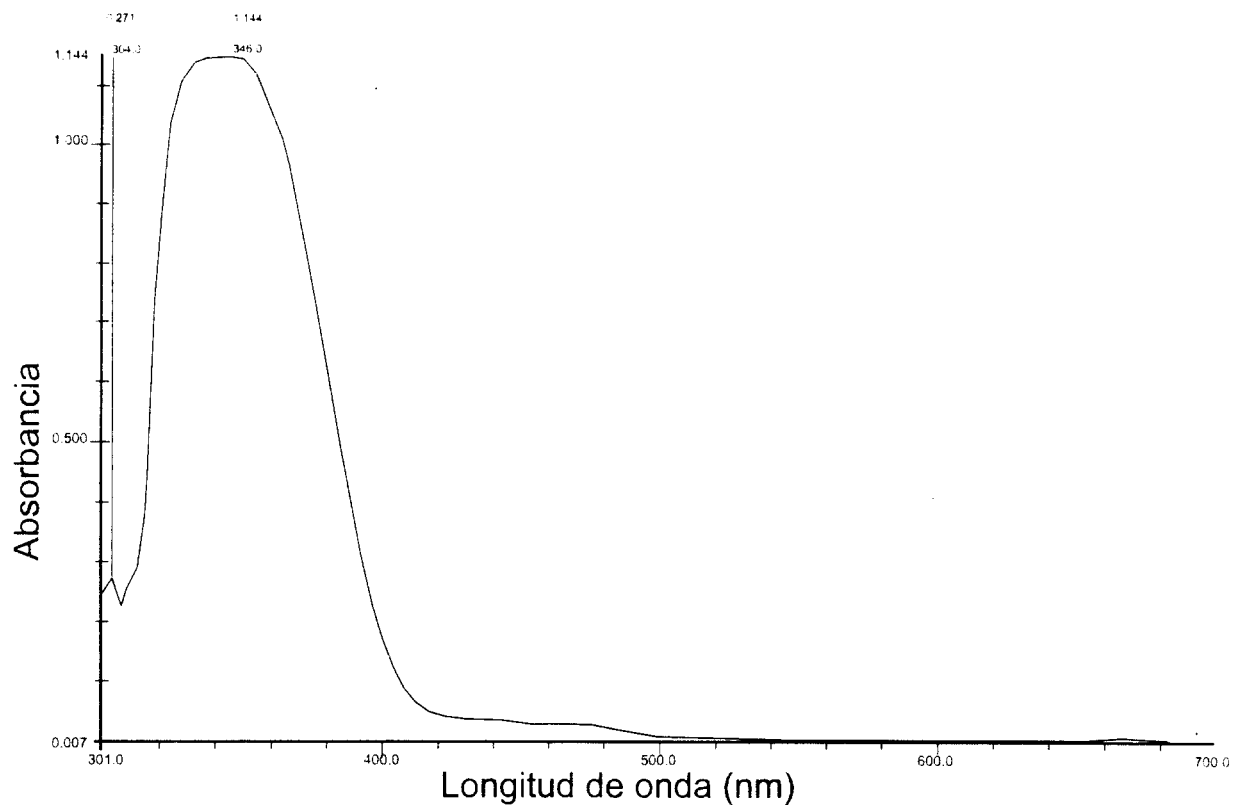


Figura 16. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de croto (*Codiaeum variegatum*) en acetona.

El sazafrán (*Curcuma longa*) presentó una excelente coloración amarilla extrayéndose como una oleorresina con etanol y agua, lo que permite concluir que se trata de compuestos que pertenecen al grupo de fenil propanoides (Marcano y Hasegawa, 1991) La Figura 17 muestra el espectro típico de curcuminoides a longitud de onda máxima de 424 nm (Rouseff, 1998; Henry y Houghton, 1996)

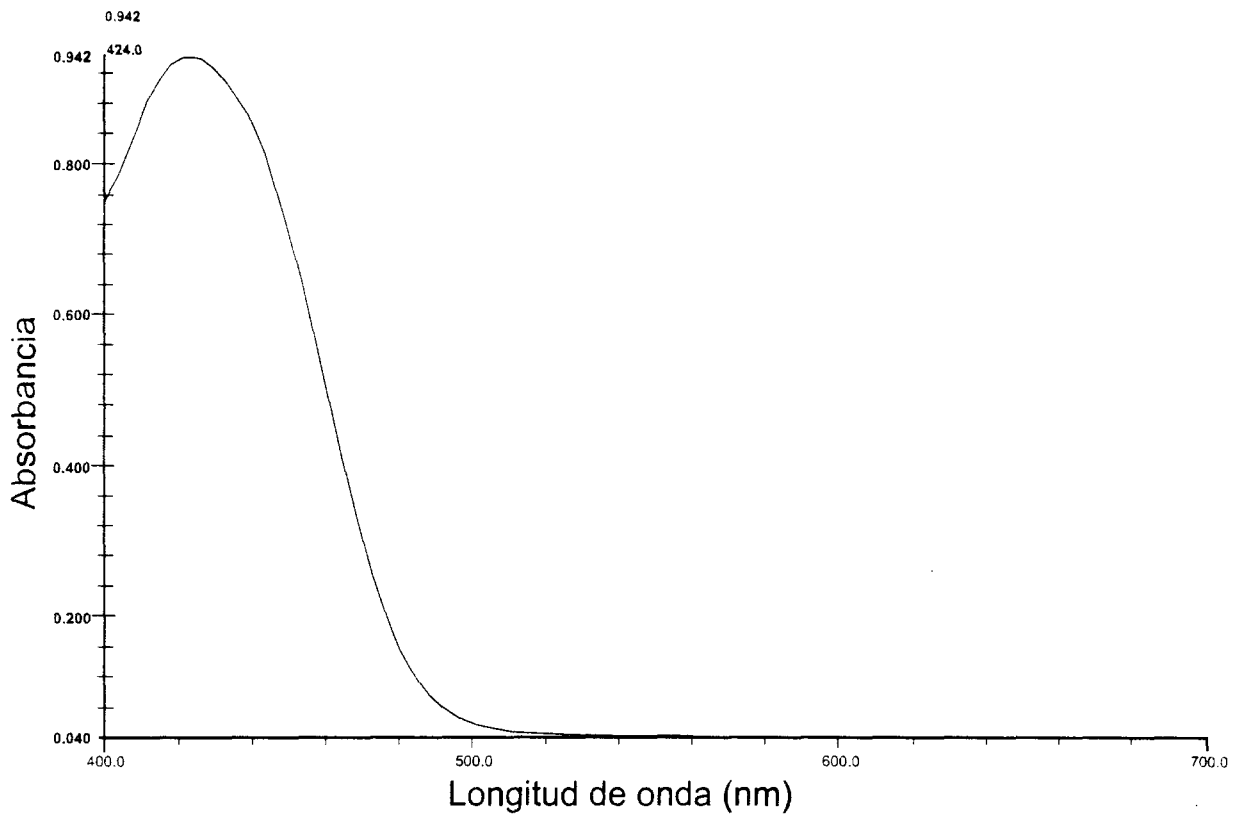


Figura 17. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de sazafrán (*Cúrcuma longa*) en etanol absoluto.

El matalí (*Tradescantia zebrina*) es una planta rastrera de color morado empleada para preparar bebidas refrescantes, al extraerse con acetona y etanol, dió un color ligeramente violeta que se degradó con la luz. La Figura 18 muestra el espectro de absorción del extracto en acetona con máximos a 328 nm característico de flavonoides, a 433 nm de carotenoides y 664 nm para clorofilas (Marcano y Hasegawa, 1991), no obstante Baublís y col., (1994), reportan antocianinas a pH ácido con valor de longitud de onda máxima a 545 nm.

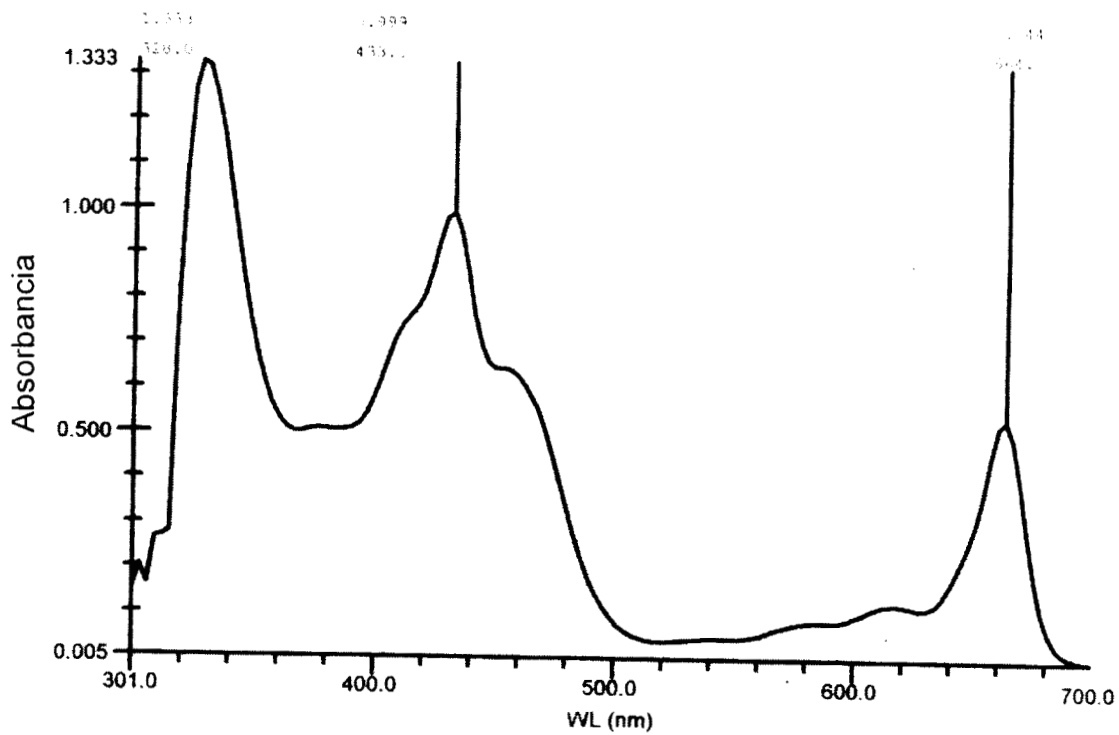


Figura 18. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de matalí (*T. zebrina*) hoja de en acetona

Los pigmentos del maguey morado (*Tradescantia spathacea Sw*) fueron solubles en agua dando una coloración morada, muy inestable que tendió a decolorarse rápidamente debido posiblemente a la presencia de antocianinas. Por otra parte, el color sólo se encuentra en la superficie de las hojas ya que al solubilizar la capa colorida apareció la hoja de color verde; al extraer ésta capa con etanol el extracto es de color verde, debido a la presencia de clorofilas. El espectro obtenido es muy semejante al del matalí (*Tradescantia zebrina*) con $\lambda_{\text{máx}} = 331$ nm característico de los flavonoides (Figura 19). Se observaron también máximos a 436 nm de carotenoides y 664 nm correspondientes a clorofilas (Marcano y Hasegawa, 1991), así como a 544 nm y 589 nm dentro de los cuales quedan incluidas las antocianinas (Baublis y col., 1994)

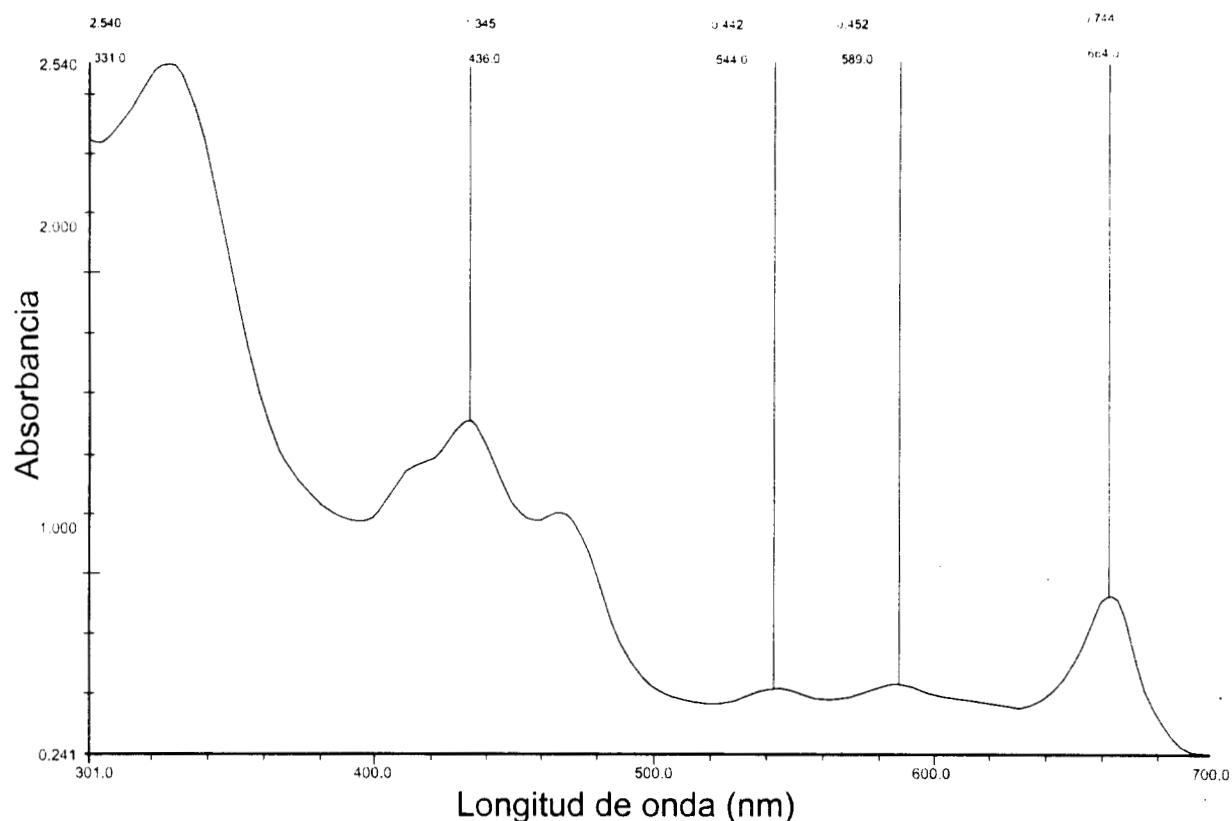


Figura 19. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de maguey morado (*Tradescantia spathacea* Sw), en etanol.

El matalí (*Tradescantia zebrina*) y el maguey morado (*Tradescantia spathacea* Sw), presentaron un comportamiento similar entre sí (Figuras 18 y 19), en la extracción dando la misma coloración con los disolventes empleados etanol y acetona. Los espectros obtenidos fueron también semejantes con valores de $\lambda_{\text{máx}}$ 328 nm para matalí (*T. zebrina*) y 331 nm para maguey morado (*T. spathacea*) correspondiente a los flavonoides (Gordon y An, 1995). De éstos compuestos se pueden derivar antocianinas, muy inestables al pH, luz y temperatura (Sarni-Manchado y col., 1996;

Giusti y Wrolstad, 1996). El color original de estas plantas recuerda al de las uvas rojas, frutos ricos en antocianinas (Sarni-Manchado y col., 1996). Asimismo el macuilís produjo una coloración violácea y datos espectrales característicos de flavonoides por lo que podría concluirse que se trata de éstos compuestos, aunque la intensidad del color fué muy baja.

El guayacán (*Tabebuia guayacán*), es un árbol estacional que da flores de color naranja (Figura 20). Al extraer sus compuestos con hexano-acetona (70:30) se obtienen dos fracciones, una oleosa de color amarillo intenso y un sedimento rojo, el cual al disolverse en agua produce un color café rojizo. Por otro lado al extraerse con acetona, se obtuvo un color amarillo naranja, debido posiblemente a la presencia de flavonoides. Cuando los pigmentos de la flor se extrajeron con hexano se obtuvo un color amarillo intenso, con un espectro de absorción similar al del extracto de las hojas rojas y amarillas de almendro (*Terminalia catappa*) con $\lambda_{\text{máx.}}$ de 439 nm, característicos de los carotenoides (Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998).

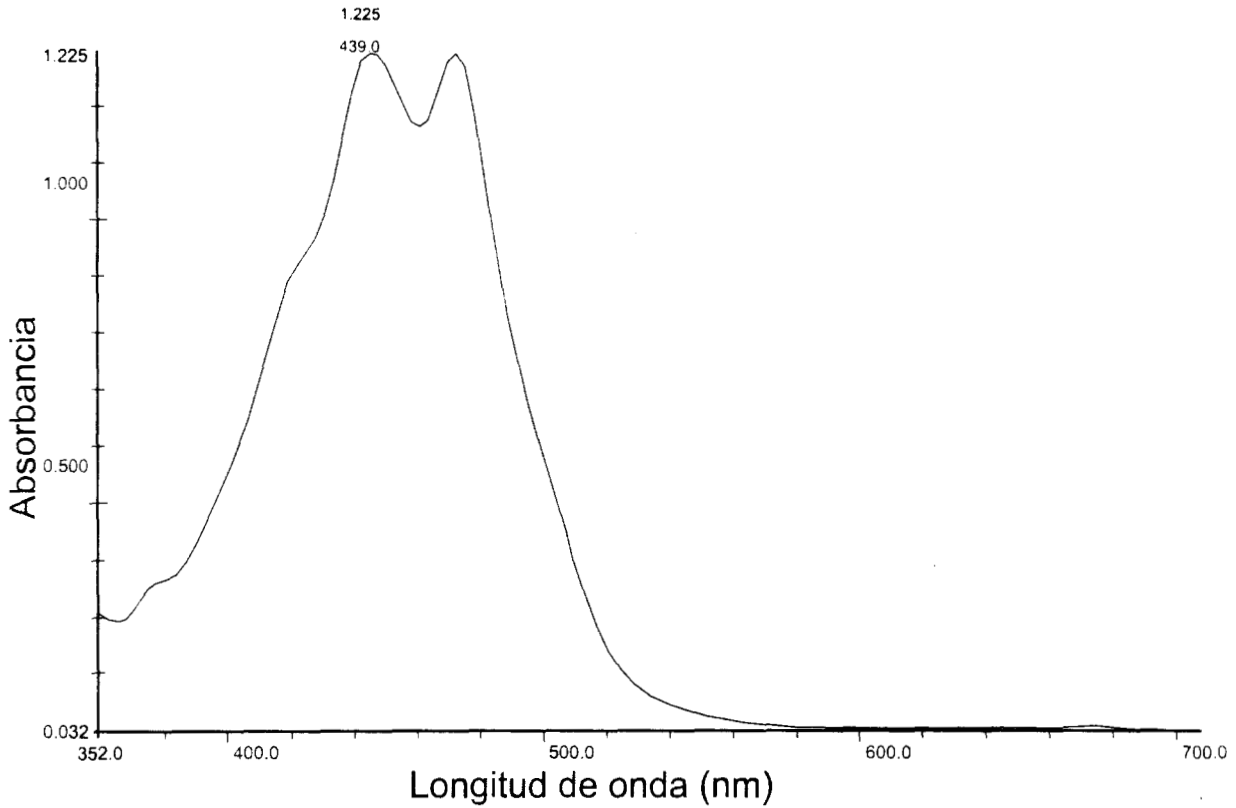


Figura 20. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de flor de guayacán (*Tabebuia guayacán*) en acetona.

La copa de oro (*Solandra grandiflora*), es una flor de ornato color amarillo. Los pigmentos se solubilizaron fácilmente en acetona dando un color amarillo canario cristalino; en solución acuosa los pigmentos produjeron el mismo color pero con presencia de turbidez. La Figura 21 muestra el espectro de éste extracto en etanol con $\lambda_{\text{max}} = 439 \text{ nm}$, característica de carotenoides. (Mouly y Col., 1999).

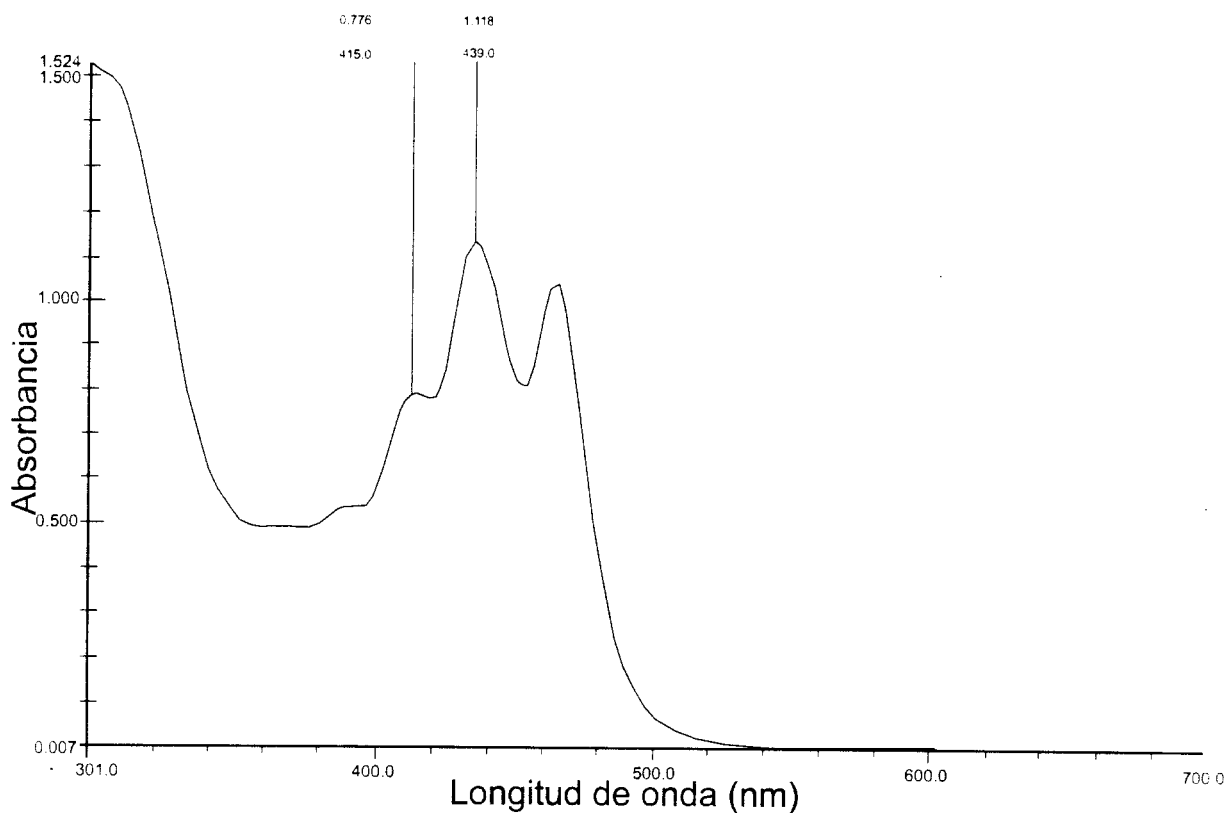


Figura 21. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de flor copa de oro (*Solandra grandiflora*) en etanol absoluto.

El color extraído de la hoja amarilla de crucetilla (*Randia aculeata*) dió una coloración amarilla intensa tanto con etanol como con acetona; con hexano la extracción no fue eficiente ya que se extrajeron primero sustancias lipídicas incoloras en las que el colorante prácticamente fué insoluble. La Figura 22 muestra el espectro del extracto

con acetona característico de carotenoides con $\lambda_{\text{max}} = 442 \text{ nm}$ y flavonoides con $\lambda_{\text{max}} = 328 \text{ nm}$ (Lewis y col., 1998).

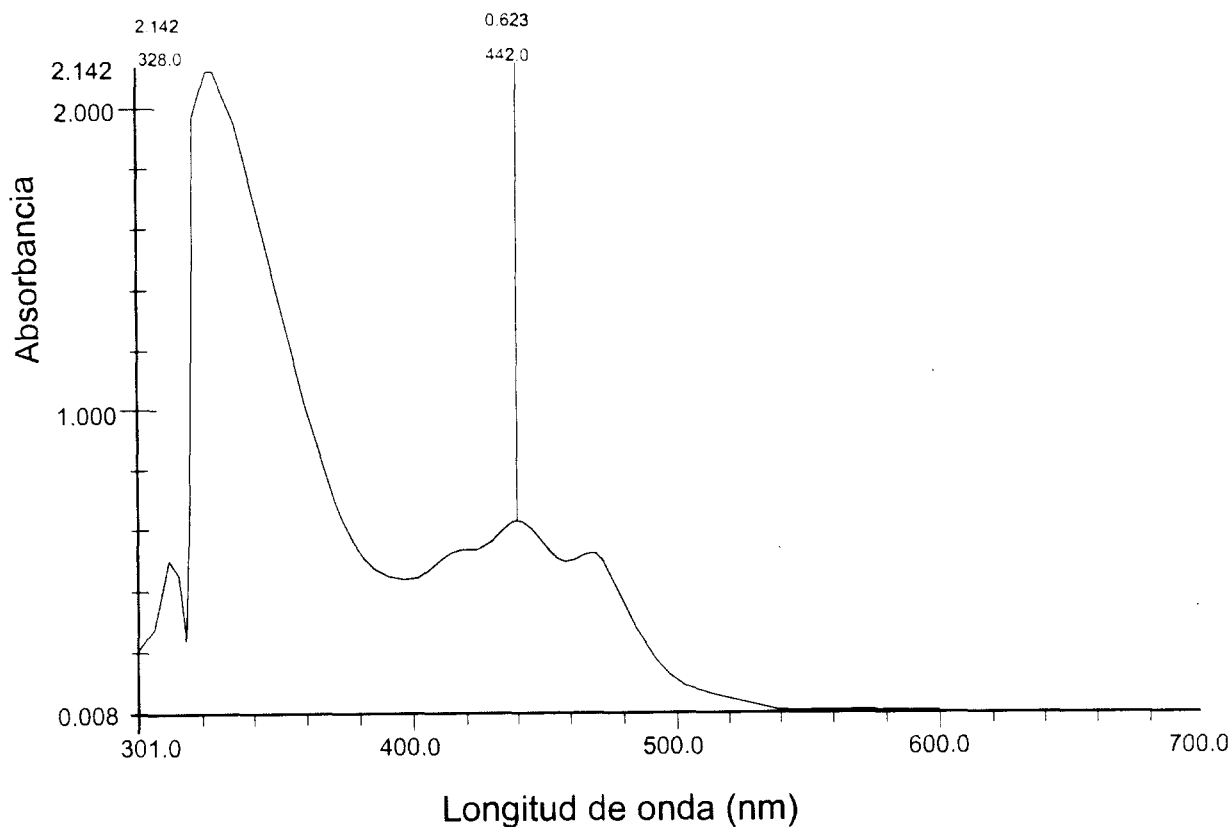


Figura 22. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja de crucetilla (*Randia aculeata*) en acetona.

De las hojas de amarillo ó "cashán" (*Terminalia amazonia*), se obtuvieron pigmentos de un amarillo intenso al extraer con etanol y acetona pero no con hexano posiblemente debido a la presencia de un alto contenido de flavonoides. La Figura 23 muestra el espectro, en el cual se observaron dos máximos característicos para longitud de onda máxima de 439 nm que representa a los carotenoides y longitud de onda máxima de 352 nm característico de flavonoides (Gordon y An, 1995).

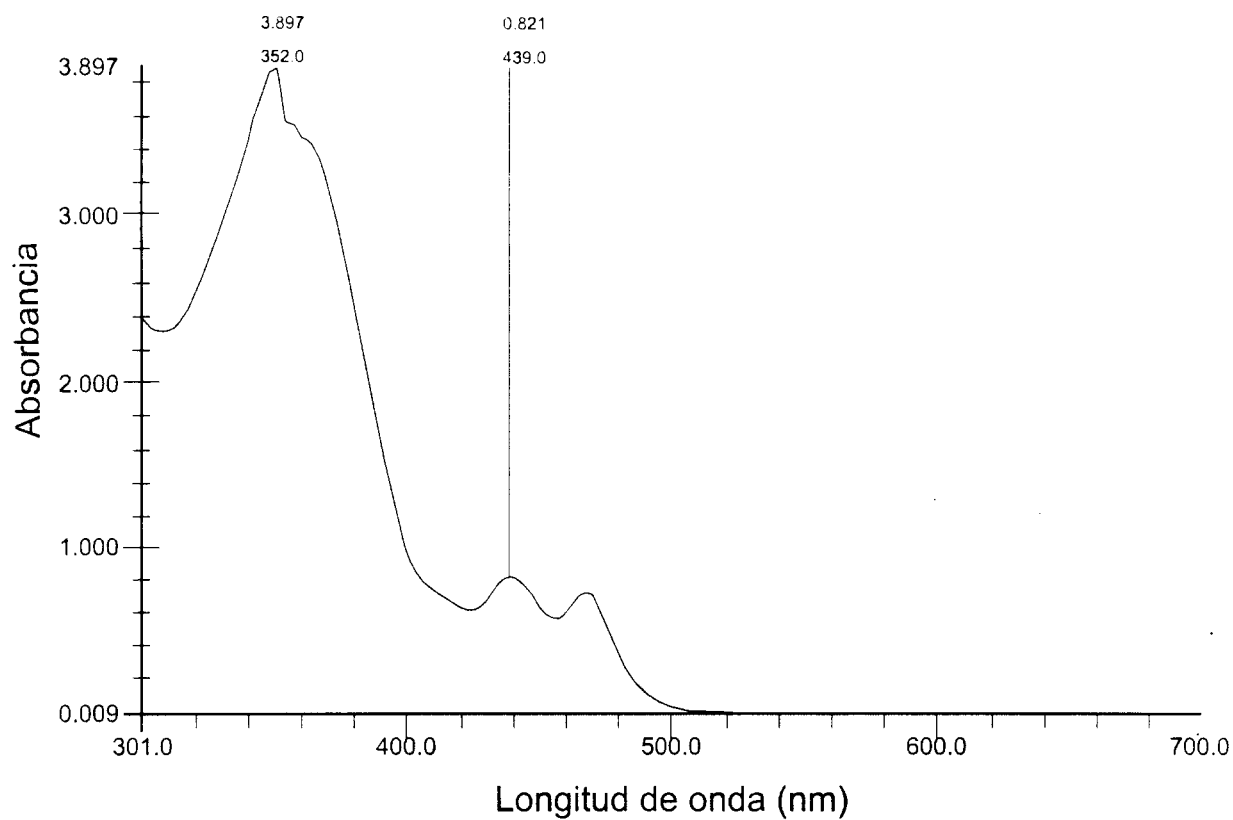


Figura 23. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de amarillo ó "cashán" (*Terminalia amazonia*), en acetona.

El almendro (*Terminalia catappa*) es un árbol que se encuentra en abundancia en el estado de Tabasco y es muy solicitado por sus hojas grandes y la sombra que da. Su coloración verde se torna amarilla y/o roja impartiendo coloraciones al paisaje. A ésta planta se le extrajeron los pigmentos de hojas rojas y amarillas, resultando el hexano y la acetona como los mejores disolventes. El color del extracto de hojas amarillas fue de éste mismo color, sin embargo la hoja roja dio un extracto ligeramente rojizo que rápidamente se degradó a amarillo, posiblemente debido a la

presencia de antocianinas las cuales son inestables a la luz, pH y temperatura (Giusti y Wrolstad, 1996). Los pigmentos extraídos de ambas hojas presentan una $\lambda_{\text{máx}}$ de 442 nm los cuales corresponden a carotenoides (Hadden y col., 1999). La Figura 24 muestra un espectro característico de carotenoides a longitud de onda máxima de 442 nm.

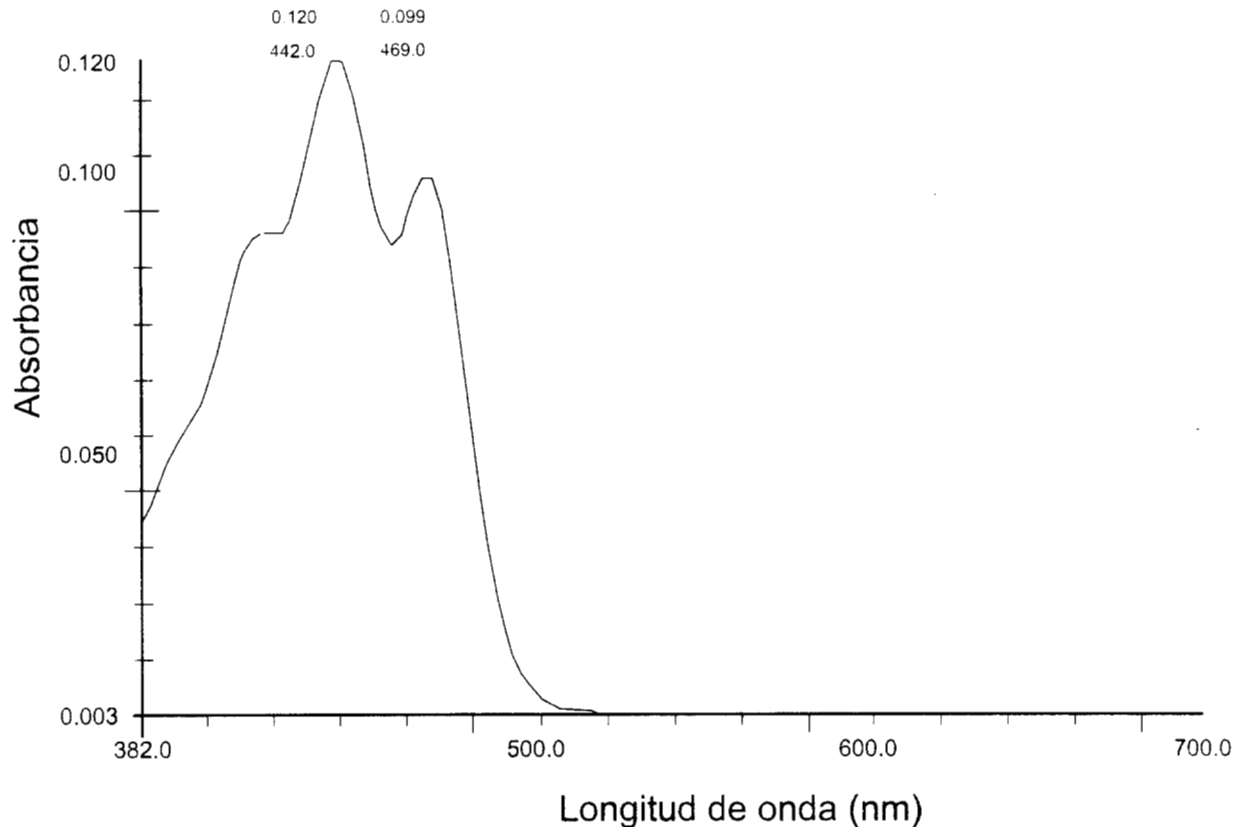


Figura 24. Espectro de absorción UV-VIS de extracto de hoja amarilla de almendro (*Terminalia catappa*) en hexano.

De acuerdo a los resultados obtenidos, facilidad de obtención y abundancia de materia prima, presunción de la presencia de compuestos carotenoides, coloración y

estabilidad aparente de los pigmentos, se seleccionó al almendro (*T. catappa*) como el material vegetal a emplear en el presente trabajo.

5.2. Selección de los parámetros de extracción tiempo-disolventes.

5.2.1. Primera etapa de extracción.

Seleccionado el almendro (*T. catappa*) como materia prima, se estudiaron las hojas de color amarillo y rojo empleando como disolventes las mezclas mencionadas en la Tabla 7.

Se obtuvieron los correspondientes espectros de absorción entre 300 y 700 nm, encontrándose el espectro que se muestra en la Figura 25, típica de carotenoides, con 3 máximos (421, 445 y 472 nm), coincidiendo con los resultados reportados por otros autores (Chiralt y col., 1990a; López-Hernández y col., 1993; Chen y Chen, 1993). Sin embargo, se encontró también un máximo a 370 nm, posiblemente debido a la presencia de flavonoides y otro a 667 nm, correspondiendo posiblemente a clorofilas (Gordon y An, 1995).

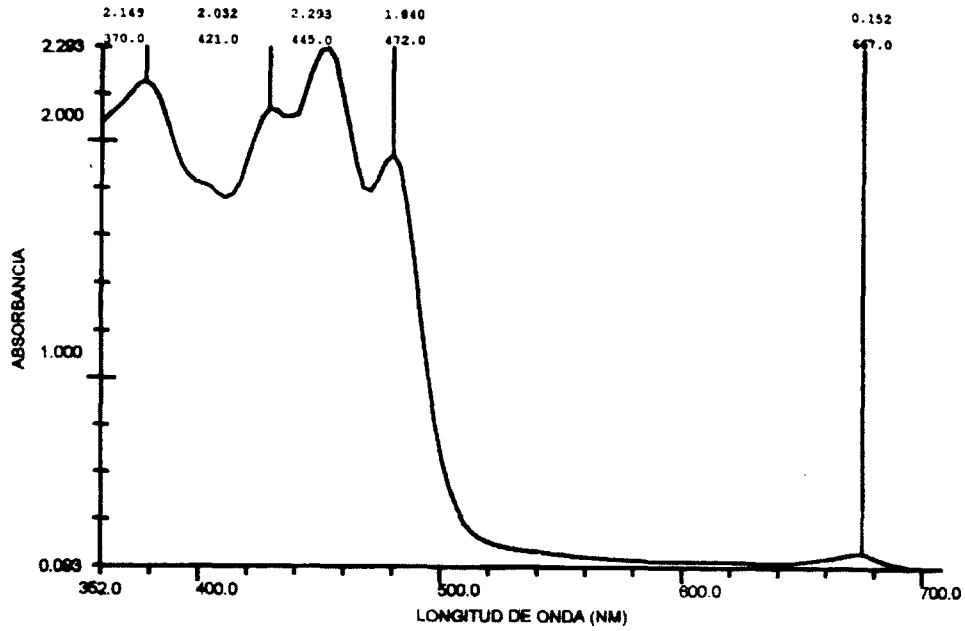


Figura 25. Espectro de absorción UV-VIS del extracto de las hojas de almendro (*Terminalia catappa*) donde se observan flavonoides, carotenoides y clorofila.

Los sistemas de disolventes se muestran en la Tabla 12; la eficiencia de extracción, expresada como absorbancia para estos, se grafican en la Figura 26.

Tabla 12. Longitud de onda máxima obtenida en el espectro de absorción UV-VIS de β -caroteno en diversas mezclas de disolventes.

Clave	Mezcla de Disolventes	λ máx (nm)
Z	Acetona-éter de petróleo (50:50)	430, 442, 469
W	Acetona (100)	430, 439, 469
Y	Acetona-isopropanol(50:50)	430, 442, 469
V	Acetona-etanol(50:50)	430, 442, 469
X	Hexano-acetona-etanol-tolueno(10:7:6:7)	430, 445, 469

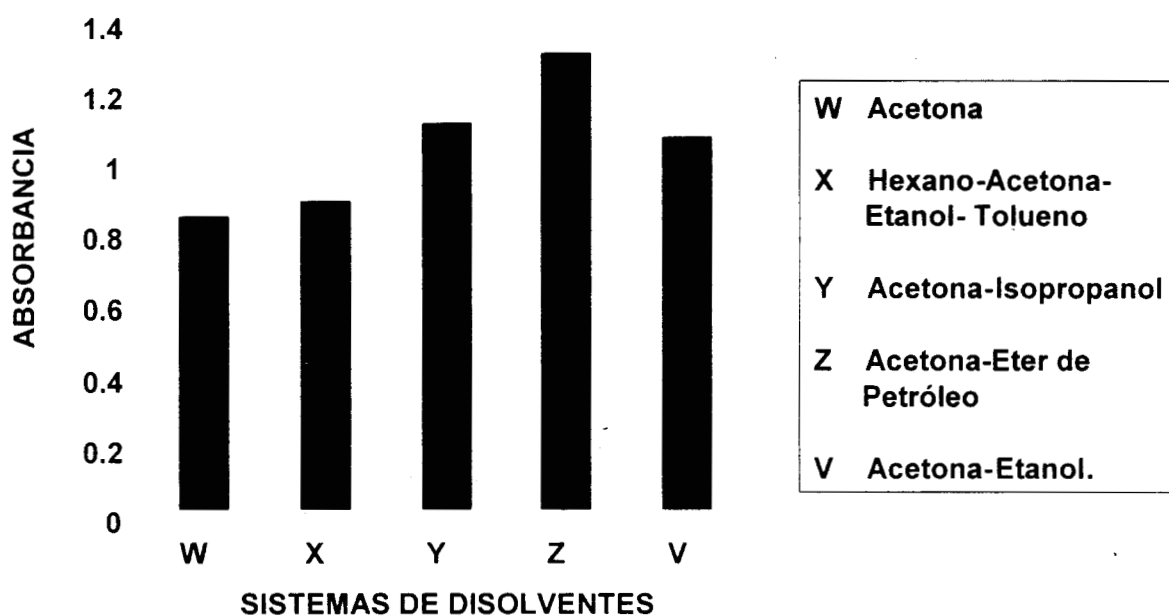


Figura 26. Eficiencia de extracción obtenidas con los sistemas de disolventes estudiados

Al llevar a cabo extracciones empleando disolvente acetona (W) en la hoja amarilla, se observaron dos máximos a 445 y 472 nm, de forma similar a los de las extracciones de la hoja roja. Las extracciones realizadas con la mezcla de disolventes hexano-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7), (X) mostraron un comportamiento similar tanto para la hoja roja como para la amarilla encontrándose valores de longitud de onda máxima a 445 y 469 nm; igual comportamiento se manifestó en la extracción con la mezcla de disolventes acetona-isopropanol (50:50), (Y) en el que los máximos de absorción fueron 442 y 469 nm tanto para hoja roja como amarilla. Esta similitud en las extracciones se explica en base a la polaridad de los disolventes empleados que tuvieron afinidad por los compuestos carotenoides, debe mencionarse además que la extracción con acetona dio un valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de 370 nm, correspondiendo a flavonoides (Gordon y An, 1995).

En la extracción con la mezcla de disolventes acetona-éter de petróleo (50:50), (Z) se obtuvo un ligero cambio en la absorbancia máxima, teniendo para la hoja amarilla de almendro máximos a 442 y 469 nm y en hoja roja 439 y 469, ésta diferencia probablemente se debió a alguna impureza presente en el extracto. Para la extracción con la mezcla de disolventes acetona-etanol (50:50) (V) se encontró una longitud de onda máxima a 442 y 469 nm tanto en hojas rojas como en amarillas.

Se realizaron además los espectros de estándar de β -caroteno disueltos en las mezclas de los disolventes usados en el proceso de extracción, encontrándose los máximos de absorción en la Tabla 12.

De acuerdo a la polaridad de las mezclas de disolventes empleadas tenemos que la más polar fue la acetona (W) con un valor de 2.8 debyes y la menos polar fue la mezcla hexano-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7), (X), con un valor de 1.12 debyes. Las 3 mezclas restantes, acetona-isopropanol (50:50), (Y), acetona-éter de petróleo (50:50), (Z) y acetona-etanol (50:50) (V), fueron de polaridades parecidas de 2.20, 2.01 y 2.28 debyes, respectivamente, los valores de polaridad fueron calculados a partir de datos reportados (Perry y Chilton, 1983; Sangines y García, 1990; Fessenden, 1983; Devore y Muñoz, 1989), Esta polaridad está en relación con el tipo de molécula extraída, que corresponde a carotenoides (Belitz y Grosch, 1988). En éste experimento, la acetona que fue el disolvente más polar, extrajo menor cantidad de pigmentos carotenoides. En contraste, la mezcla menos polar no fue la que mayores carotenoides extrajo como habría de suponerse. Gordon y An (1982) reportan que no hay relación uniforme entre las propiedades de los disolventes (constante dieléctrica, momento dipolo y el poder de extracción). En nuestros resultados se encontró que la mayor concentración de carotenoides se extrajo con polaridades intermedias.

Por otra parte, al realizar las extracciones generalmente se diferencian en todos los casos dos valores de absorción máxima alrededor de 442 y 469 nm y un tercer pico

poco pronunciado para el cual no se informa su valor, ya que éste tendría que ser interpolado, y daría lugar a errores al ser comparado con todos los espectros obtenidos. Un caso típico se observa en los espectros obtenidos de las fracciones separadas por cromatografía de baja presión. (Sección 4.4.2). Por tanto, aunque se reporten 2 máximos de absorbancia, en la mayoría de los casos los carotenoides presentan 3 picos en la gráfica de absorbancia de los cuáles uno de ellos, al ser poco pronunciado, no es considerado por el instrumento empleado.

De acuerdo con lo anterior, se concluyó que se encontraron pocas diferencias en los espectros obtenidos tanto para hoja roja como amarilla provenientes de los diversos sistemas de disolventes empleados. En el Anexo 1 se muestra el resumen del análisis estadístico realizado en ésta etapa, de este se concluye que no hay diferencia significativa entre los diversos sistemas de disolventes ($\alpha = 0.05$). No obstante la Figura 26 muestra que la mayor eficiencia de extracción se obtuvo con la mezcla acetona-éter de petróleo (50:50) (Z), tanto para hojas amarillas como rojas ya que con ésta mezcla se extrajo la mayor concentración de pigmentos.

Aunque se encontraron pocas diferencias en los valores de longitud de onda máxima para las diversas mezclas de disolventes empleadas, sin embargo hay un desplazamiento de éstos valores. Tales efectos están reportados para compuestos como los carotenoides los cuales presentan dobles enlaces conjugados y al emplear los diversos disolventes en su extracción los radicales adyacentes pueden tener

influencia en la longitud de onda presentándose el efecto batocrómico en el cual la absorbancia máxima cambia de una longitud de onda menor a una mayor sin variar la intensidad, (Watty, 1982). La gran mayoría de los carotenoides existentes en la naturaleza son compuestos totalmente trans; si se crea una configuración cis el máximo se desplaza y aparece una banda secundaria de menor longitud de onda (Belitz y Grosch, 1988).

5.2.2. Segunda etapa de extracción.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 5.2.1 se seleccionó la mezcla de acetona-éter de petróleo (50:50) como la más eficiente en cuanto a cantidad de pigmento extraído. No obstante se diseñó otra mezcla en la que se sustituyó el éter de petróleo por un disolvente de mayor punto de ebullición, polaridad similar, menor costo y mayor disponibilidad industrial. El hexano es un disolvente muy utilizado en la industria de alimentos para la extracción de aceites, su punto de ebullición es de 68°C y el del éter de petróleo, mezcla de hidrocarburos, oscila entre 35-60°C (Sangines y García 1990; Devore y Muñoz, 1989). El hexano, al tener mayor punto de ebullición, resulta menos volátil y da mayor seguridad en su manejo y menos pérdidas por evaporación, siendo más económico. Para evaluar la proporción de los disolventes que se utilizarían se realizaron extracciones con mezclas de éter de petróleo-acetona y hexano-acetona para lo cual se probaron las mezclas en proporciones desde 100:0 hasta 0:100. Se encontró que la mejor proporción para éter de petróleo-acetona fué la de 70:30 y para hexano-acetona de 60:40. Se concluyó que con estas dos mezclas y proporciones la extracción de pigmentos es similar, pudiendo usarse indistintamente cualquiera de ellos. Sin embargo por las razones mencionadas se optó por trabajar con hexano-acetona, además que en ésta proporción requiere menos hexano (60 partes), que la del éter de petróleo (70 partes), los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 27 y 28.

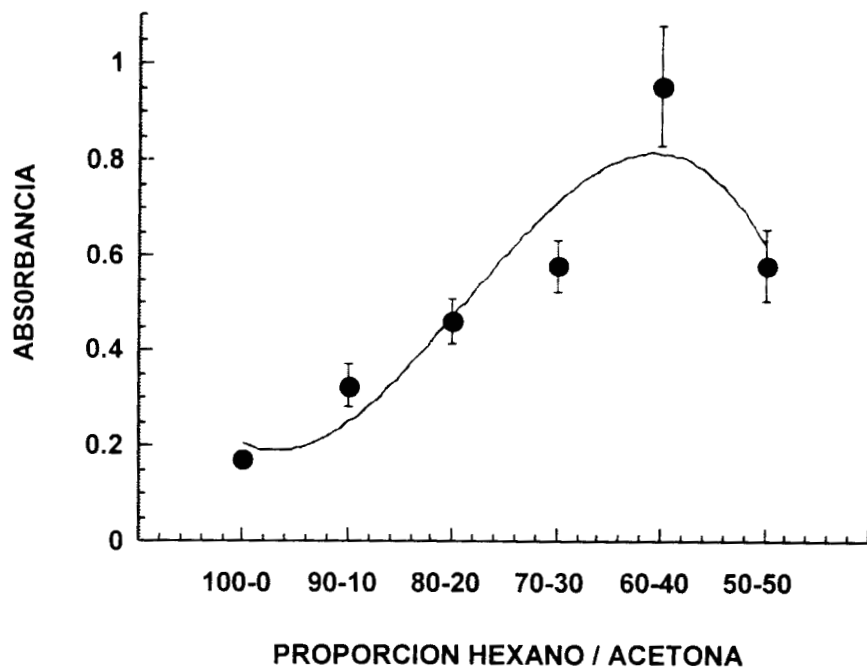


Figura 27. Absorbancia en la extracción de carotenoides con diferentes proporciones de hexano-acetona

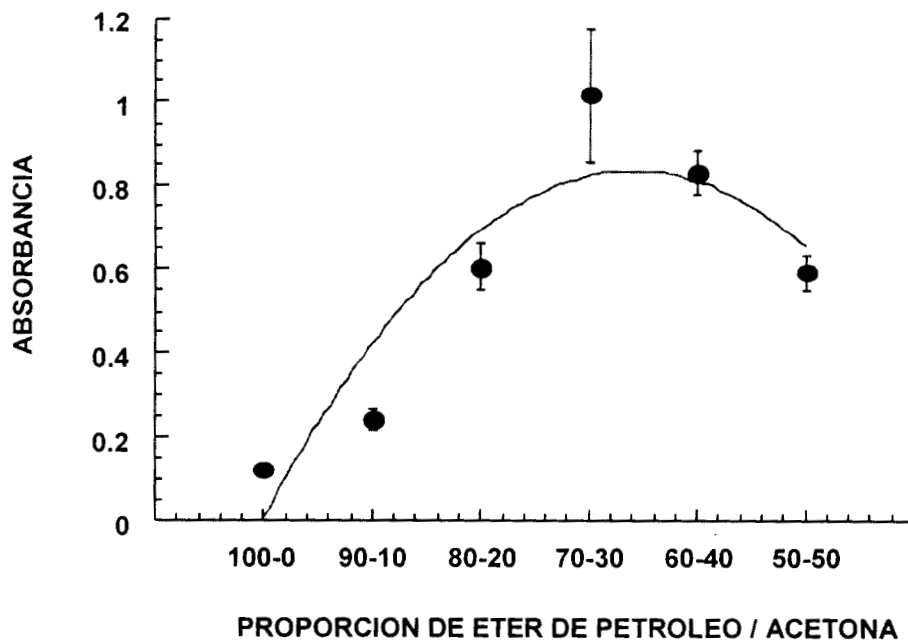


Figura 28. Absorbancia en la extracción de carotenoides con diferentes proporciones de éter de petróleo-acetona

El resumen del análisis de varianza se muestra en los Anexos 1 y 2 encontrando que no existió diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Las proporciones de disolventes con las que se obtuvieron las absorbancias máximas (Figuras 27 y 28) fueron de 60:40 para hexano-acetona y de 70:30 para éter de petróleo-acetona.

Se encontró además que a medida que aumentaba la polaridad de la mezcla de disolventes éter-acetona y hexano-acetona se extraían otros compuestos, que de acuerdo a los máximos de absorción entre 361 y 372 nm, parecían indicar que se trata de flavonoides (Crozier, 1997; Gordon, 1995; Howard, 1996). Los datos fueron expresados en absorbancia como una medida indirecta, ya que sabemos que la absorbancia es proporcional a la concentración (Ley de Lambert - Beer) (Watty, 1982).

Las Figuras 29 y 30 muestran la relación entre la concentración de carotenoides en la hoja amarilla de almendro (*T. catappa*) y la proporción de disolventes para las mezclas hexano-acetona y éter de petróleo-acetona. Esta concentración se expresó mediante la curva estándar de β - caroteno a 450 nm, con la ecuación:

$$y = 0.0283 + 21.343X \quad r = 0.996$$

Ecuación 3

Estas curvas fueron similares a las reportadas en valores de absorbancia, ya que las proporciones de las mezclas éter de petróleo-acetona y hexano-acetona fueron las mismas (60:40 y 70:30, respectivamente), lo que comprueba que se siguió la ley de Lambert y Beer.

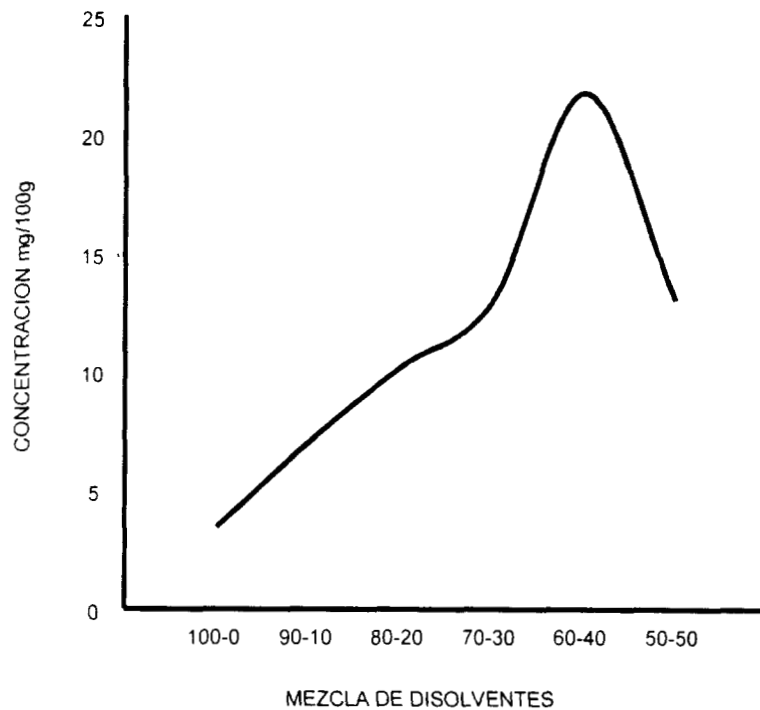


Figura 29. Curva de extracción-concentración de carotenoides con hexano-acetona.

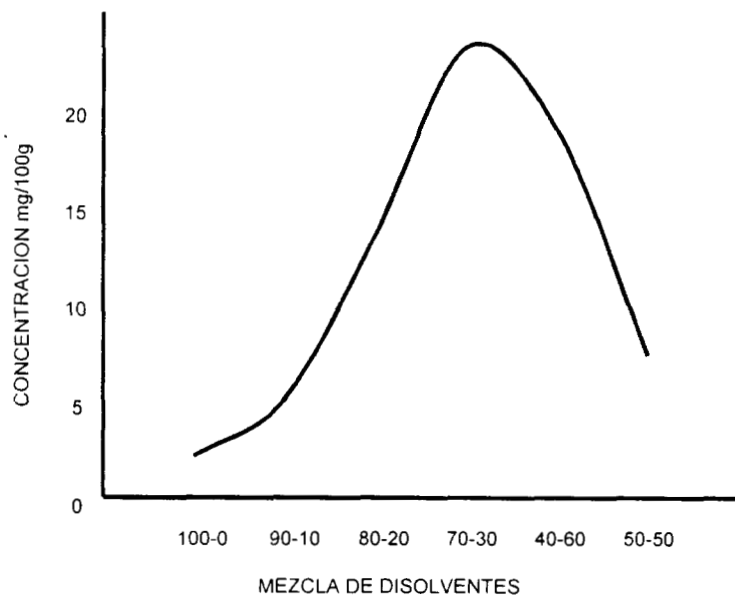


Figura 30. Curva de extracción-concentración de carotenoides con éter de petróleo-acetona.

5.2.3. Saponificación.

La saponificación de los extractos de carotenoides tuvo como objeto eliminar a las clorofilas y a los lípidos indeseables e hidrolizar a los ésteres de carotenoides. La saponificación del extracto se realizó en condiciones menos severas que las reportadas por Yitzhak y col., (1993); Britton y col., (1995), bajando la concentración de potasa metanólica de 50% a 10%, asimismo el proceso se realizó burbujeando nitrógeno en las muestras para hacer menos severa la reacción. Sin embargo, se observó una pérdida de pigmentos de alrededor de un 50%.

Las Figuras 31 y 32, muestran la cantidad de pigmentos carotenoides extraídos, expresados como absorbancia, con los dos sistemas de disolventes a partir de extractos saponificados y no saponificados. Tanto las extracciones con éter de petróleo-acetona como con hexano-acetona en todas sus proporciones, mostraron una menor concentración de pigmento extraído en muestras saponificadas en comparación con las no saponificadas. Esta diferencia fue más drástica a medida que se obtenía mayor eficiencia en la extracción, esto es, en las extracciones con éter de petróleo-acetona (70:30) y hexano-acetona (60:40), en que hubo una disminución de rendimiento de aproximadamente 80%. El bajo rendimiento en la saponificación de extractos de carotenoides ha sido reportado por Lesellier y col., (1993) para cítricos, brócoli, calabaza y pimiento. Este autor recomienda que si la muestra no es rica en clorofilas, es preferible no llevar a cabo una saponificación, ya que durante éste proceso se puede causar aldocondensación de β -8' apocarotenal

con una función cetona. Por otra parte, existen carotenoides sensibles a la saponificación, tales como astaxantina y fucoxantina. Por lo que la saponificación convierte a los acil ésteres de carotenoides en sus correspondientes hidroxicarotenoides. (Khachik y col., 1992). Al realizar la saponificación en extractos de carotenoides se puede ocasionar la destrucción y transformación estructural de algunos de estos pigmentos, entre estos cambios destaca la cis isomerización. Tales efectos fueron reportados por Ng y Tan (1988), y Lietz y Henry (1997). Estos autores encontraron una pérdida significativa de xantofilas particularmente epoxicarotenoides, cuando se llevaban a cabo saponificaciones. Por otra parte Kimura y col., (1990) estudiaron el efecto de saponificación en tomate, col, y papaya, observando que se retenían α , β , y γ apocarotenal así como a licopeno, pero se hidrolizaban completamente los ésteres carotenoles en papaya; no obstante haber aplicado una saponificación suave, también se degradaban luteína, zeaxantina y violaxantina.

Por otra parte la saponificación puede tomar de 1.5 a 2 h y al realizarse reextracciones, concentraciones, lavados y otras operaciones, se puede introducir errores. Tal es el caso reportado en la Sección 5.4.3. en las que en los cromatogramas obtenidos por HPLC de las muestras vegetales saponificadas y no saponificadas en que se observa la pérdida del compuesto carotenoide que sale a los 24.5 min (criptoxantina) en el cromatograma original, pero no se observa posteriormente (Figuras 36 y 37).

Esto comprueba que, además de haber una disminución de carotenoides en la extracción por efecto de la saponificación, existe también la pérdida de compuestos por otras operaciones preparativas y analíticas. Por éstos motivos se optó por eliminar el proceso de saponificación. Si la extracción se realizaba con hojas completamente pigmentadas (totalmente rojas, sin residuos de clorofilas verdes), no se detecta la presencia de clorofilas en los espectros de absorción UV-visible del extracto y por lo tanto no resulta indispensable realizar la saponificación.

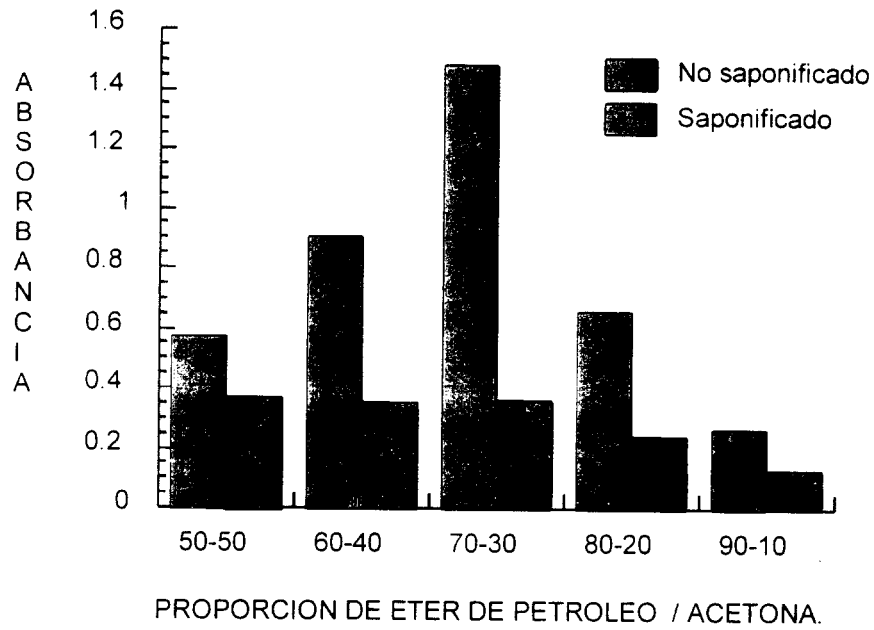


Figura 31. Concentración de carotenoides a partir de muestras saponificadas y no saponificadas con éter de petróleo-acetona.

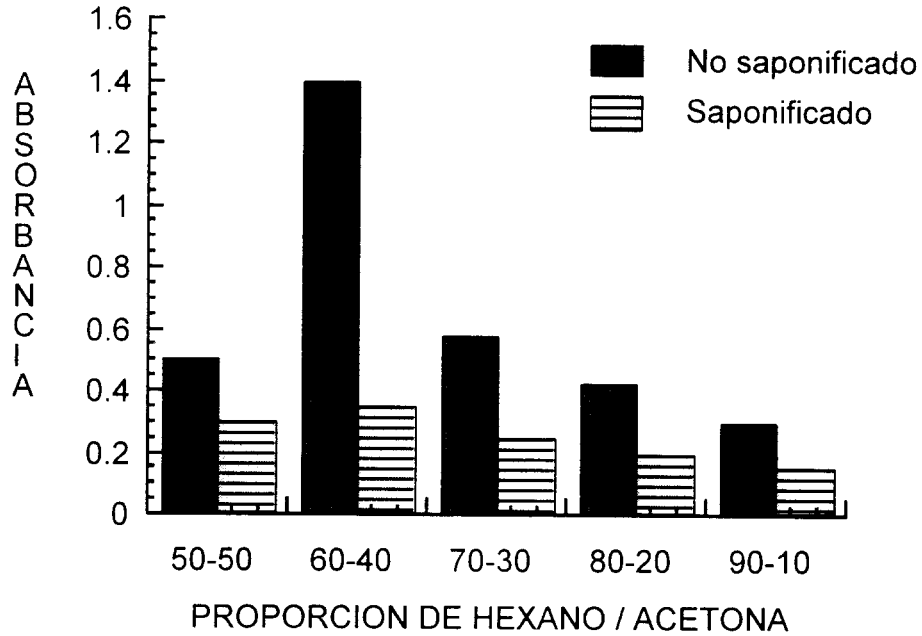


Figura 32. Concentración de carotenoides a partir de muestras saponificadas y no saponificadas con hexano-acetona.

5.2.4. identificación de los grupos de compuestos a que pertenecen los pigmentos extraídos.

Los pigmentos extraídos presentaron espectros de absorción UV-VIS similares a los mostrados en la Figura 25 en los que se obtuvieron máximos de longitud de onda a 421, 445 y 472 nm, característicos de carotenoides, y a 370 nm que corresponde a flavonoides, la extracción de éstos últimos fue favorecida a medida que se incrementó la proporción de acetona en la mezcla de disolventes. Ambos espectros coinciden a los reportados por López-Hernández y col., (1993); Leigh y col., (1999) , en donde el máximo de absorbancia es de 440 a 470 nm y absortividad para carotenoides de $E^{1\%} = 2500$.

Estos valores también coinciden con los obtenidos para estándares de carotenoides (Figura 33) y para flavonoides reportados por Howard (1996) con máximos alrededor de 365 a 370 nm, que concordaron con el espectro de absorción UV-VIS para el estándar de quercetina (Figura 44) en que se presentó un máximo de 370 nm.

Los espectros obtenidos en el extracto no correspondieron con antocianinas, ya que la longitud de onda máxima está en 520 nm, con una absortividad $E^{1\%} = 500$ (Henry, 1996). Tampoco concordaron con los espectros de betalaínas, cuya longitud de onda máxima es de 530 nm y absortividad de $E^{1\%} = 1120$, (Henry, 1996). Sin embargo, en algunas muestras se tuvieron trazas de clorofilas, en los casos en que las hojas

presentaban pequeñas zonas de pigmentación verde, los cuáles presentan máximos desde 644 a 667 nm (Fennema, 1993), intervalo en que se manifiesta la presencia de clorofila a y que esta manifestó en el espectro presentado en la Figura 25.

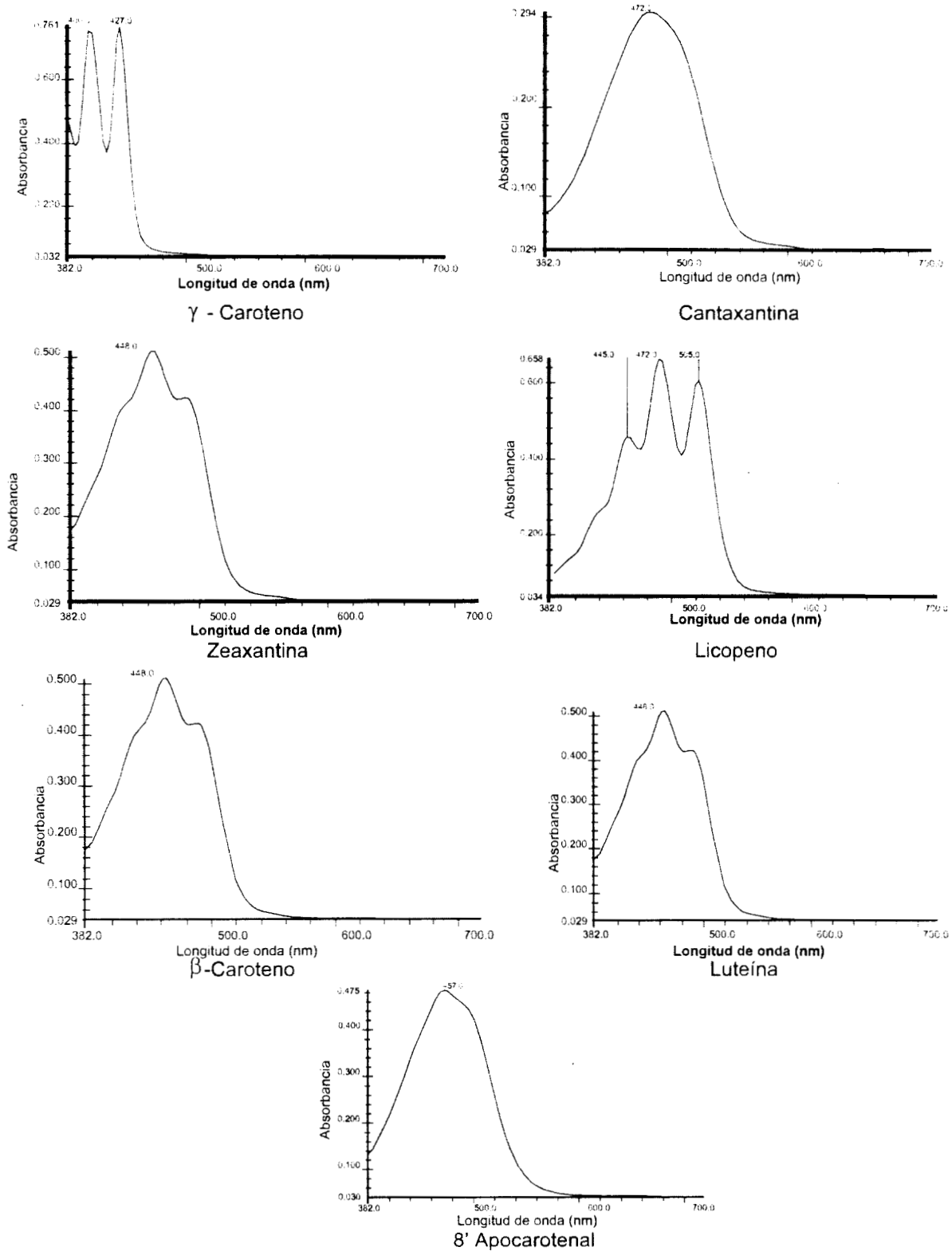


Figura 33. Espectros de absorción UV-VIS de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR}, Bessel Suiza.

5.3. Identificación de compuestos asociados al pigmento.

5.3.1. Análisis fisicoquímico.

Con el fin de encontrar compuestos asociados a los pigmentos que pudieran interferir en la extracción y purificación de los mismos, tales como proteínas y grasas, se realizó el análisis fisicoquímico a la hoja fresca de almendro (*T. catappa*). La Tabla 13 muestra la composición proximal de la hoja de almendro, así como el contenido de carotenoides en mg/100 g de muestra expresados como β -caroteno. Se puede observar que el 91% corresponde a agua y extracto libre de nitrógeno, que en hojas la mayoría de las veces corresponde a celulosas y ligninas. El contenido de proteínas es bajo (5.21%) como ocurre en la mayoría de las hojas en comparación con otros productos vegetales, tales como almendra (*Prunus amygdalus*) (22.5%) o el cacahuete (*Arachis hypogaea*) (23.7%) (Muñoz y col., 1996).

Tabla 13. Composición proximal de la hoja de almendro (*T. catappa*).

Componente	%
Humedad	59.70
Proteínas	5.21
Extracto etéreo	3.72
Extracto libre de nitrógeno	31.37
Carotenoides totales	36.36 mg/100 g

La determinación de proteína se realizó tanto por el método oficial (AOAC, 1990) como por el método más sensible basado en espectrofotometría UV-VIS con el fin de corroborar los valores obtenidos ya que los carotenoides en algunas fuentes están ligados a proteínas (Müller y Schweiser, 1994; Robyt y White, 1990). La ecuación empleada para la determinación de proteínas, utilizando como referencia albúmina de suero bovino a 750 nm, fue la siguiente:

$$y = 0.052 + 0.004153X \quad r = 0.98$$

Ecuación 4

El contenido de grasa total en hoja se consideró bajo (3.72%), por otro lado dentro de éste valor quedan comprendidos los carotenoides de los cuales se obtuvo un valor de 36.36 mg/100 g, lo cual se interpreta como una cantidad considerablemente elevada, comparada con otros vegetales de hojas y frutales tales como lechuga (*Lactuca sativa*) (7.8 mg/100g), cilantro (*Coriandrum sativum*) (15.2 mg/100g), hojas de rábano (*Raphanus sativus*) (12.7 mg/100g), espinaca (*Spinacia oleracea*) (9.8 mg/100g), mango (*Mangifera indica*) (2.21 mg/100 g) o papaya (*Carica papaya*) (2.7 mg/100 g) (Bhaskarachary, 1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los valores de lípidos y proteínas no se consideraron elevados (3.72% y 5.21% respectivamente) por lo que no se consideró importante el estudio de la posible asociación de proteínas con los pigmentos y no pudo comprobarse la interrelación de ellas con los carotenoides. Ya que la hoja

presentó un alto contenido de carotenoides (36.36 mg/100 g) se procedió a continuar con la siguiente etapa de la investigación.

5.4. Separación, purificación e identificación de pigmentos extraídos.

5.4.1. Separación por cromatografía en capa fina (CCF).

Los extractos de hojas extraídos con mezclas de éter de petróleo-acetona en proporciones de 10:90 y 20:80 presentaron un mayor número de compuestos presentes, según se observa en los valores de R_f reportados y obtenidos por TLC (Tabla 14). Se logró una mayor separación de compuestos con la mezcla de disolvente B formado por acetato de etilo-agua-metanol.

Los extractos pigmentantes procedentes de disolventes con mayor polaridad, extrajeron un número mayor de compuestos (6) dentro de los cuales se supone que estaban incluidos, además de carotenoides, algunos flavonoides. Esta suposición, se basa en el hecho de que al analizar el extracto obtenido con hexano-acetona (60:40) se observó la separación de 4 compuestos, probablemente carotenoides por las características del disolvente empleado en su extracción. Por este motivo, para identificar los compuestos carotenoides presentes en la muestra se procedió a realizar las separaciones cromatográficas con extractos de hexano-acetona (60:40) tanto en muestras saponificadas y no saponificadas. Los R_f de las separaciones con muestras saponificadas y no saponificadas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de R_f, de los compuestos extraídos con mezclas de éter de petróleo-acetona eluidos por cromatografía en capa fina.

MUESTRA	DISOLVENTE	R _f
β-caroteno	A, B	1.0
hexano-acetona 100-0	A	0.92, 0.95
hexano-acetona 60-40	A	0.73, 0.90, 0.93, 0.95
Éter*-acetona 0-100	B	0.81, 0.85, 0.89, 0.95, 1.0
Éter*-acetona 10-90	B	0.78, 0.83, 0.88, 0.95, 1.0
Éter*-acetona 20-80	B	0.76, 0.85, 0.87, 0.91, 0.95, 1.0
Éter*-acetona 30-70	B	0.85, 0.95, 1.0
Éter*-acetona 40-60	B	0.85, 0.95, 1.0
Éter*-acetona 50-50	B	0.96, 0.98, 1.0
Éter*-acetona 70-30	A	0.75, 0.96
Éter*- acetona 90-10	B	1.0
Éter*-acetona 100-0	B	1.0

FASE MOVIL: A. éter de petróleo-acetona-cloroformo (50:50:40), B. Acetato de etilo-agua- metanol (10:2:1) FASE ESTACIONARIA: Silica gel 60 F (MERCK).

Tabla 15. Separación de muestras del extracto hexano-acetona (60:40) empleando cromatografía en capa fina bidimensional.

Muestra del extracto hexano-acetona (60:40)	R _f
Saponificada	0.58
No saponificada	0.18, 0.58, 0.75, 0.85, 0.91

FASE MOVIL: Primera elución Hexano-acetato de etilo (50:50)

Segunda elución Hexano: acetato de etilo:etanol:acetona (95:3:2:2)

FASE ESTACIONARIA: Silica gel 60 F (MERCK).

En concordancia con lo reportado en la Sección 5.2.3 referente a las pérdidas de compuestos por el efecto de saponificación, en la muestra extraída con hexano-acetona (60:40) no saponificada se separaron 5 compuestos ($R_f = 0.18, 0.58, 0.75, 0.85$ y 0.91) mientras que en la muestra extraída con el mismo sistema de disolventes saponificada, sólo se detectó un compuesto ($R_f = 0.58$) pudiendo ser luteína ó zeaxantina ya que coincide con sus valores del estándar ($R_f = 0.58$) (Tabla 16).

La Tabla 15 muestra los valores R_f obtenidos con los estándares de carotenoides. Se observan compuestos similares para la muestra con $R_f = 0.58$ y 0.91 , que corresponden a luteína, zeaxantina y apocarotenal, existiendo un ligero desplazamiento de 0.02 para cantaxantina. Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993), reportan en condiciones similares un valor de $R_f = 0.85$ para la criptoxantina.

En la separación cromatográfica en capa fina, de los pigmentos de la muestra extraída con hexano-acetona (60:40), no hubo separación de compuestos que presentaran valores de R_f similares a los de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno, durante todas las experiencias realizadas por lo que descartamos por éste método la presencia de éstos.

Tabla 16. Separación por cromatografía en capa fina bidimensional de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR}, Bessel, Suiza.

Estándares de carotenoides	R_f
β -Caroteno	0.96
γ -caroteno	0.95
Apocarotenal	0.91
Licopeno	0.93
Cantaxantina	0.83
Luteína	0.58
Zeaxantina	0.58

FASE MOVIL:Primera elución Hexano-acetato de etilo (50:50)

Segunda elución Hexano:acetato de etilo:etanol:acetona (95:3:2:2)

FASE ESTACIONARIA: Silica gel 60 F (MERCK).

5.4.2. Separación por cromatografía de adsorción a baja presión (Columna abierta).

La separación final de los compuestos presentes en el extracto procedente de la hoja de almendro (*T. catappa*) se realizó utilizando como eluyente a hexano-acetato de etilo (50:50). Se obtuvo el espectro de cada una de las bandas separadas con el fin de determinar el número de compuestos separados. La Tabla 17 muestra las longitudes de onda máxima de tales compuestos por orden de elución así como los volúmenes de retención; en la Figura 34 se muestra los espectros de absorción correspondientes a

cada una de las fracciones separadas. Pudo observarse que los compuestos mayoritarios corresponden a los que presentan $\lambda_{\text{máx.}}=418, 439, 469$ y $\lambda_{\text{máx.}}=445, 472$, correspondientes a los eluatos II y III.

Tabla 17. Fracciones del extracto de hoja de almendro (*Terminalia catappa*) separada por cromatografía a baja presión (columna abierta).

fracción	λ máxima	V_r (mL)*	$A^{1\%, 1 \text{ cm}}$
I	418, 445	27	2300
II	418, 439, 469	57	2350
III	445, 472	84	2400
IV	445, 469	180	2450
V	418, 442, 469	207	2480
VI	439, 469	237	2550

* V_r = Volumen de retención

Volumen muerto = 16 mL, Vel. de flujo= 0.6 mL/min

Fase móvil: Hexano-acetato de etilo (50:50),

Fase estacionaria. Silicagel G 250 (Merck).

Mecanismo de separación: Reparto.

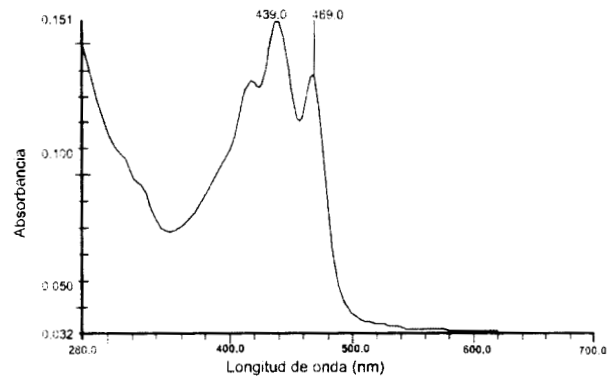
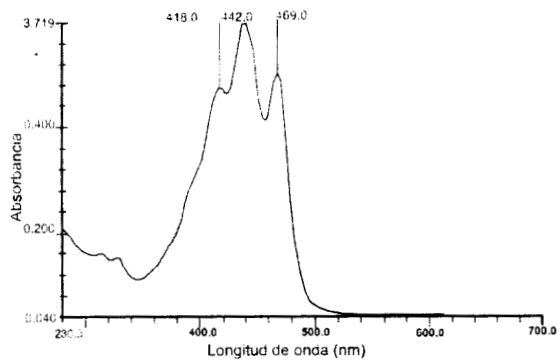
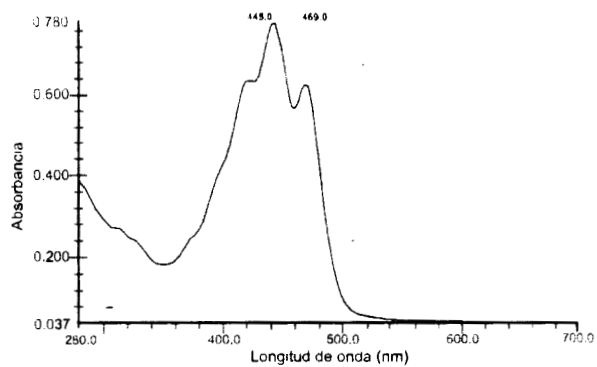
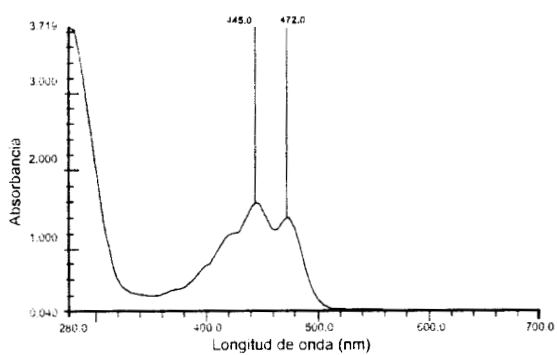
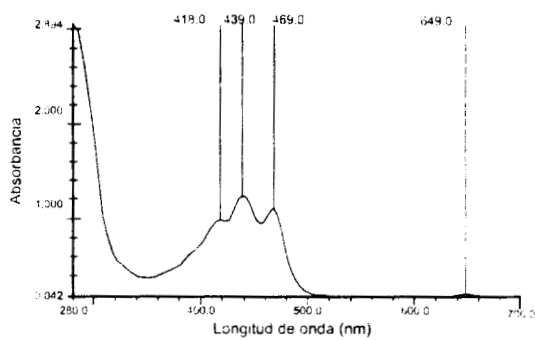
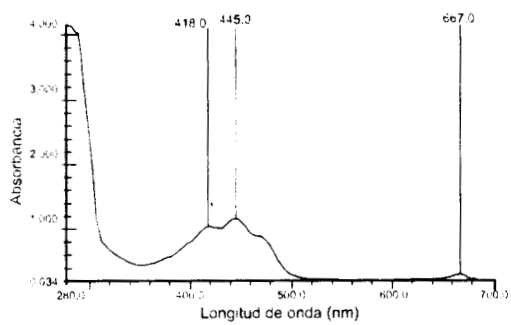


Figura 34. Espectro de absorción UV-VIS de las fracciones I a VI separadas por cromatografía a baja presión.

Con las $\lambda_{\text{máx.}}$ obtenidas y los resultados de R_f en cromatografía en capa fina de los compuestos separados, permitieron suponer presentes en la muestra a: violaxantina, violeoxantina, e isómeros de luteína, en el que puede estar incluido zeaxantina, pues ambos mostraron una respuesta similar de separación en comparación con los estándares empleados. (Yen y Chen, 1995 y Lesellier y col., 1993).

5.4.3. Separación e identificación de compuestos por cromatografía líquida de fase reversa.

La figura 35 muestra el cromatograma por HPLC de los estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR}; en el anexo 3 se reportan las áreas de los picos obtenidos.

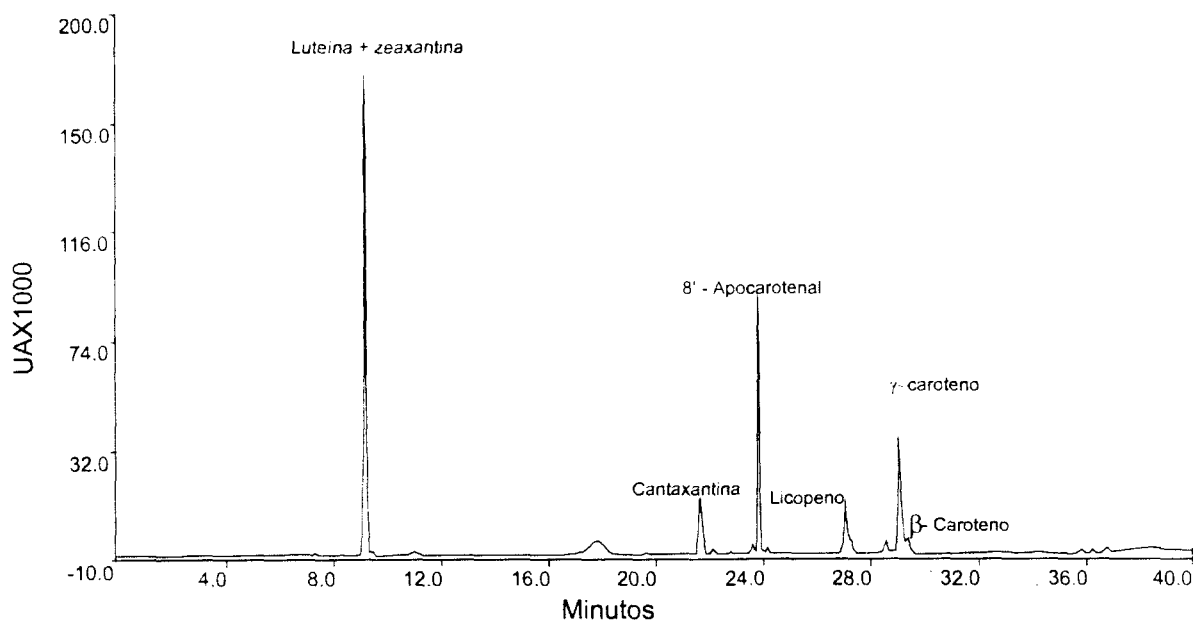


Figura 35. Separación cromatográfica de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche ^{MR}. Bessel, Suiza, utilizando una columna Symmetry C₁₈, marca Waters.

El tiempo de retención de luteína y zeaxantina fue de 9.18 minutos, aunque en algunos casos se observó la separación de un pequeño pico, se consideró como una impureza. La Tabla 18 muestra los tiempos de retención promedio y la longitud de onda máxima obtenida para los estándares.

Tabla 18. Tiempos de retención promedio y longitud de onda máxima promedio de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR} en solución hexano-acetona (60:40).

Carotenoides	T _R (min)	λ _{MAX} (nm)
Luteína	9.10	448 475
Zeaxantina	9.10	448
Apocarotenal	23.80	457
β-caroteno	29.07	454
Cantaxantina	21.60	472
Licopeno	27.00	445 472 505
γ- caroteno	28.50	400 427

Se observó que el método propuesto fue adecuado para separar los compuestos de carotenoides a excepción de luteína-zeaxantina, los cuáles tienen el mismo tiempo de retención y por lo tanto no fue posible su separación. Estructuralmente, estos compuestos difieren únicamente en la posición del doble enlace, α en luteína y β en zeaxantina; (Epler y col., 1992). Markus y col., (1998) separaron isómeros de luteína-zeaxantina a partir de retina de bovinos utilizando prontoSil 200 silicagel y YMC silicagel modificadas con triacontiltriclorosilano, en columna de cromatografía de fase inversa C₃₀, usando como eluyente acetona-agua (85:15). Por otra parte el estándar de luteína proporcionado por Hoffman-Laroche^{MR} era una mezcla de luteína y zeaxantina, el pico de esta mezcla se observa el Figura 35.

Las Figuras 36 y 37 muestran los cromatogramas obtenidos a partir de muestras no saponificadas y saponificadas, respectivamente. La disminución en el área de los picos corrobora lo observado en la cromatografía en capa fina en el sentido de que hubo una pérdida de componentes en las muestras saponificadas. En la cromatografía de capa fina también se observó que en la muestra saponificada únicamente se separó un compuesto a un R_f de 0.58 que resultó ser el componente mayoritario, posiblemente luteína o zeaxantina. Mientras que al analizar el extracto saponificado por cromatografía de líquidos, si bien disminuye la concentración de todos los componentes separados, solamente se observó la desaparición del componente eluído a los 24.4 minutos. Puede concluirse que el método de saponificación empleado fue el adecuado para purificar y separar de la muestra otros carotenoides, ya que el componente principal que sale a 9.18 minutos (luteína + zeaxantina) continúa presente después de la saponificación, aunque el área del pico disminuye de 43×10^6 (extracto no saponificado) a 12×10^6 (extracto saponificado) (Anexo 3).

De los cromatogramas para extractos no saponificados y saponificados (Figuras 36 y 37) se desprende que hubo una disminución en la concentración de pigmentos, como es el caso de luteína, violeoxantina y epóxido de luteína. Sin embargo no se observan cambios estereoquímicos en otros compuestos, lo que concuerda con lo reportado por Chen y Chen (1993). Se observó también la desaparición de β -

criptoxantina y violaxantina, pero los isómeros de luteína continuaron presentes en las muestras saponificadas.

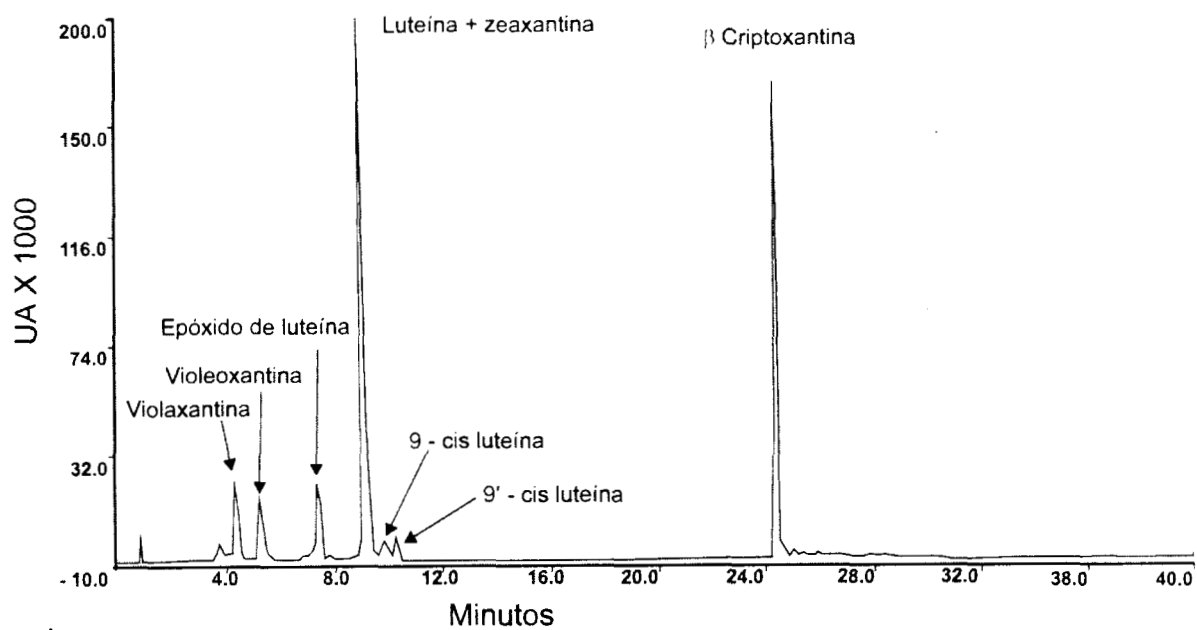


Figura 36. Cromatografía de alta resolución en fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (*T. catappa*).

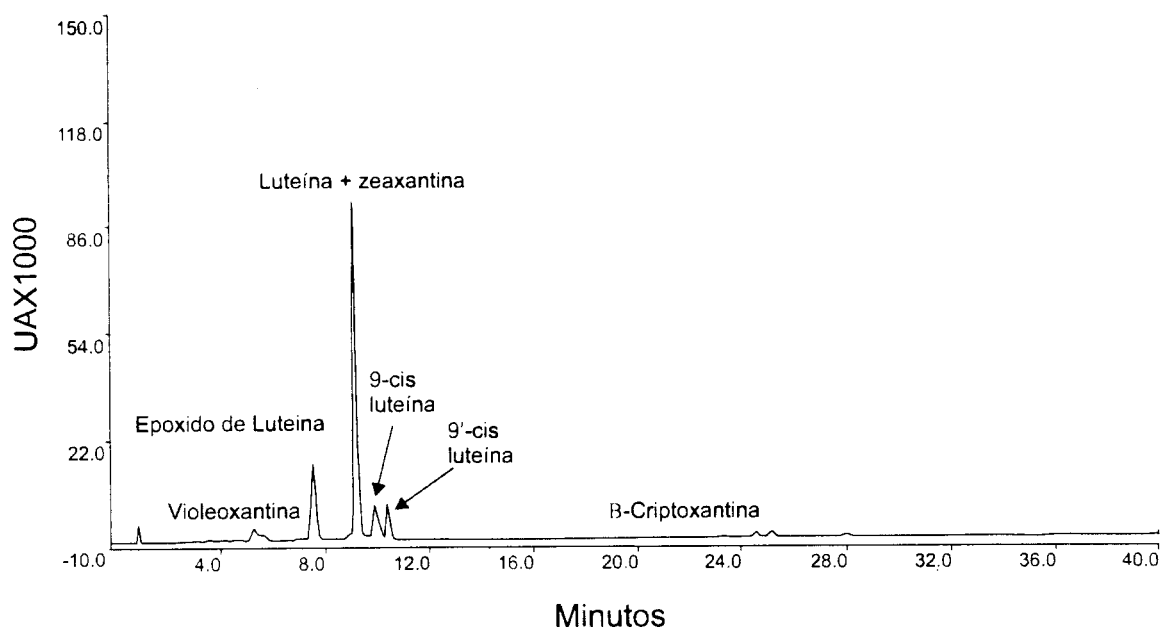


Figura 37. Cromatografía de alta resolución en fase reversa del extracto hexano-acetona (60:40) saponificado de hoja de almendro (*T. catappa*).

En los cromatogramas del extracto de hoja de almendro (*T. catappa*) (Figura 36) se constató la ausencia de los siguientes carotenoides: β -caroteno, licopeno, cantaxantina, γ -caroteno y 8'-apocarotenal, los cuales habían sido incluidos en los estándares. Comparando los tiempos de elución de los estándares y de los componentes del extracto, únicamente hubo coincidencia con luteína y zeaxantina, los cuáles coincidieron con los valores de R_f , de los picos obtenidos por cromatografía en capa fina. Además los cromatogramas de muestras saponificadas y no saponificadas se compararon con valores reportados en la literatura para su total identificación.

Los compuestos identificados en la hoja de almendro (*T. catappa*) fueron: luteína (V), 9-cis luteína, 9'-cis luteína, zeaxantina (VII), violaxantina (VIII), violeoxantina, epóxido de luteína y β -criptoxantina (VI). Los componentes mayoritarios fueron luteína+zeaxantina (51.56%) y β -criptoxantina (32.57%) (Tabla 19). Los carotenoides fueron identificados a través de los R_f obtenidos de la cromatografía en capa fina, las longitudes de onda máxima de los compuestos separados por la cromatografía en columna, desplazamiento hipsocrómico, por los tiempos de retención obtenidos en la cromatografía de líquidos y con apoyo de la bibliografía (Khachik y col, 1992; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993; Yen y Chen 1995, 1994 y Lesselier y col., 1993). Debe mencionarse que los isómeros de luteína fueron identificados mediante estudios reportados por Dachtler y col., (1998) quienes trabajaron con los estándares 13-cis zeaxantina, 13'-cis luteína, 13-cis luteína, 9-cis luteína, 9'-cis luteína, 9-cis zeaxantina, luteína (trans), y zeaxantina (trans), los cuales fueron usados para identificar carotenoides presentes en la retina y tratados con yodo, los isómeros se separaron en componentes menores a un lado de los componentes mayoritarios: luteína (trans) y zeaxantina (trans), presentándose un desplazamiento hipsocrómico de 1-3 nm; Hadden y col. (1999), identifican isómeros de luteína en flor de zempasúchil (*tagetes erecta*); Kull y Pfander (1995) reportan separaciones cromatográficas de luteína y dos cis isómeros en hojas de colza (*Brassica napus*). Las Figuras 38 a 43 muestran los cromatogramas del extracto no saponificado de hoja de almendro, añadiendo en cada uno de ellos como estándar interno un carotenoide específico. Con éste método se comprobó la presencia de luteína y

zeaxantina en el extracto. Asimismo, se descartó la presencia de apocarotenal, el cual se suponía presente al observarse un pico coincidente con su R_f en cromatografía en capa fina. Sin embargo, al observar el cromatograma de la Figura 43, se observa que el apocarotenal podría confundirse con la criptoxantina, ya que tienen muy parecido el tiempo de retención. No se detectó la presencia de β -caroteno, γ -caroteno, licopeno o cantaxantina por ninguno de los métodos empleados. La Tabla 19 muestra las concentraciones (%) de los carotenoides encontrados en el extracto hexano-acetona (60:40) de la hoja de *T. catappa*.

Tabla 19. Concentración (%) de los diversos carotenoides identificados en hoja de almendro (*T. catappa*) sin saponificar.

Carotenoide	T_r	Conc. (%)
Violaxantina	4.3	5.18
Violeoxantina	5.21	4.23
Epóxido de luteína	7.35	5.04
Luteína más zeaxantina	9.10	51.56
9-cis luteína	10.2	0.91
9'-cis luteína	10.9	0.51
β - Criptoxantina	24.4	32.57

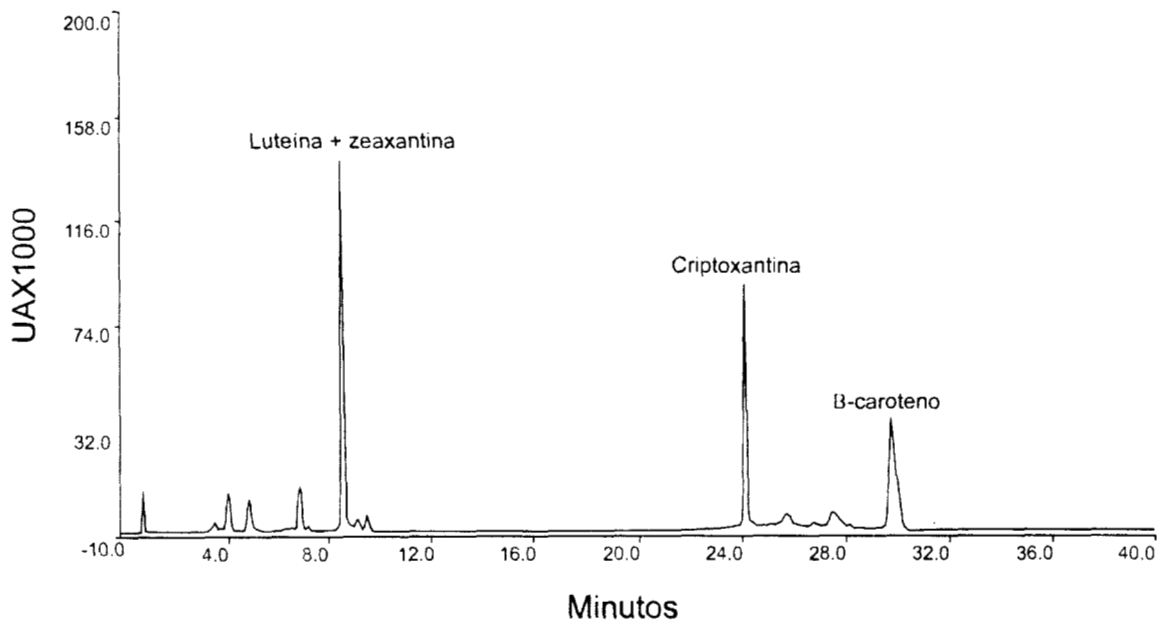


Figura 38. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno de β -caroteno.

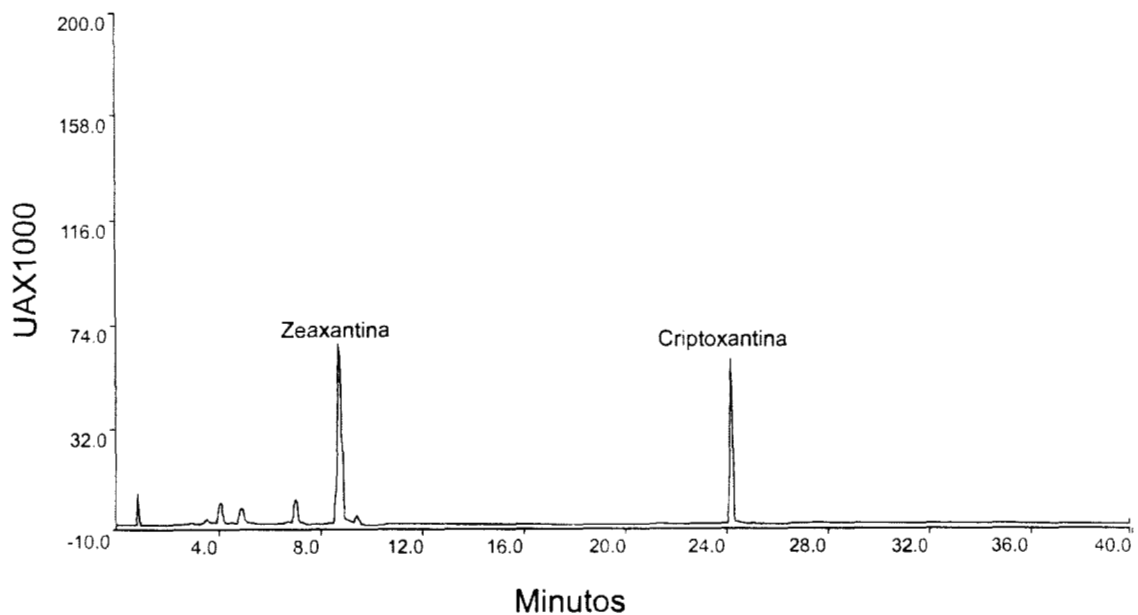


Figura 39. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno: zeaxantina.

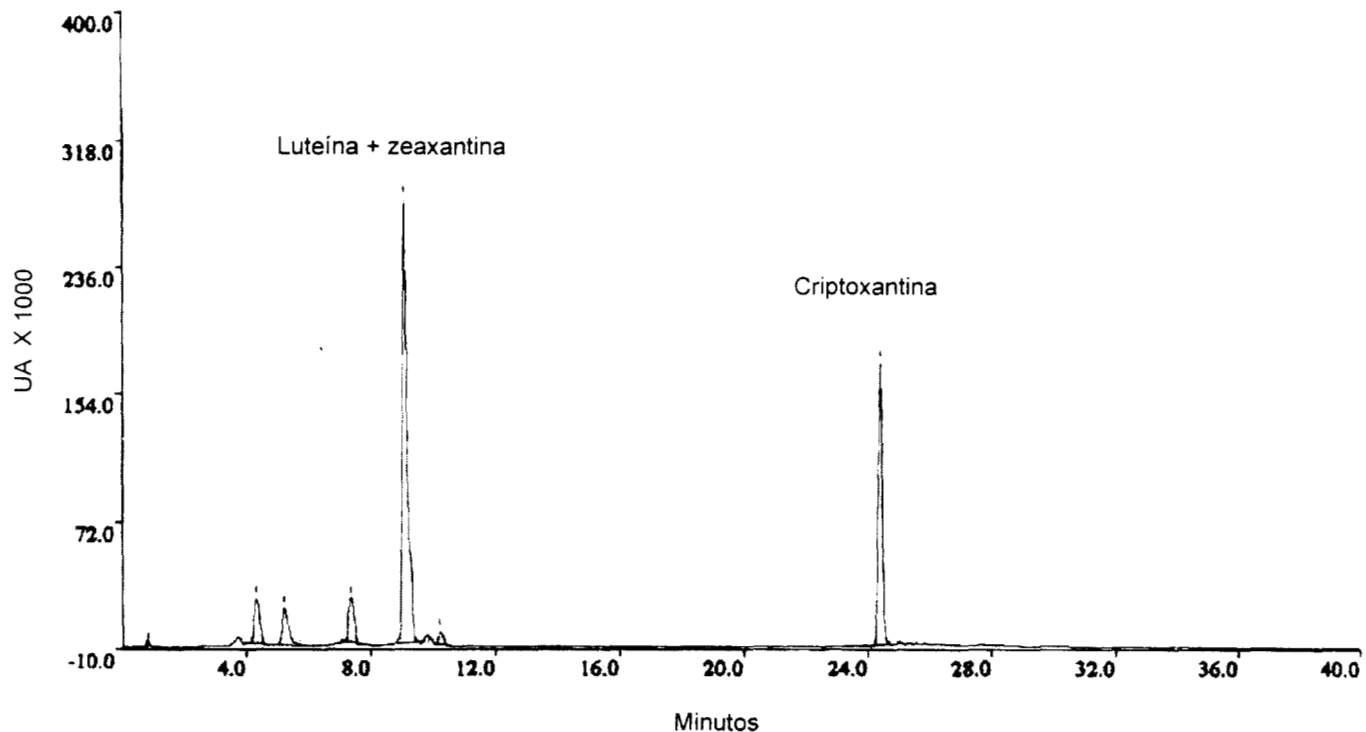


Figura 40. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno: luteína.

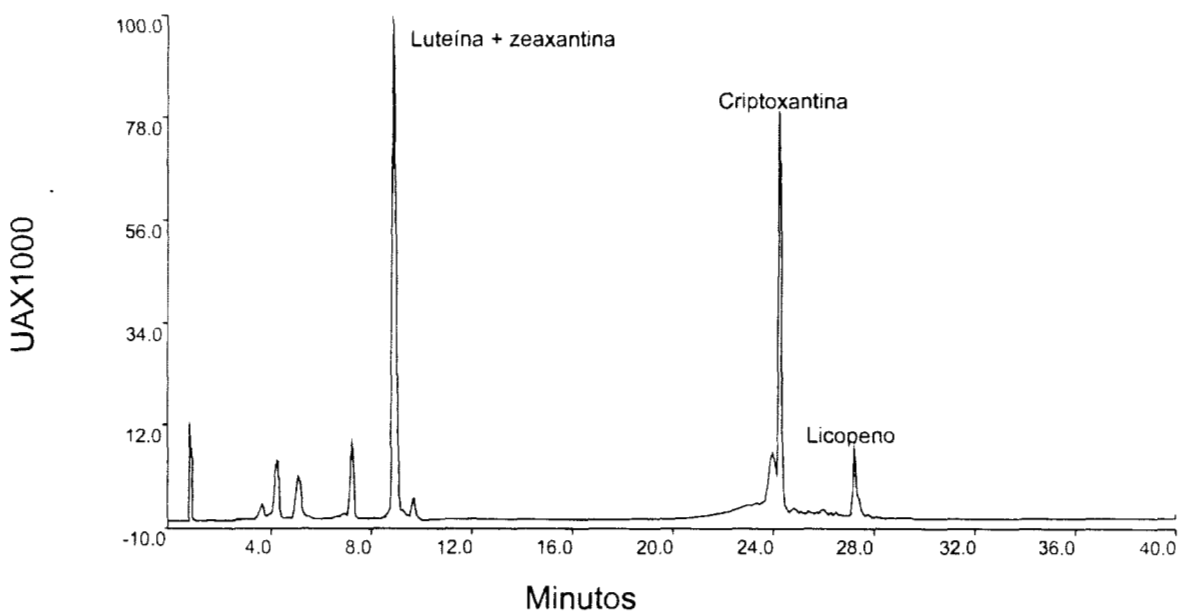


Figura 41. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno: licopeno.

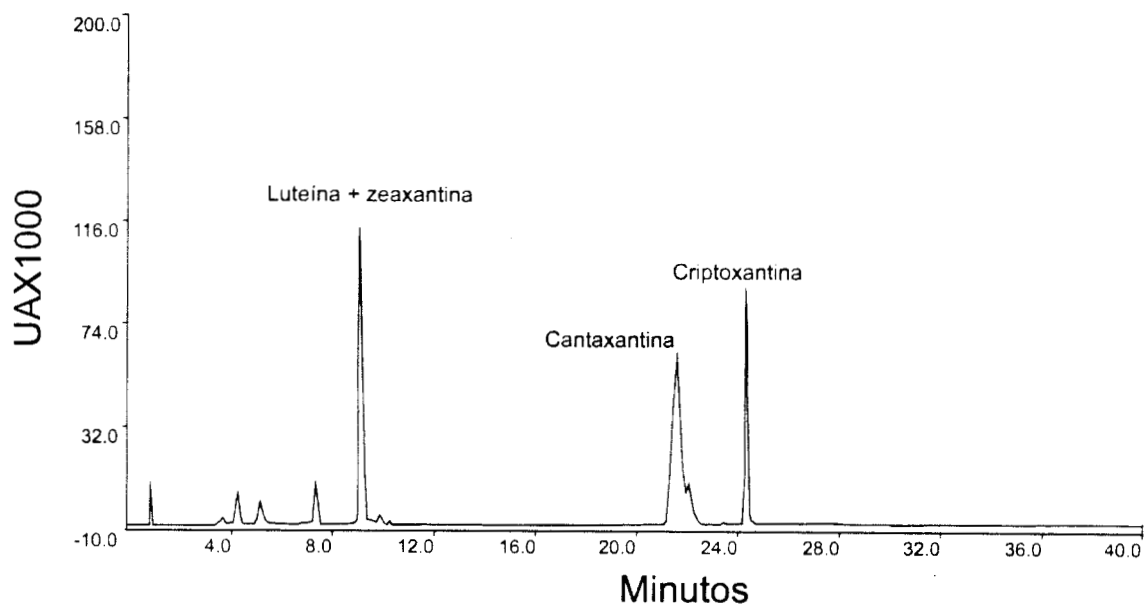


Figura 42. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno: cantaxantina

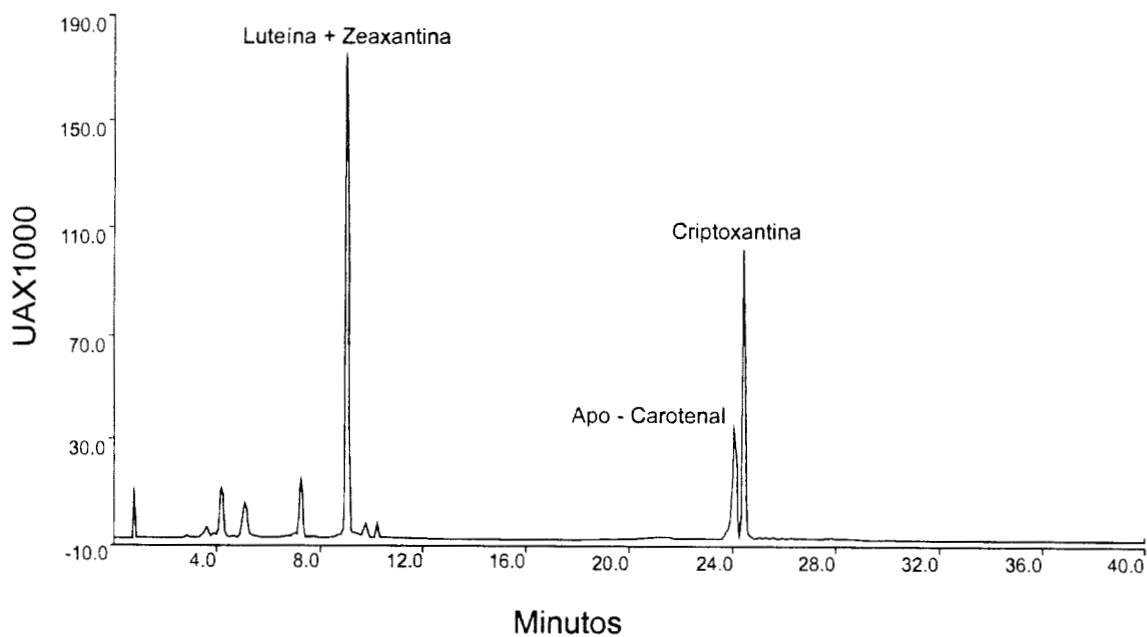


Figura 43. Cromatografía de alta resolución fase reversa del extracto de hexano-acetona (60:40) no saponificado de la hoja de almendro (*T. catappa*). Estándar interno: 8'-apocarotenal.

5.4.4. Flavonoides en la hoja de almendro.

Como se mencionó en el punto 5.2.2 al realizar las extracciones de los pigmentos de hoja de almendro con mezclas de disolventes hexano-acetona, éter de petróleo - acetona, se observó que la presencia de compuestos flavonoides al aumentar la polaridad del disolvente. Este aumento de polaridad favoreció la extracción de otros compuestos con λ_{\max} en el intervalo de 365-372 nm, que corresponde a flavonoides (Marcano y Hasegawa, 1991). La presencia de estos compuestos se manifestó en el espectro mostrado en la Figura 45, en la que se observa un máximo de absorción de 370 nm característico de flavonoides. Se decidió cuantificarlos en el extracto hexano-acetona 60:40, obteniéndose una concentración de 726 mg/l que correspondió a 4.84 mg/100 g de hoja fresca expresada como quercetina. La curva estándar empleada para ésta cuantificación se muestra en el anexo 4.

En la separación realizada por cromatografía de líquidos pudo identificarse la presencia de quercetina (XX), como lo muestran las Figuras 44 y 45. Es de mencionar que los flavonoides presentes en la muestra fueron generalmente incoloros o ligeramente amarillos dando un valor de longitud de onda máxima de 370 nm en acetona, por lo que no se les consideró como los responsables del color en la hoja de almendro.

Los flavonoides al igual que los carotenoides han tomado gran importancia al incluirseles dentro de la lista de los denominados nutraceuticos o alimentos

funcionales, siendo éstos los que demuestran que afectan benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo humano más allá de los adecuados efectos nutricionales y ocasionan una relevante mejora en el estado de salud y bienestar ó la reducción de riesgos de contraer enfermedades (González, 2001) (Tabla 1). Por lo que podríamos decir que en la hoja de almendro (*T. catappa*) coexisten éstos dos grupos; para su extracción es necesario elegir la utilidad de extraer de las hojas los carotenoides puros, flavonoides puros ó evaluar la obtención de una mezcla de ellos.

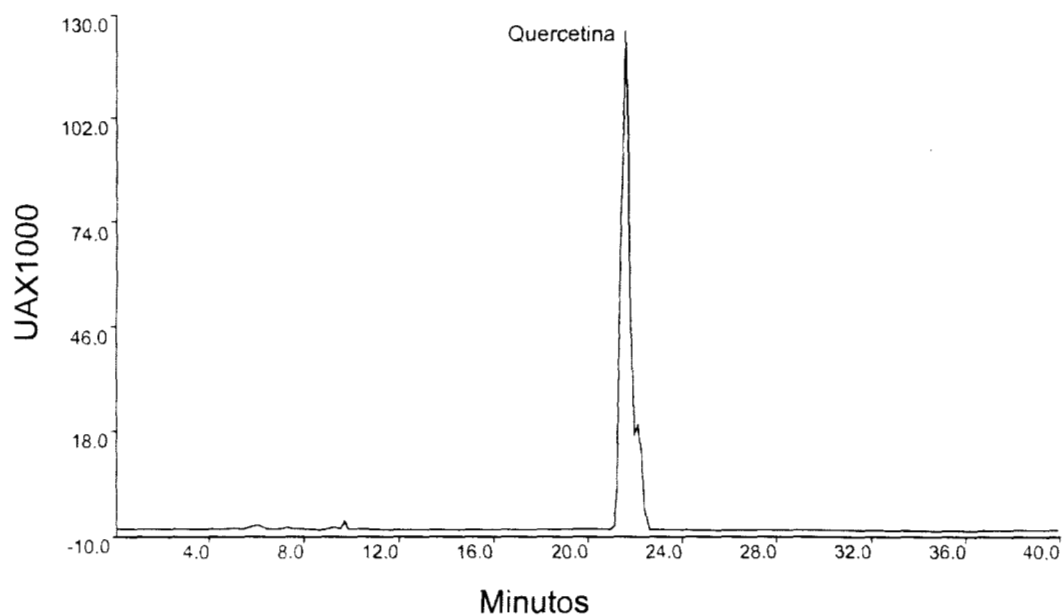


Figura 44. Cromatograma del estándar de quercetina (Sigma Chemical Co.)

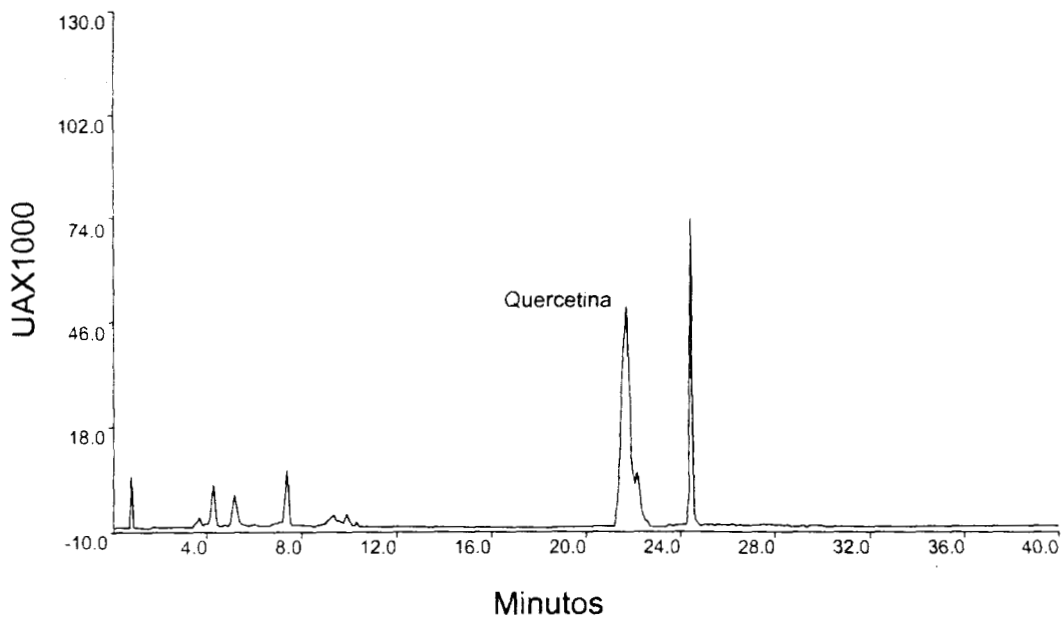


Figura 45. Cromatograma de los flavonoides del extracto de hoja de almendra (*T. catappa*),

5.5. Pruebas de estabilidad en el extracto

La estabilidad de los pigmentos en el extracto se evaluó con respecto a las variables estudiadas temperatura (4, 25, 40 y 60°C), ambiente gaseoso (aire y nitrógeno), iluminación (luz y oscuridad) y presencia de antioxidantes (0.1% BHA: BHT). La variable de respuesta considerada fue la concentración de pigmentos carotenoides presentes.

Como se esperaba, la presencia de antioxidantes dió mayor estabilidad. El pigmento sin antioxidante tuvo una concentración inicial de 4.99 mg/L de carotenoides. Este

tratamiento, de extracto del almendro, con y sin antioxidantes, en presencia de iluminación, temperatura y aire, a los 10 días dió resultados muy similares de concentración no obstante haberse sometido a la acción de la luz, ambiente y temperatura, aunque el valor promedio a los 10 días fue mas bajo (4.59 mg/L de carotenoides), representando un porcentaje de retención del color del 92%, según se muestra en las Figuras 46 y 47.

Esto pudo deberse a la acción antioxidante de los propios carotenoides presentes en las muestras.

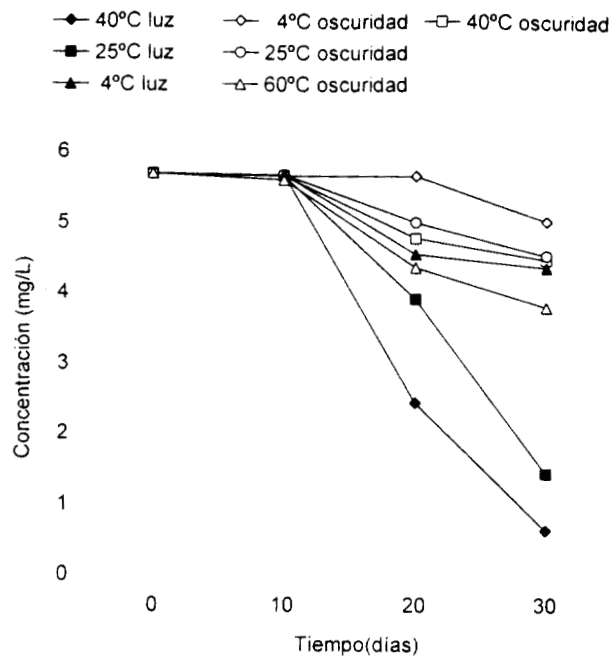


Figura 46. Efecto de la temperatura, ambiente gaseoso e iluminación en extracto de pigmentos de *T. catappa*, con antioxidantes.

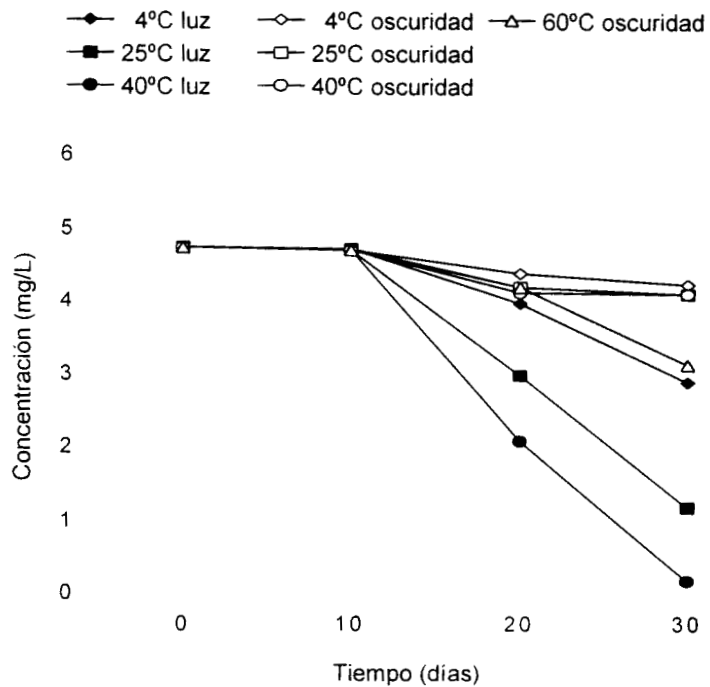


Figura 47. Efecto de la temperatura, ambiente gaseoso e iluminación en extracto de pigmentos de *T. catappa*, sin antioxidantes.

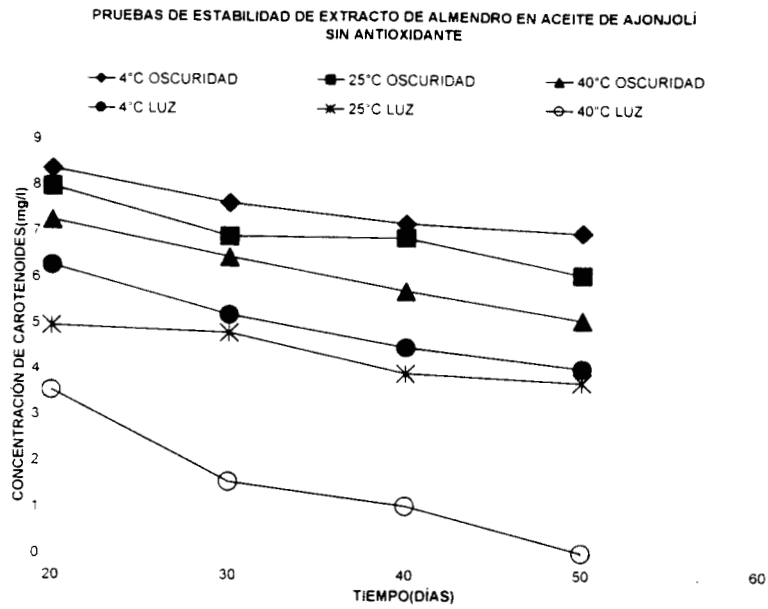


Figura 48. Resumen de medias de las pruebas de estabilidad del pigmento de hoja de almendra (*T. catappa*), adicionado a aceite de ajonjolí (*S. orientale* L), sin antioxidantes.

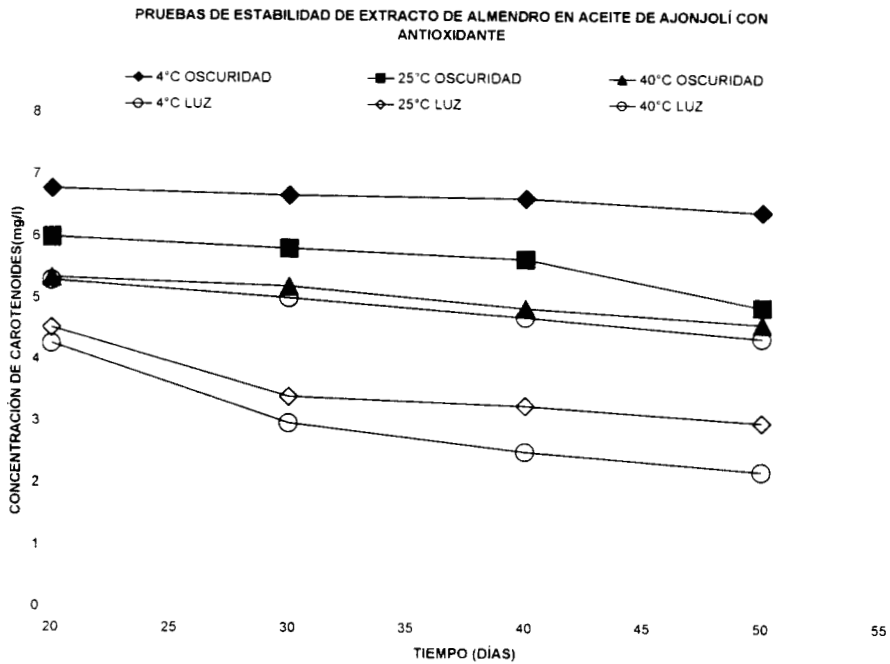


Figura 49. Resumen de medias de las pruebas de estabilidad del pigmento de hoja de almendra (*T. catappa*), adicionado a aceite de ajonjolí (*S. orientale* L), con antioxidantes.

A los 30 días, el valor mas bajo de retención de pigmentos fué de 0.14 mg/L de carotenoides, en las muestras expuestas a la luz, lo que representó un porcentaje de 2.8% con respecto al valor inicial, es decir hubo una degradación del 97.2% del colorante en presencia de iluminación. De las variables estudiadas, se observó que la luz influyó en mayor grado en la estabilidad del colorante, ya que a los 30 días se presenta el menor valor de concentración de carotenoides, dando valores de 0.48 mg/L para oscuridad y con luz de 0.14 mg/L de carotenoides, es decir hay una pérdida de color de casi un 70%, al comparar ambos valores entre sí (Figura 48). El análisis estadístico se muestra en los anexos 5 y 6.

Por otro lado, de las tres temperaturas ensayadas (4°C, 25°C y 40°C) la mayor pérdida de color se presentó en muestras almacenadas a 40°, tanto en luz como en oscuridad, obteniéndose valores de retención de pigmento de 9.6% en muestras almacenadas en la luz y de 2.8% en muestras almacenadas en oscuridad, con lo que se comprobó que a medida que aumenta la temperatura hay una disminución de la concentración de carotenoides (Figura 49). El análisis estadístico se muestra en los anexos 5 y 6.

El efecto del aire en la presencia de aire, también influyó negativamente en la concentración residual de pigmento ya que a los 30 días de almacenamiento todos los valores de concentración fueron mas bajos para las muestras almacenadas en presencia de aire que aquellas con nitrógeno (Figura 49). El análisis estadístico se muestra en los Anexos 5 y 6.

Los resultados del análisis de varianza para cada tiempo, se muestran en el anexo 4 (López y col., 2001).

A los 10 días de almacenamiento, los tratamientos de variación de temperatura y ausencia de aire no dieron diferencias significativas con respecto a la concentración de carotenoides ($P > 0.01$) a excepción de la temperatura. A los 20 días, se muestra significancia para el efecto temperatura-iluminación, lo que parece indicar que esta combinación produjo mayor degradación del pigmento, que la combinación temperatura-ambiente. La misma tendencia se mostró para los efectos de primer orden de iluminación, temperatura, ambiente. A los 30 días, el ambiente, temperatura e iluminación fueron significativos, así como las interacciones temperatura-iluminación, ambiente-temperatura. Puede inferirse que la interacción ambiente-iluminación influyó en menor grado sobre la estabilidad de los pigmentos. Asimismo, la interacción principal fue la temperatura-iluminación.

En el caso de la estabilidad de los pigmentos en el extracto con antioxidante, el valor inicial fue de 6.0 mg/L de carotenoides. Los valores de concentración más bajos al final de los 30 días fueron de 1.91 mg/L y de 1.47 mg/L, el primero en oscuridad y temperatura de 40°C y con nitrógeno, y el segundo almacenado en a la misma temperatura y ambiente gaseoso. En general, los valores de concentración de carotenoides son más bajos en presencia de aire y de luz, y se reducen aún más conforme se incrementa la temperatura. (Figura 48 y 49).

Solamente el 32% de los carotenoides se conservaron a los 30 días de almacenamiento, cuando las muestras estaban almacenadas en nitrógeno a 40°C en presencia de luz. Esto representó 1.91 mg/L de carotenoides. Los valores mas bajos se observaron en presencia de aire a 40°C y luz (24.5%) (Figura 49). La retención de pigmentos en las muestras con antioxidante fueron muy superiores a los obtenidos en el extracto sin antioxidante en las mismas condiciones (1.6 y 2.8%, respectivamente) (Figura 49) lo que indicó un efecto favorable del antioxidante en la preservación del color. La concentración del pigmento es mayor en almacenamiento en la oscuridad, a bajas temperaturas y en ausencia de aire (Figuras 48 y 49).

A 40°C, el efecto del antioxidante se reduce como se observa en la concentración de pigmentos en muestras expuestas a la luz. Este efecto fue similar en muestras almacenadas en aire o en nitrógeno.

A los 10 días de almacenamiento los efectos de temperatura, ambiente gaseoso e iluminación son significativos a un nivel del 0.01%, así como la doble interacción ambiente-iluminación. A los 20 días, todos los efectos son altamente significativos ($P > 0.01$). A los 30 días, todos los efectos son altamente significativos ($P > 0.01$). Esto muestra que, en el caso de usar antioxidante, todos los factores son importantes a los 30 días, por lo que deberá de controlarse al máximo la presencia de aire y de luz, y mantener la temperatura baja para aumentar el periodo de almacenamiento sin que el producto sufra daños. La representación de las dobles y triples interacciones, se muestran en el Anexo 7.

Biacs y col., (1992) realizaron un estudio para estabilizar los pigmentos carotenoides de polvo de pimentón durante el almacenamiento a temperatura ambiente y refrigeración utilizando antioxidantes naturales como el ácido ascórbico y el tocoferol, obteniendo menos pérdidas de pigmentos con éstos compuestos que con las muestras testigo; las pérdidas fueron solamente del 5% a refrigeración y del 15% a temperatura ambiente, comparado con las muestras control de 15% y 27% respectivamente.

Delgado-Vargas y col., (1998) realizaron experiencias para probar la acción de iluminación a la luz del sol en flores de cempasúchitl (*Tagetes erecta*), ricas en carotenoides. Encontraron un efecto significativo en la iluminación, obteniendo valores muy bajos de carotenoides en relación con las muestras protegidas de la luz, atribuyendo la pérdida de carotenoides a la descomposición molecular.

Por su parte, Pesek y Warthesen (1988) observaron que la degradación de los carotenoides se acelera por la luz y ésta es potenciada por las altas temperaturas. Estos autores concluyeron que la influencia temperatura-luz combinada depende del tipo de muestras, siendo más sensibles los pigmentos cuando están incorporados a un producto líquido que a un producto sólido. Howard y col., (1996) realizaron estudios para evaluar la afectación del color por el procesamiento térmico en zanahorias a temperatura por debajo de la esterilización, y a temperaturas de esterilización y superiores, evaluando el color en un sistema Hunter-Lab,

mostrándose pérdidas y degradación de color y de azúcares por lo que deben usarse temperaturas menores de 121°C, para prevenir éstos cambios.

Goldman y col. (1983) demostraron que la velocidad de decoloración de β -caroteno es favorecida por altas cantidades de oxígeno.

Con la finalidad de observar los efectos de la luz, Wagner y Warthesen, (1995) estudiaron muestras de zanahoria en polvo encapsulado en un hidrolizado de almidón, y muestras protegidas con papel aluminio, las muestras fueron iluminadas con focos de 2150 lux a 25 cm de distancia y 45°C, se observaron los mismos resultados de retención de β - caroteno para muestras encapsuladas como para las que fueron protegidas de la luz, con lo que los autores comprobaron que la luz es un factor muy importante en la pérdida de carotenoides y la encapsulación es un buen método para evitar su degradación.

En nuestra experiencia, la mayor incidencia de decoloración total se presentó en muestras expuestas a la luz, en ésta etapa los productos de degradación no pudieron ser detectados a 450 nm probablemente porque el sistema de dobles enlaces conjugados fue destruido.

Tanto la oxidación espontánea como la oxidación iniciada por radicales libres, de los carotenoides, han sido reportadas (Palozza y Krinsky, 1992) sobre todo lo relacionado a la pérdida de color en la región visible del espectro. Este blanqueo, así

como el análisis de los productos de oxidación de los carotenoides han sido estudiadas en un intento por evaluar la capacidad antioxidante de los carotenoides cuando estos compuestos reaccionaron directamente con especies radicales (Woodall y col., 1977), así como para establecer la cinética de las interacciones radical-carotenoides (Goulson y Warthesen, 1999). Algunos de los compuestos o técnicas usadas para estudiar el blanqueo o la formación de los productos de oxidación inducidas por fuentes enzimáticas o no enzimáticas de radicales son: AIBN (Nitril azobisisobutilo), AMVN (2,2 -zobis-2,4-dimetilvaleronitrilo) en que se obtienen radicales peroxilo, t-BOOH (hidroperóxido de terbutilo), NaOCl (hipoclorito de sodio) con radicales oxígeno, radiólisis de CCl₄ (tetracloruro de carbono) y radicales alcóxidos (R-O[•]) (Palozza y Krinsky, 1991). La degradación oxidativa causó rápida pérdida de color debido a la ruptura y descomposición del cromóforo polieno. En éste proceso están involucrados varios mecanismos de reacción, entre los que se encuentran la degradación de isozeaxantina, canthaxantina y astaxantina en que las posiciones C-4 y C4' son ocupadas por grupos funcionales que son menos reactivos que el β-caroteno y zeaxantina en los cuales ésta posición esta libre (Woodall y col., 1977). Algunos productos tales como 4-metoxi ó 4-etoxi y 4-4' dimetoxi derivados fueron aislados de reacciones de β-caroteno con radicales peroxilo en la presencia de metanol o etanol (Woodall y col., 1977). Los cálculos de densidad electrónica sugieren que las reactividades diferentes no pueden ser el único criterio para diferenciar la distribución electrónica entre la cadena poliénica de los diferentes cromóforos, los cuales alterarían la susceptibilidad a la adición de radicales libres

para el sistema doble enlace conjugado. Deben de considerarse otras reacciones, incluyendo la sustracción de hidrógeno de posiciones alílicas a cadenas de polienos C4 ó β -caroteno y sus derivados de licopeno. El licopeno, luteína y zeaxantina reaccionan rápidamente con agentes oxidantes por lo que son considerados como antioxidantes potenciales (Woodal y col., 1977; Haila y col., 1996).

En estudios realizados sobre oxidación inducida en carotenoides se encontraron trazas de otros productos de reacción como apocarotenales y cetonas que fueron identificados por su espectro UV-VIS y masas (Goulson y Warthesen, 1999). Pequeñas cantidades de otros compuestos tales como epóxidos han sido detectados (Liebler y Kennedy, 1992). La diversidad de los productos encontrados indica que las reacciones pueden ocurrir en todas las partes de las moléculas de carotenoides, en la cadena del polieno y en el doble enlace endocíclico (Jung y Min, 1991).

El principal interés en relación a la reacción de carotenoides con agentes oxidantes y radicales libres es que los carotenoides pueden ser efectivos antioxidantes *in vivo* y esto da protección en enfermedades por estrés oxidativo (Britton y col., 1996; Schmitz y col., 1997). Los carotenoides son fácil y rápidamente oxidados por muchos agentes oxidantes. En un sistema complejo ésta rápida reacción con carotenoides podría reducir la disponibilidad de radicales libres a reaccionar con otras moléculas tales como lípidos insaturados y por lo tanto reducir los niveles de

daño causado en esas otras moléculas y estructuras tales como membranas (Woodall y col., 1997).

5.6. Pruebas de estabilidad en el pigmento adicionado a aceite vegetal de ajonjolí.

El comportamiento de la concentración de carotenoides en aceite, respecto a la temperatura e iluminación, en presencia de aire, se muestran en los Anexos 9 y 10.

Los porcentajes de retención mayores ocurrieron cuando se adicionó antioxidante, en relación a la retención de pigmento en muestras sin antioxidante. El porcentaje de retención menor, a los 50 días de la prueba, fue de 0.26%; en comparación a cuando se incorporó antioxidante, donde el porcentaje de retención fue de 30.99%. Estas cantidades muestran una diferencia de casi cien veces mas retención si se emplea antioxidante.

En el caso del aceite sin antioxidante, a una temperatura dada, se observaron valores de retención superiores en el caso de muestras en oscuridad en relación a las muestras en presencia de luz, 59.76% para el primero y de 0.26% para el segundo a una temperatura de 40°C.

Por otro lado, a un nivel de iluminación determinado, al incrementar la temperatura se observó un decremento en la cantidad de pigmento remanente, habiendo una reducción considerable en el caso de muestras almacenadas a 40°C (0.26%)

correspondiendo a 0.022 mg/l. Los datos obtenidos de muestras con antioxidante dan una tendencia semejante a la anterior, sin embargo en éste caso los porcentajes de retención son mayores, sobre todo a 40°C y en presencia de luz donde el valor de retención es del 30.99%. A los 20 días de estudio, los factores de primer orden, iluminación y temperatura, así como la interacción de ambas fueron altamente significativas. Una situación similar ocurrió a los 30, 40 y 50 días de estudio. Esto podría interpretarse como la ausencia de interacción entre las variables que potencien la degradación del pigmento. Por lo tanto los porcentajes de degradación son menores en la presencia de antioxidante.

Los análisis de varianza se muestran en el Anexo 10 y las gráficas que muestran la doble interacción temperatura-iluminación en cada tiempo, se muestran en el Anexo 8.

Al comparar los datos de estabilidad del extracto puro con los del aceite de ajonjolí, añadido con extracto de pigmento a las mismas condiciones, los porcentajes de retención a los 30 días de almacenamiento son superiores en el caso de aceite con pigmento, con y sin antioxidante. (Figuras 50 y 51).

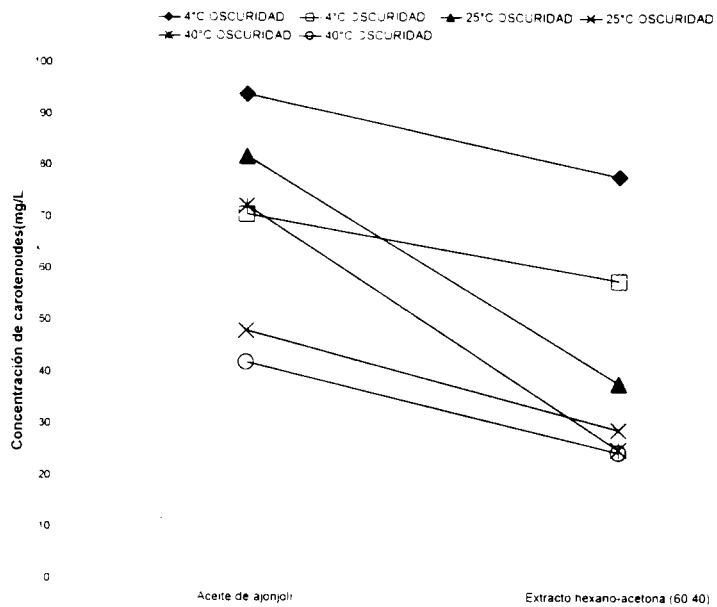


Figura 50. Comparativo de los porcentajes de retención de carotenoides de hoja de almendro (*T. catappa*) en el extracto y en el aceite de ajonjolí (*S. orientale* L), con antioxidante.

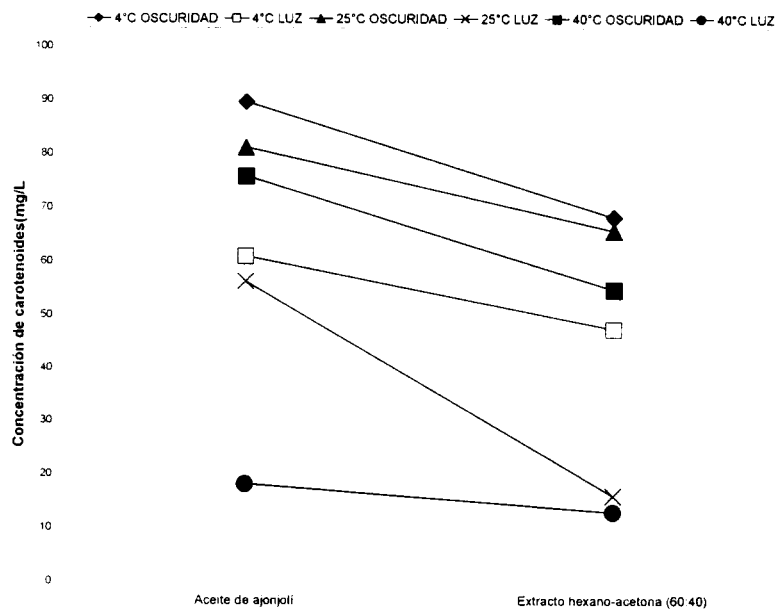


Figura 51. Comparativo de los porcentajes de retención de carotenoides de hoja de almendro (*T. catappa*) en el extracto y en el aceite de ajonjolí (*S. orientale* L), sin antioxidante.

Esto parece indicar que existe algún efecto protector del sustrato aceite, lo que hace al pigmento menos sensible. Los carotenoides resisten más las modificaciones de temperatura y oxígeno en el seno del alimento que en estado puro, ya que los polímeros, las proteínas y los hidratos de carbono ejercen un efecto protector (Badui, 1999).

Por otra parte es de hacer notar que el extracto empleado consiste de carotenoides y de flavonoides. Está reportado que ambos compuestos pueden actuar como antioxidantes, ejerciendo un efecto sinérgico entre ambos al adicionarlos a un alimento. (Gordon y An, 1995; Crozier y col., 1997; Miyake y col., 1997). Reynoso y col., (1997) estudiaron la velocidad de degradación de betalaínas encontrando que esta es más rápida en un sistema modelo de pigmentos puros, comparada con un jugo de betabel, en el que hay un efecto protector dado por otros constituyentes en el sistema natural tales como polifenoles y antioxidantes.

Por otra parte se pone de manifiesto que al aumentar la temperatura, los porcentajes de retención de pigmentos en aceite son elevados para el caso de los tratamientos a 40°C y en presencia de luz, donde el porcentaje para el extracto puro sin antioxidante es de 12.81% en comparación al del aceite que fue de 18%; en el tratamiento sin antioxidante.

Un caso similar se observó cuando se adicionó antioxidante (BHT) a las muestras. A las mismas condiciones, 40°C y en presencia de luz, el porcentaje de retención de

carotenoides para el extracto es de 24.46 y para el aceite de 41.86, lo que significa que la retención en el aceite es 1.71 veces superior al extracto..

Jaren-Galán y col., (1999) evaluaron el efecto de la temperatura sobre los carotenoides en oleoresina de pimiento obteniendo una cinética de degradación de primer orden a medida que aumenta la temperatura. Monreal y col., (1999) realizaron estudios sobre la influencia del almacenamiento a temperaturas sobre carotenoides en frijol verde (*Phaseolus vulgaris*), durante 15 días, encontrando decremento ligero en el contenido de carotenoides. Yen y Chen (1995) evaluaron la formación de peróxidos en aceite de soya al que adicionaron carotenoides tales como luteína, violeoxantina y extracto de cáscara de naranja rico en carotenoides. Estos autores observaron que luteína adicionada redujo la formación de peróxidos. Siguiendo en eficiencia estaban el β -caroteno, extracto de cáscara de naranja y la violeoxantina. Tal efecto antioxidante fue más notorio desde el inicio del experimento hasta los 4 días, a partir de aquí el efecto empezó a disminuir.

En el presente estudio se concluyó que las bajas temperaturas empleadas, así como el tiempo de almacenamiento corto no fueron suficientes para observar cambios mas significativos sobre los niveles de estabilidad presentes en las muestras.

6. CONCLUSIONES.

La presente tesis tuvo como objetivo estudiar el potencial de un vegetal ampliamente distribuido en el estado de Tabasco con posibilidades para la extracción de pigmentos naturales identificando a éstos pigmentos y evaluando su estabilidad.

Por lo que dentro de éste marco se logró en una primera etapa hacer una evaluación de diez vegetales existentes en la región Centro del estado, que presentaban compuestos pigmentantes los cuales fueron macuilis (*Tabebuia rosea*), croto (*Codiaeum variegatum*), amarillo ó cashán (*Terminalia amazonia*), sazafrán (*Cúrcuma longa*), almendro (*Terminalia catappa*), matalí (*Tradescantia zebrina*), maguey morado (*Tradescantia spathacea*), guayacán (*Tabebuia guayacán*), copa de oro (*Solandra grandiflora*) y crucetilla (*Randia aculeata*).

Los pigmentos presentes en éstos diez vegetales fueron extraídos con diversos disolventes orgánicos y con el apoyo de los espectros de absorción UV-VIS y longitud de onda máxima que presentaron los extractos así como la facilidad de obtención, abundancia de la materia prima y presunción de compuestos carotenoides se seleccionó al almendro *T. catappa* como el vegetal a emplear en la presente investigación.

Las hojas del almendro *T. catappa* presentaron coloraciones amarillas y rojas a las cuales se les realizaron extracciones con los disolventes acetona, hexano, etanol, isopropanol y éter de petróleo cuantificando en los extractos el contenido de carotenoides. Es de mencionar que no existió diferencia entre trabajar con hoja amarilla y roja en cuanto a su contenido de carotenoides . El mejor sistema de

disolventes para extraer los pigmentos fue acetona- éter de petróleo. Sin embargo se evaluó la sustitución del éter de petróleo por hexano ya que éste presenta menor punto de ebullición, polaridad similar, menor costo y mayor disponibilidad industrial, seleccionando la mezcla de disolventes hexano-acetona 60:40 para la extracción de los pigmentos de *T. catappa*.

El contenido total de carotenoides en hojas de *T. catappa* fue de 36.36 mg/100 g lo cual es una cantidad considerable comparada con otros vegetales tales como lechuga, cilantro, hojas de rábano, mango y papaya en que es menor.

Se encontró además que al hacer extracciones de hojas con diversas proporciones de disolventes a medida que se incrementó la polaridad se extrajeron compuestos que de acuerdo a sus longitudes de onda máxima entre 360 y 372 nm pertenecen a flavonoides.

Se realizaron pruebas de saponificación en extractos conteniendo los carotenoides con la finalidad de eliminar clorofilas y lípidos indeseables utilizando en el proceso condiciones menos severas que las reportadas por otros autores, bajando la concentración de hidróxido de potasio metanólico de 50% a 10%, burbujeando nitrógeno y menor tiempo de duración. Los resultados mostraron que aún con éstas condiciones se presentaron pérdidas de pigmentos de alrededor de un 50% así como

la destrucción de β -criptoxantina por lo que se tomó la decisión de eliminar éste paso en el proceso de obtención de los pigmentos.

Se realizó un análisis para determinar la composición química de las hojas y ver la posible asociación del pigmento con otros compuestos que pudieran interferir en la extracción posterior encontrando bajo porcentaje de proteínas de 5.21%, 3.72% de extracto etéreo y 59.70% de humedad, por lo que se descartó la posibilidad de encontrar pigmentos asociados a proteínas o carbohidratos como en otros casos.

Los pigmentos extraídos fueron separados, purificados e identificados por técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

La identificación se realizó con el apoyo de estándares de carotenoides proporcionados por Hoffman-Laroche^{MR} los cuales fueron luteína, zeaxantina, apocarotenal, β -caroteno, cantaxantina, licopeno y γ - caroteno. Por parte de flavonoides únicamente se contó con el estándar de quercetina, así como las experiencias reportadas por otros investigadores.

Los resultados de cromatografía en capa fina que mostró éste estudio fue la posible presencia de apocarotenal, licopeno, cantaxantina, luteína y zeaxantina ya que los R_f de los compuestos separados de la muestra concordaron con los de éstos estándares.

Con los resultados obtenidos en cromatografía en capa fina y la longitud de onda máxima de los espectros de absorción UV-VIS de los compuestos separados por cromatografía en columna a baja presión se identificaron como posibles compuestos a violaxantina, violeoxantina, luteína y zeaxantina.

Los compuestos identificados por HPLC en el extracto de hoja de almendro *T. catappa* fueron los carotenoides Violaxantina, violeoxantina, epóxido de luteína, luteína, zeaxantina, dos isómeros de luteína y β -criptoxantina. Por otra parte el flavonoide identificado por los mismos métodos empleados en carotenoides tales como cromatografía en capa fina, columna abierta y HPLC fué quercetina. Los componentes mayoritarios fueron luteína mas zeaxantina con 51.56% y β -criptoxantina con 32.57%, cabe señalar que no se detectó la presencia de β -caroteno, γ -caroteno, licopeno y cantaxantina.

La estabilidad de los pigmentos en el extracto se evaluó con respecto a la temperatura a 4, 25, 40 y 60°C en ambiente gaseoso (aire y nitrógeno), iluminación (luz y oscuridad) y presencia de antioxidantes, teniendo como variable de respuesta la concentración de carotenoides presentes.

La iluminación fué el factor más determinante en la estabilidad del pigmento ya que las muestras se vuelven incoloras en presencia de la luz. Los pigmentos fueron estables a la temperatura, esto es importante ya que la temperatura del trópico

húmedo oscila entre 30 y 45°C por lo que la adición de antioxidantes y almacenamiento en oscuridad son los factores mas importantes a tomar en cuenta para mantener la estabilidad de los pigmentos.

También se evaluó a condiciones de temperatura, ambiente gaseoso, iluminación y presencia de antioxidantes un aceite comestible de ajonjolí (*Sesamum orientale L*) extraído en laboratorio con el fin de tener un aceite libre de aditivos al que se le añadieron pigmentos de hoja de almendro (*T. catappa*) y al comparar los datos de estabilidad del extracto puro con los del añadido al aceite de ajonjolí a las mismas condiciones y tiempo de almacenamiento, los porcentajes de retención de pigmentos fueron superiores para los del aceite conteniendo al pigmento ya fuera con ó sin adición de antioxidante, por lo que se manifestó un efecto protector del aceite hacia el pigmento al compararlo con la mayor pérdida de pigmentos del extracto puro.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que la hoja del árbol del almendro *T. catappa* es un potencial para ser utilizado en la extracción de pigmentos carotenoides o compuestos flavonoides. Para su extracción es necesario elegir la utilidad de extraer de las hojas los carotenoides puros, flavonoides puros o evaluar la extracción de una mezcla de ambos.

7. RECOMENDACIONES.

El almendro, *T. catappa*, es nativo de Asia tropical y utilizada con fines medicinales los cuales pueden tener su origen en los fitoquímicos que en él existen por lo que en cierta forma sus hojas representan una posibilidad para ser consideradas como fuente de extracción de pigmentos naturales y el aporte adicional de un beneficio a la salud.

Como se mencionó anteriormente los productos nutracéuticos ó funcionales han alcanzado en la actualidad mayor importancia por las ventajas que representan ya que además de realizar una función en el alimento como aditivos o ingredientes nutracéuticos conllevan un valor agregado pues proporcionan beneficios a la salud en las personas que los consumen.

Los carotenoides y flavonoides encontrados son una nueva fuente para cubrir ésta demanda del mercado actual ya que además de considerarse como pigmentos naturales ambos tienen potencial antioxidante.

Además por ser los alimentos funcionales un concepto relativamente nuevo en el mercado deberán considerarse varios factores ya que de ello dependerá el éxito de los nuevos productos que se presenten como un precio razonable, que el producto se optimice sensorialmente, que se convierta en un estilo de vida para mantener la

salud, que los beneficios y atributos estén científicamente demostrados y comprobados y con una buena información y adecuada promoción.

Una vez presentadas las bondades del almendro, *T. catappa*, no debe omitirse comentar que deberán hacerse pruebas toxicológicas a los extractos obtenidos que contienen los carotenoides y flavonoides bajo el proceso presentado para evaluar desde ésta perspectiva su inocuidad y asegurar la salud del consumidor así como ajustarse a la legislación que actualmente está siendo reformada en éste sentido.

La tecnificación del cultivo es otro paso importante en la explotación de las hojas del árbol estudiado, pues si bien está ampliamente distribuido en el estado y se propaga fácilmente, tal material vegetal se encuentra disperso y no existen datos cuantificados sobre la cantidad de árboles existentes.

Adicionalmente otra forma de aprovechar la planta sería mediante la utilización del fruto, el cual podría envasarse bajo diversos métodos de conservación o la separación de la almendra rica en aceites (53%), principalmente de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico.

8. BIBLIOGRAFIA.

Adewusi, S. R. A. y Bradbury, H. J. (1993). Carotenoids in casava: Comparison of open-column and HPLC methods of analysis. *Journal Of Science And Food Agricultural*. 62:375-383.

Agarwal, S. y Rao, A.V. (1998). Tomato, lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*. 33: 981-984.

Andrade, P., Carvalho, A., Seabra, R. y Feneira, M. (1998). A previous study of phenolic profiles of quince pear and apples purees by HPLC diode array detection for the evaluation of quince puree genuineness. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 46:968-972.

Association of official Analytical Chemist. (1990). *Official Methods of Analysis*. 14^{ava} Ed. AOAC. Herrick K. Editor. Washington, D.C. Volumen I, capítulo 3.

Arad S. y Yaron A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Of Food Science And Technology*. 3:4:91-97.

Atkinson, B. y Mavituna, F. (1989). *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. The Nature Press. Hong Kong. p.p. 1199-1202.

Badui, D.S. (1999). *Química de los alimentos*. Ed. Longman de México. México. Tercera edición p.p. 648.

Bakker J. y Peter, P. (1992). Strawberry juice color: The effect of sulphur dioxide and EDTA on the stability of anthocyanins. *Journal Of Science And Food Agricultural*. 60:477-481.

Banco Nacional de Comercio Exterior S.N.C. (1999). *Catálogo de Aranceles de Importaciones y Exportaciones*. 12 de febrero.

Baublis, A., Spomer A. y Berber-Jiménez, M.D. (1994). Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal Of Food Science*, 59:6:1219-1234.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1988). *Química de los Alimentos*. Primera edición. Ed. Acibia, Zaragoza, España. p.p.198-206.

Bhaskarachary, K., Sankar Rao, D.S., Deosthales Y.G. y Reddy V. (1995). Carotene content of some common and less familiar foods of plant origin. *Food Chemistry*, 54:189-193.

Biacs, A. P., Czinkotai, B. y Hoschke A. (1992). Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 40:3:363-367.

Blakely S.R., Adkins J., Slaughter, L. y Knight E. U. (1988). *Journal Of Nutrition* 118:152-155.

Braverman, J.B.S. y Berk, Z. (1980). *Introducción a la Bioquímica de Alimentos*. Trad. Hill A. F. Segunda edición. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. p.p. 358.

Brenan, J.G., Butters, J.R., Cowell, N.D. y Lilly A.E. (1990). *Las operaciones de la Ingeniería de los alimentos*. Segunda edición. Ed. Acribia. España. p.p. 540.

Burton, G.W. (1989). *Journal Of Nutrition*. 119: 109.

Canales H. B. (2001). Alimentos funcionales. I Seminario Nacional sobre aditivos e ingredientes para alimentos funcionales. *Industria Alimentaria*. México. 23:39-43.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. (1995). Worked examples of isolation and analysis. En: *Carotenoids; Isolation and Analysis*. Volumen 1 A. Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. Primera edición. Birkhäuser Verlag. Basilea Suiza. p.p. 199 - 215.

Bruno, T.J., Nieto de Castro, C. y Hamel, J.; (1993). Recovery processes for biological materials. En: Kennedy, F. Editor. *A supercritical fluid extraction of biological products*. John Wiley and Sons Ltd. USA. p.p. 303-353.

Cadoni E., De Giorgi M., Medda E. y Poma. G. (2000). Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β-carotene from ripe tomatoes. *Dyes And Pigments* 44:27-32.

Cano, C. G. y Marroquín de la Fuente, J. (1991). *Taxonomía de plantas superiores*. Primera edición. Ed. Trillas, México. p.p. 290.

CDFA Plant Industry (1999). *Terminalia catappa*
<http://www.cdfa.ca.gov/plant/agidaid/page64.htm> . fecha de acceso: 8 de septiembre.

Chandler, L.A. y Schwartz S.J. (1988). Isomerization and losses of trans β-carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 36:129-133.

Charm, S. E. *The Fundamentals of Food Engineering*. (1985), Tercera edición. AVI Publishing Company Inc. Westport. p.p. 646.

Chen, H.B. y Chen, Y.Y. (1992). Determination of carotenoids and chlorophylls in water convulvulus (*Ipomoea aquatica*) by liquid chromatography. *Food Chemistry*. 45:2:129 -134.

Chen, H.B. y Chen, Y. (1993). Determination of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:8:1315-1320.

Chen, B.H. y Chen, Y.. (1993). Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 41: 1315-1320.

Chen H.M. y Meyers, S.P. (1984). Ensilage treatment of crayfish waste for improvement of asthaxanthin pigment extraction. *Journal Of Food Science*. 48:5: 1516 -1520.

Chen H.B. y Yang, S.H. (1992). An improved analytical method for the determination of carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. *Food Chemistry*. 44:1:61-66.

Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1984). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Volumen 1. p.p.333.

Chiralt, A., Casas, A y Primo, Y. (1990a). Carotenoides en las hojas de *Viburnum tinus* L. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 30:4:454-459.

Chiralt, A., Serrano, C. y Tarrazo J. (1990b). Prácticas de Fisicoquímica. Primera edición. Universidad Politécnica de Valencia. España. p.p. 147.

Craft, N.E. (1992). Carotenoid reversed-phase high-performance liquid chromatography methods: Reference compendium. En: Edited by Lester Packer. *Methods in Enzymology*. Volumen 213. New York. Academic Press. p.p. 185-205.

Crozier, A., Lean, Mc Donald. y Black C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 45:3:590-595.

Crouzet, J. y Kanasawud, P. (1992). Formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids. En: Editor Lester Packer. *Enzymology Methods*. Volumen 213. New York. Academic Press. p.p. 54-62.

Dachtler, M., Kohler, K. y Albert, K. (1998). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C₃₀ bonded phase. *Journal Of Chromatography B*720:211-216.

De la Torre, R. y Robles, L.R. (1999). Extracción supercrítica de sustancias naturales. *Avances en Ciencia y Tecnología*. IPN-CIIDIR Oaxaca. 2(Enero-Abril):3-9.

Delgado-Vargas F., Paredes L.O. y Avila G. E. (1998). Effects of sunlight illumination of marigold flower meals on egg yolk pigmentation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 46:698-706.

Derache, R. (1990). *Toxicología y Seguridad de Alimentos*. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p.p.420.

Devore, G. y Muñoz, M.E. (1989). *Química Orgánica*. Publicaciones Cultural. 18 Edición. México, D.F. p.p. 563.

Diario Oficial de la Federación. (1988). *Ley General de Salud*, Diario Oficial. Secretaría de salud, 2 Tomos.

Dittmar, A. (1998). Traditional medicinal plants of Samoa. <http://www.geocities.com/HotSprings/Falls/1693/eterni-c.html> . Fecha de acceso: 09 de Agosto.

Duke's. (1998). *Phytochemical and ethnobotanical databases*. Agricultural Research Service. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacv2.pl> Fecha de acceso: 20 de julio.

Epler S. K., Sander C. L., Ziegler R., Wise A. S.; Craft E. N. (1992). Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *Journal Of Chromatography*. 595:89-101.

Fennema, O.R. (1993). *Química de Alimentos*. Tercera edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p.p. 1094.

Ferreres, F., Juan, T., Pérez-Arquile, C., Herrera-Martache, A., García-Viguera, C y Tomás-Barberan, F. (1998). Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal Of Science And Food Agricultural* 77:506-510.

Fessenden, R.J. y Fessenden, J.S. (1983). *Química Orgánica*. Segunda edición. Grupo Editorial Iberoamerica. México, D.F. p.p. 1077.

Fisher, C. y Kocis, A.J. (1987). Separation of paprika pigments by HPLC. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 35:55-57.

Gao, L. y Mazza, G. (1996). Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal Of Food Science*. 61:3:600-603.

García, G., Quintero, R. y López, M. (1993). *Biotecnología Alimentaria*. Primera reimpresión. Ed. LIMUSA. México, D.F. p.p. 252.

García de Marina, A y Del Castillo, B. (1988). *Cromatografía líquida de alta resolución*. Primera edición. Editorial Limusa. México, D.F. p.p.252.

García-Viguera, G., Zabrilla, P., Artés, F., Romero, F., Abellán, P. Y Tomás-Barberan, A. (1998). Colour and anthocyanin stability of red reaspberry jam. *Journal Of Food Science*. 78:565-573.

Gary, B. R. (1998) *Flavonoids in Foods*.

http://www.nal.usda.gov/tic/tektran/data/000009_58_0000095819.html. Fecha de acceso: 12 de noviembre.

Ghiselli, A., Nardini, M; Baldi, A. y Scaccini, C. (1998) Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2:361-367.

Giusti, M.M. y Wrolstad, R.E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *Journal Of Food Science*. 61:2:322-326.

Gloria, A.M.B., Vale, R.S. y Bobbio, A.P. (1995). Effect of water activity on the stability of bixin in an annato extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chemistry* 52:389-391.

Goldman, M., Horev, B. y Saguy, I. (1983). Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. *Journal Of Food Science*. 48:751-754.

González R. A. (2001). Productos funcionales a disposición de la industria alimentaria para la actualización y diseño de nuevos alimentos. *Industria Alimentaria*. México. 23:46-48.

Gordon, M.H. y An J. (1995). Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:1784-1788.

Gorodo G. F. J. (2000). Estudio de sistemas agroforestales en el trópico húmedo. Tesis Lic. Colegio de postgraduados. México.

Goulson. M.J. y Warthesen, J.J. (1999). Stability and antioxidant activity of beta-carotene in conventional and high oleic canola oil. *Journal Of Food science*, 64 :6: 996-999.

Guillou, A., Chaubert, G. y Noue, J. de la O. (1993). Separation and determination of carotenoids retinol, retinal and their dehidro forms by isocratic reversed-phase HPLC. *Food Chemistry*. 47:1:93-99.

Guyot, S., Marnet, N., Laraba D., Sanoner P. y Drelleau J. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple

variety *malus doméstica* Var. Kermenien. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46:1698-1705.

Hadden L. W., Watkins H.R., Levy W. L., Regalado E., Rivadeneira M. D. Breemen V. R., Schwartz J. S. (1999). Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 47:4189-4194.

Haila, K.M., Lievonen, S.M. y Heinonen, M.I. (1996). Effects of lutein, lycopene, annatto and γ -tocoferol on autooxidation of tryglicerides. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 44:2096-2100.

Halliwell, B., Guteridge, J.M.C. y Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: A simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analitical Biochemistry. 165:215-219.

Handelman, G.J., Van Kuijik, F.J.G.M., Chaterjee, A. y Krinsky, N.I. (1991). Free Radical Biological And Medicine. 10:427-431.

Hart, D.J., Scott, K.J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. Food Chemistry. 54: 101-111:

Hayward, P.M. Colorantes. (1992). Tecnología de Alimentos, 27(4, 5 y 6):34-43.

Helguera, L.I. (1999). El papel de los Alimentos Funcionales. Alimentos Procesados 10:10-54.

Hendry, G.A.F. (1996). Natural Pigments in Biology. 2^a. Ed. Blackie Academic and Profesional. Gran Bretaña. p.p. 1-39.

Henry G. A. y Houghton J.D. (1996). Natural food Colorants. 2^a.Ed. Blackie Academic and profesional. Gran Bretaña. p.p. 37-38.

Hertog, M.E., Hollman, P. G y Katan, M. (1992a). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 40:2379-2385.

Hertog, M.E., Hollman, P. G. y Venena, D. (1992b). Optimization of a quantitative HPLC determination of potencially anticarcinogénesis flavonoids in vegetables and fruits. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 40:1591-1598.

Howard, L.R., Braswell, D.D. y Aselage, J. (1996). Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing. Journal Of Food Science, 6:12:327-329.

Instituto Nacional de Geografía e Informática. (1995). Publicación sobre Características Generales de los suelos. Tercera edición. México, D.F. p.p. 98.

Ittah, Y., Kanner, J. y Granit, R. (1993). Hydrolysis study of carotenoid pigment of paprika (*Capsicum annum L.*) Var. Lehava by HPLC detector fotodiode array. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. American Chemical Society. 41:6: 899-901.

Ito, M., Yamano, Y., Shibata, Y. (1992). Synthesis and characterization of carotenoids by different methods. Carotenoids part A. En: Editor Lester Packer. Methods in enzymology, Volumen 213, New York. Academic press. p.p.13-22.

Jaren-Galan, M. y Minguez-Mosquera M.I. (1999). Quantitative and qualitative changes associated with heat treatments in the carotenoid content of paprika oleoresins. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 47:4379-4383.

Jung, M.I. y Min, D.B. (1991). Effects of quenching mechanisms of carotenoids on the photosensitized oxidation of soybean oil. Journal Of American Oil Chemical Society. 68: 653-658.

Kamikura, M. y Nakazato, K. (1985). Studies on the quality of natural colouring matter. II. Journal Of the Food Hygienic Society Of Japan. 26:2:150-159.

Kanner, J. y Kinsella, J.E. (1983). Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 31:370.

Karastogiannidou, C. (1999). Effects of onions quercetin on oxidative stability of codd-chill chicken in vacuum-sealed containers. Journal Of Food Science. 64:6: 978-981.

Khachik, F., Beecher, G., Goli, M. y Lusby, W. (1992) Separation and quantitation of carotenoids in foods. En: Editor Lester Packer. Methods in Enzimology Vol. 213. New York.. Academic Press Inc. p.p. 347-359.

Kimura, M., Rodriguez, Amaya, D. B. y Godoy, H.T. (1990). Assesment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. Food Chemistry. 35:3:187-195.

Krinsky, N.I., Russet, T.M.D., Handelman, G.J. y Snodderly, D.M. (1990). Structural and geometrical isomers of carotenoid in human plasma. Journal Of Nutrition. 120:1654-1662.

Kull, D. y Pfander, H. (1995). Isolation and identification of carotenoids from the petals of rape (*Brassica napus*). Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 43:2854-2857.

Laughton, J. M., Evans, P. J., Moroney, M. A., Houtt, J. R. S. y Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochemical Pharmacology*. 42: 1673-1681.

Lee, Y., Howard, L.R. y Villalón. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal Of Food Science*. 60:3:473-476.

Leffingwell, J.C. (1999). Lycopene. The ultimate phytochemical nutraceutical. <http://www.leffingwell.com/lycopene.htm>. Fecha de acceso: 5 de Noviembre 2000.

Leibovitz, B., Hu, M.L. y Tapped L. (1990) *Journal Of Nutrition*. 120:97.

Leigh, W.H., Watkins, R., Levy, L.W., Regalado, E., Rivadeneira, D.M., van Breemen, R.B. y Schwartz, S.J. (1999). Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 47:4189-4194.

Leenheer De A. P. y Nelis, H. J. (1992). Profiling and quantitation of carotenoids by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. En: Editor Lester Packer. *Methods in enzymology*. Volumen 213. New York. Academic Press. p.p. 251-265.

Lesellier, E., Krstulović, A.M., y Tchaplá, A. (1993). Especific effects of modifiers in subcritical fluid chromatography of carotenoids pigments. *Journal Of Chromatography* 641: 137-145.

Lesellier, E., Tchaplá, A., Marty, C. y Lebert, A. (1993). Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal Of Chromatography* 633: 9-23.

Lewis, C., Walker, J., Lancaster, J. y Sutton, K. (1998). Determination of anthocyanins flavonoids and phenolic acids in potatoes. I. Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal Of Science And Food Agricultural*. 77:45-57.

Liaen-Jensen, S. y Andrews, A.G. (1972). *Microbial Thecnology*. Krieger Pub. Co. Nueva York, USA. p.p.222-250.

Liaen-jensen, S. (1971). *Isolation, Reactions*. Edit. Otto Isler. Carotenoids. Volumen I. Birkhäuser Verlag Basel. p.p.61-187.

Liebler, D.C. y Kennedy, T.A. (1992). Epoxide products of β - carotene antioxidant reactions. Volumen 213. Carotenoid parte A. New York. Academic press. P.p. 472-479.

Lietz, G. y Henry, J.K. (1997). A modified method to minimise losses of carotenoids and tocopherols during HPLC analysis of red palm oil. *Food Chemistry*. 60:1:109-117.

Lindner, E. (1991). *Toxicología de Alimentos*. Primera edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p.p.138.

López-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Cruz-Sosa, F., Guerrero-Legarreta, I. (2001). Characterization and stability of pigments extracted from *Terminalia catappa* leaves. *Journal Of Food Science*. 66:6:832-836.

López-Hernández, J., Vázquez-Blanco, E., Romero-Rodríguez A. y Simal-Lozano, J. (1993). HPLC Determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*. *Journal Of Agricultural Of Food Chemistry*. 41:1613-1615.

López, H. E., Valadez, V.A., Maupoey P.F. y Chiralt, B.A. (1993). Obtención de Colorantes de Cochinilla. (*Dactylopius coccus* C.). *Universidad y Ciencia* 10:20: 79-87.

Magaña, A. M. A. (1995). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas de Tabasco. Primera edición. Univ. Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tab. México. p.p. 205.

Mayne, S. T., Parker, R. S. (1989). *Nutr Cancer*. 2:225.

Man, D. J. (1990). *Principles of Food Chemistry*. Segunda edición. AVI Publishing Company. Wesport, Conn. p.p. 499.

Mandeville, S., Gaylayan, V., Simpson, B. y Ramaswany, H. (1992). Isolation and identification of carotenoid pigments, lipid and flavor active components from raw commercial shrimp waste. *Food Biotechnology* 5:2:185-195.

Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica orgánica*. Segunda edición. Univ. Central de Caracas, Venezuela. p.p.285

Markus, D., Konrad, K. y Klaus A. (1998). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxantin stereoisomers in bovine retina using a C₃₀ bonded phase. *Journal Of Chromatography* B720:211-216.

Marmion, D. (1984). *Handbook of U.S. colorants for foods, drugs and cosmetics*. Segunda edición. New York. John Willey and Sons. p.p. 322.

Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. y Tomás-Barberán, F. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honey and propolis. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 45:8:2824-2829.

Mayer, H. y Isler, A. (1995). Total syntheses of carotenoids. Volumen 2. En: Isler, O. editor. Primera edición. Birkhäuser Verlag. Basel, Sw. p.p.328-331.

Mayne, S.T. y Parker, R.S. (1989). Nutrition And Cancer. 12:225.

Miki, W. (1991). Pure Applied Chemistry. 63, 141.

Minguez-Mosquera M.I., Pérez-Gálvez A. (1998) Color quality in paprika oleoresins. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 46:5124-5127.

Minguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez D. (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigment in red peppers (*Capsicum annum L.*), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 41:1616-1620.

Minguez-Mosquera, M. I., Gangul-Rojas, B. y Gallardo-Guerrero, M. I. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 40: 60-63.

Miyake, Y., Yamamoto, K., Morimitsu, Y., Osawa, T. (1997). Isolation of C-glucosyl-flavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 45:12:4619-4623.

Monreal, M., De Ancos, B. y Cano, M.P. (1999). Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs Perona and Boby). Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 47:19-24.

Mouly P.P., Gaydou M. E., Corsetti J. (1999). Characterization of paprika (*Capsicum annum*) extract in orange juices by liquid chromatography of carotenoid profiles. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 47:968-976.

Müller, H. Y Schweizer, B. (1994). Biochemical applications for UV/Vis spectroscopy. Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH. Alemania. Cap. III. p.p. 1-32.

Muñoz de Ch. M., Villasana, Ch. A., Roldán, A.J., Ledesma, S.J.A., Mendoza, M.E. y Gil Romo, F.P. (1996). Tablas de valor nutritivo de los alimentos. Primera edición. Editorial Pax, México. Nueva Luna editores. p.p. 330.

Ng, J. H. y Tan B. (1988). Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection. Journal Of Chromatography Sciences 26:463-469.

Nyambaka, H., Ryley, J. (1996). An isocratic reversed-phase HPLC separation of the stereoisomers of the provitamin A carotenoids (α - γ β - carotene) in dark green vegetables. *Food Chemistry*. 55: 63-72.

Noonan, J. (1972). Color additives in food. En: Editor Furia T.E. *Handbook of additives* CRC Press. 2ª edición. Volumen I, capítulo 14. St. Louis M.O. USA. p.p. 815.

Nuncio O. G. (2000). Caracterización de los sistemas de producción ovina en el estado de Tabasco. Tesis maestría. Colegio de la Frontera Sur.

Obaya, V.A. y Guerrero, B. (1992). Aplicación de la extracción supercrítica en la industria de alimentos. *Tecnología de Alimentos*, 27:4-6:51-58.

Ortiz G.G., Guadarrama O. M.A., Magaña A. M. A. (1994). Guía de excursiones botánicas en Tabasco, México. Univ. Juárez Autónoma de Tabasco. Ed. UJAT. 1ª Ed. p.p. 71.

Palozza, P. y Krinsky, N. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. Volumen 213. Carotenoid parte A. New York. Academic press. p.p.403-420.

Parajó, J.C., Santos, V., Vázquez, M. y Cruz, J.M. (1997). Production of carotenoids by *Xanthophylomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. *Food Chemistry*. 60:3:347-355.

Perry, R. H. y Chilton, H. (1983). *Chemical engineers Handbook*. Mc. Graw Hill. New York.

Pesek, C.A. y Warthesen J.J. (1990). Kinetic model for photoisometization and concomitant photodegradation of β -carotenes. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 38:1313-1315.

Philip, T. y Chen, T.S. (1988). Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *Journal Of Chromatography*, 20:113-126.

Ponce, E., Taylor A.J. (1999). Phenolic compounds as astringent factors in black tea liquors. *Flavor chemistry of ethnic foods*. Edit. Shahidi and Ho. Kluwer Academic New York. p.p. 197-209.

Ponce, L.R. e Izcapa, C.T. (1989). Avances y perspectivas de los procesos de extracción supercrítica. Primera edición. UNAM. México. p.p. 80.

Pszczola, D.E. (1998). The ABCS of nutraceutical ingredients. Food Technology. 52:3:30-37.

Quattrochi, O.A., Abelaira de Andrizi, S.A. y Laba, R.F. (1992) Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. p.p. 383

Raina, B.L., Agarwal, S.G., Bhatia, K.A. y Gaur, G.S. (1996). Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. Journal Of Science And Food Agricultural. 71:27-32.

Reid, R.C., Prausnitz, J.M. y Poiling, B.E. (1988). Properties of gases and liquids. Segunda edición. Mc. Graw Hill Book Co. New York. p.p.280.

Reyes, C.P. Diseño de Experimentos Aplicados. (1990). Tercera edición. Editorial Trillas. México, D.F. p.p. 348.

Reynoso R., García, F.A., Morales, D. y González de Mejía, E. (1997). Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 45:2884-2889.

Rivas, J. D. L. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. Journal Of Chromatography. 464: 442-447.

Robyt, J.F., White, B.J. (1990). Biochemical Techniques. Cap. 7. Theory and practice. IOWA State University. Brooks/Cole publishing Company. pp. 233-237.

Rodríguez-Amaya, D. (1999). A Guide To Carotenoid Analysis in Foods. Omni Research. Ilsi Press. Primera edición. Washington D.C.

Rouseff, L.R. (1998). High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annato. Journal Of Food Science. 53:6:1823-1826.

Saganuma, M., Inakuma, E. (1999). Effects of dietary ingestión of tomato in mice. Bioscience Biotechnology And Biochemistry. 63: 78-82.

Saito, K. y Mori, T. (1994). Colour stability of carthamin under alkaline conditions. Food Chemistry, 51:105-107.

Sangines, F.M.C. y García, J.F. (1990) Química Orgánica. Tercera edición. Editorial Limusa. México, D.F. p.p.310.

Sapers, G.M. (1994). Color characteristics and stability nonbleeding cocktail cherries dyed with carotenoids pigments. Journal of Food Science. 59(1):35-38.

Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J-M., Cheynier, V. y Moutounet, M. (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal Of Food Science*. 6:5:938-941.

Schmitz, H.H., Scwartz, S.J., Catignani, L.C. (1994). Resolution and quantitation of the predominant geometric β - carotene isomers present in human serum using normal-phase HPLC. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 42: 2746-2750.

Scott, K.J. (1993). Observations of some of the problems associated with analysis of carotenoids in food by HPLC. *Food Chemistry* 45:5:357-364.

Scott, K.J. y Hart, A.J. (1993). Further observations in problems associated with analysis of carotenoids in food by HPLC II. Column temperature. *Food Chemistry* 47:4:403-405.

Simic G. (1992). Carotenoids free radicals. En: Editor Lester Packer. *Methods in enzymology*. Volumen 213. Carotenoids. Parte A. New York. Academic Press. p.p. 444-453.

Siouffi, A.M. (1992). HPLC. En: Nollet, L.M. editor. *Food Analysys by HPLC*. Primera edición. New York. Marcel Dekker, Inc. p.p. 1-52.

Sommer, T.R., Potts, W.T. y Morrisy, N.M. (1992). Utilization of microbial asthaxantin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 94:1:79-88.

Steven, P. (1998). What we know about AMD and nutrition. *Review Of Ophthalmology*. Agosto. p.p. 30.

Terao, L., Nagao, A., Pank, D. y Limb, B. (1992). A lipid hydroperoxide assay for antioxidant activity of carotenoids. En: Editor Lester Packer. *Methods in enzymology*, Volumen 213. Carotenoids Parte A. New York. Academic Press. p.p. 454-460.

Torres, O.J. (1997). De la vista nace. *Tecnología de Alimentos*. Industria y Mercado. México. 32(2):26-34.

Tsimidu, M. y Tsatsaroni, E. (1993). Stability of saffron pigments in aqueous extracts. *Journal Of Food Science*. 58:5:1073-1075.

Tsung-Lung y Liu, G. (1999). Evaluation of the potential chemopreventive agents in chinese herbs against liver cancer. Taiwan. <http://www.ccmp.gov.tw/ae/4-84-19e.htm> Fecha de acceso 03 de Julio.

Valencia, O. C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. Tercera edición. Ed. Trillas, México. p.p.202..

- Valle, V. P. (1986). Toxicología de alimentos. Centro Panamericano de Ecología y Salud. Primera edición. Organización Panamericana de la salud. México. p.p. 260.
- Vargas, S.G, Maldonado, M.F., Sol, S.A. y Molina, M.R.F. (1992). Frutales tropicales de Tabasco. Descripción general y usos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. p.p.100.
- Wagner, L.A. y Warthesen J.J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. Journal Of Food Science. 60:5:1048-1051.
- Waters. (1997). PDA detector 996. Operator's guide. U.S.A. cap 4 1-7.
- Waters Catalog. (1999) Chromatography columns and supplies catalog. U.S.A. 52-75.
- Watty, M. B. (1982). Química Analítica. Ed. Alhambra Universidad. México, D.F. Primera Edición. p.p. 427-435.
- Weissenberg, M., Schaeffler, I., Menagem, E., Barzilai, M. y Levy, A. (1997). Isocratic non-aqueous reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of capsanthin and capsorubina in red peppers (*Capsicum annum L.*), paprika and oleoresin. Journal Of Chromatography Abstracts, 757:89-95.
- Williams, D.G. Quercetin. (1999). <http://www.immunesupport.com/94spr003.htm>. Fecha de acceso 12 de Noviembre.
- Wills, R.B.H. y Rangga, A. (1996). Determination of carotenoids in chinese vegetables. Food Chemistry, 56:4:451-455.
- Woodall A. A., Lee S. W., Weesie R.J., Jackson J.M. y Britton G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. Biochimica Et Biophysica Acta. 1336:33-42.
- Yanun A. (1999). Ingredientes: Un Festín para los Sentidos. Alimentos Procesados. 10:22-24.
- Yen, W. J. y Chen, H.B. (1995). Isolation of xanthophylls from Taiwanese orange peels and their effects on the oxidation stability of soybean oil. Food Chemistry, 53:417-425.
- Yitzhak, I., Kanner, J. y Granit, R. (1993). Hydrolysis study of carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum L.* variety Lehava) by HPLC/photodiode array detection. Journal of Agricultural And Food Chemistry. 41: 899-901.
- Zamora, R., Hidalgo, F.J. y Tappel I. A.. (1991) Journal Of Nutrition. 121:50.

ANEXOS

ANEXO 1. Efecto de la extracción de hoja de Almendro, con disolventes orgánicos. Análisis de varianza.

a) Extracción con éter de petróleo-acetona

Estadísticas de regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.9749
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9505
R ² ajustado	0.9274
Error típico	0.0748
Número de observaciones	60

Análisis de varianza.

	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F	Valor crítico F
Regresión	6	5.8117	173.1024	5.4450E-33
Residuos	54	0.3021		
Total	60	6.1139		

Coefficientes de regresión

β	coeficiente	t	F	Valor crítico de F
Intersección	0	n/a	n/a	n/a
100-0	0.1195	5.0517	0.0720	5.3355E-06
90-10	0.2424	10.2471	0.1949	2.8607E-14
80-20	0.6066	25.6433	0.5591	6.5285E-32
70-30	1.017	42.9925	0.9695	1.8771E-43
60-40	0.8331	35.2183	0.7856	6.1948E-39
50-50	0.5934	25.0853	0.5459	1.9567E-31

b) Extracción con hexano-acetona

Estadísticas de regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.9660
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9331
R ² ajustado	0.9084
Error típico	0.0688
Número de observaciones	60

Análisis de varianza.

	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F	Valor crítico F
Regresión	6	3.5790	125.7170	1.56040E-29
Residuos	54	0.2562		
Total	60	3.8352		

Coefficientes de regresión

β	coeficiente	t	F	Valor crítico de F
Intersección	0	n/a	n/a	n/a
100-0	0.174	7.9880	0.1303	1.0314E-10
90-10	0.3662	14.9752	0.2825	7.1337E-21
80-20	0.4608	21.1544	0.4171	8.4064E-28
70-30	0.5793	26.9925	0.5356	1.0524E-32
60-40	0.956	43.8881	0.9123	6.3562E-44
50-50	0.5817	26.7047	0.5380	8.5501E-33

c) Extracción con sistemas acetona-hexano, hexano-acetona-etanol-tolueno, acetona-isopropanol, acetona éter de petróleo y acetona.

Estadísticas de regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.9550
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9557
R ² ajustado	0.9043
Error típico	0.0789
Número de observaciones	40

Análisis de varianza.

	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	F	Valor crítico F
Regresión	5	1.1129	2.6647	0.0388
Residuos	35	2.9237		
Total	40	4.0367		

Coefficientes de regresión

β	coeficiente	t	F	Valor crítico de F
Intersección	0	n/a	n/a	n/a
Acetona-hexano (1:1)	0.8212	8.0368	0.6138	1.8493E-09
Hexano-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7)	0.870	8.5139	0.6625	4.7787E-10
Acetona-isopropanol	1.0887	10.6546	0.8813	1.5721E-12
Acetona-éter de petróleo	1.2875	12.5996	1.0800	1.4519E-14
Acetona 99%	1.05	10.2754	0.8425	4.1443E-12

Error

An error occurred while processing this page. See the system log for more details.

ANEXO 3. Areas de picos de estándares empleados para análisis de carotenoides por HPLC.

a) 8' apo-β-carotenal

concentración (µg/mL)	área bajo la curva
1.2	15 123 785.81
0.96	12 583 892.24
0.77	10 573 143.16
0.61	8 879 880.78
0.49	7 609 933.90

A = 2 424 317.9
B = 10 582 889.8
r= 0.995

b) β-caroteno.

concentración (µg/L)	área bajo la curva
12.00	30 274 534.41
7.20	17 535 103.36
4.30	9 838 363.77
2.59	5 299 941.46

A = - 1 574 043.21
B = 2 654 048.13
r= 0.99730

c) zeaxantina

Concentración (µg/mL)	área bajo la curva.
6.08	7 071 856.30
4.86	5 728 932.25
3.89	4 661 197.54
3.11	3 802 606.74
2.49	3 120 137.14

A = 379 251.13
B = 1 100 757.43
r = 0.991

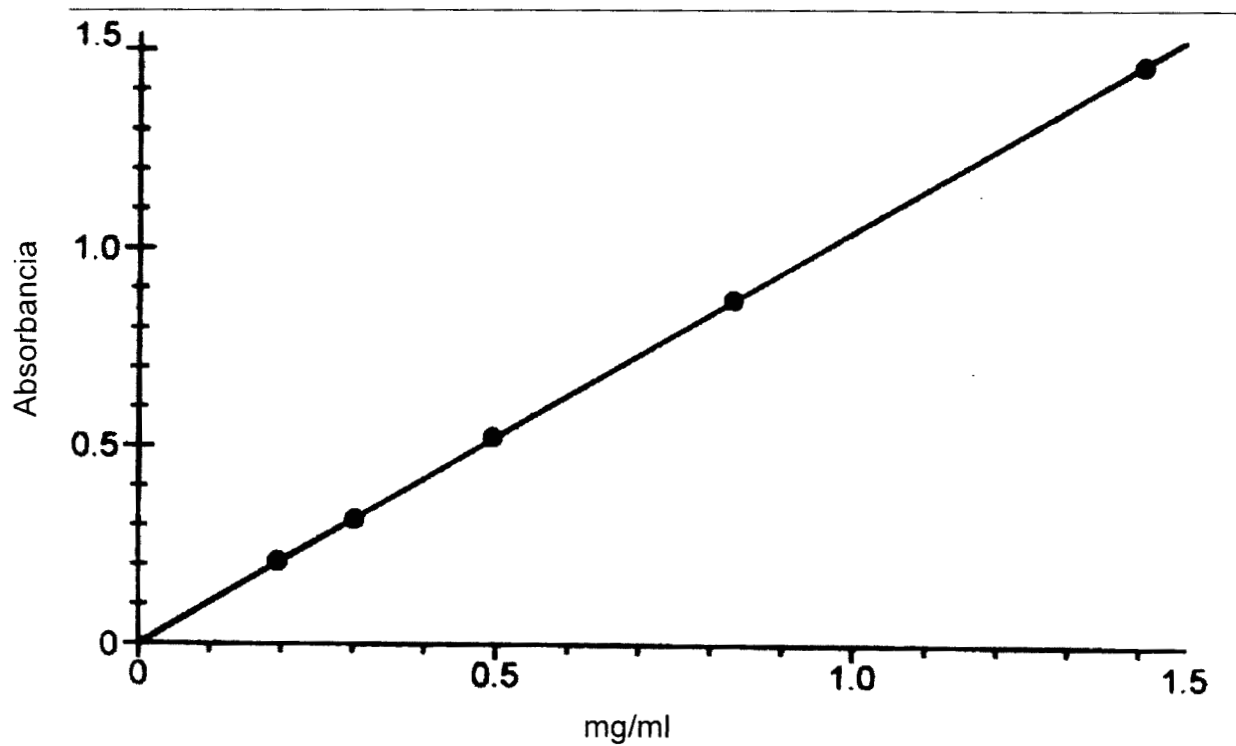
d) cantaxantina.

concentración (µg/mL)	área bajo la curva
3.60	47 568 724
2.50	28 982 184.
2.00	20 533 757
1.44	11 071 519
1.00	3 636 903.17

A = - 13 259 951
B = 16 896 854.17
r = 0.99999

ANEXO 4. Curva estándar para el análisis de quercetina.

$$y = 1.049 X; \sigma^2 = 0.0030008$$



ANEXO 5. Estabilidad de extractos de hoja de almendra: análisis de varianza.

a) Sin antioxidante, a los 10 días de almacenamiento.

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	grados de libertad	
Ambiente gaseoso	0.045	36	0.0709
temperatura	0.086	36	0.0036
iluminación	0.019	36	0.235
Ambiente x temperatura	0.0037	36	0.752
Ambiente x iluminación	0.0027	36	0.653
Temperatura x iluminación	0.0022	36	0.842
Ambiente x temperatura x iluminación.	0.0091	36	0.504

b) Sin antioxidante, a los 20 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	grados de libertad	
Ambiente gaseoso	3.59675	36	0.000000
Temperatura	5.29908	36	0.000000
Iluminación	31.70375	36	0.000000
Ambiente x temperatura	0.10261	36	0.190985
Ambiente x iluminación	0.17885	36	0.090659
Temperatura x iluminación	1.31206	36	0.000001
Ambiente x temperatura x iluminación.	0.06083	36	0.367954

c) Sin antioxidante, a los 30 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	grados de libertad	
Ambiente gaseoso	2.61800	36	0.000000
temperatura	11.31391	36	0.000000
iluminación	49.51172	36	0.000000
Ambiente x temperatura	0.21308	36	0.003216
Ambiente x iluminación	0.00092	36	0.865391
Temperatura x iluminación	1.93362	36	0.000000
Ambiente x temperatura x iluminación.	0.12883	36	0.025135

d) Con antioxidante (BHT), a los 10 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	grados de libertad	
Ambiente gaseoso	0.325052	36	0.000000
Temperatura	0.211952	36	0.000000
Iluminación	0.016502	36	0.002110
Ambiente x temperatura	0.002127	36	0.256165
Ambiente x iluminación	0.007252	36	0.034598
Temperatura x iluminación	0.002265	36	0.235387
Ambiente x temperatura x iluminación.	0.003665	36	0.101681

e) Con antioxidante (BHT), a los 20 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	Grados de libertad	
Ambiente gaseoso	9.09150	36	0.000000
Temperatura	14.47439	36	0.000000
Iluminación	8.50925	36	0.000000
Ambiente x temperatura	0.00783	36	0.850210
Ambiente x iluminación	0.06092	36	0.267467
Temperatura x iluminación	0.38193	36	0.001378
Ambiente x temperatura x iluminación.	1.98113	36	0.000000

f) Con antioxidante (BHT), a los 30 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u>		P>
	Cuadrado medio	Grados de libertad	
Ambiente gaseoso	6.38021	36	0.000000
Temperatura	27.42381	36	0.000000
Iluminación	7.58430	36	0.000000
Ambiente x temperatura	1.61701	36	0.000000
Ambiente x iluminación	0.50021	36	0.000419
Temperatura x iluminación	1.76297	36	0.000000
Ambiente x temperatura x iluminación.	0.39693	36	0.000102

ANEXO 6. Estabilidad del extracto de hoja de Almendro: comparación de medias de Duncan.

a) Considerando las fuentes de variación

Fuente de variación		Valores medios ^{a,b}		
Adición de antioxidante	Si	No		
	5.113 ^a	4.010 ^b		
Temperatura (°C)	40	4	62	25
	4.945 ^a	4.707 ^b	4.612 ^b	4.201 ^c
Iluminación	oscuridad	luz		
	4.948 ^a	4.124 ^b		
Tiempo de almacenamiento (días)	0	10	20	30
	5.737 ^a	5.260 ^b	4.024 ^c	3.259 ^d

^{a,b} Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes

b) Considerando las cuatro condiciones de almacenamiento

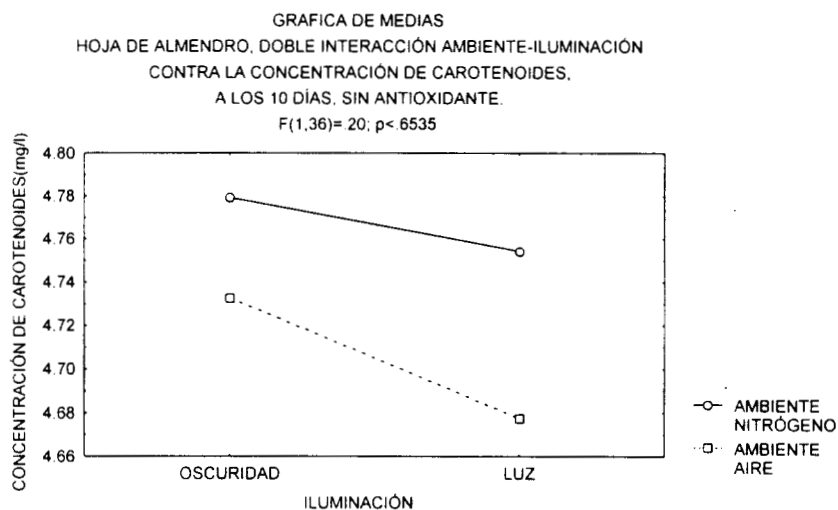
Condición*	Fuente de variación	Valores medios ^{a,b,c}			
I	Temperatura (°C)	40	4	25	
		5.360 ^a	4.898 ^b	3.896 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	0	10	20	30
		6.890 ^a	5.650 ^b	3.627 ^c	2.268 ^d
II	Temperatura (°C)	4	40	20	30
		5.797 ^a	5.570 ^b	5.444 ^c	4.856 ^d
	Tiempo de almacenamiento (días)	0	10	20	30
		6.590 ^a	5.635 ^b	4.914 ^c	4.447 ^d
III	Temperatura (°C)	40	4	25	
		4.025 ^a	3.405 ^b	2.846 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	0	10	20	30
		4.720 ^a	4.698 ^a	2.835 ^b	1.174 ^c
IV	Temperatura (°C)	4	40	25	62
		4.550 ^a	4.439 ^{ab}	4.387 ^{ab}	4.368 ^b
	Tiempo de almacenamiento (días)	0	10	20	30
		4.720 ^a	4.698 ^a	4.212 ^b	4.065 ^b

^{a,b,c} medias con diferentes letras son significativamente diferentes

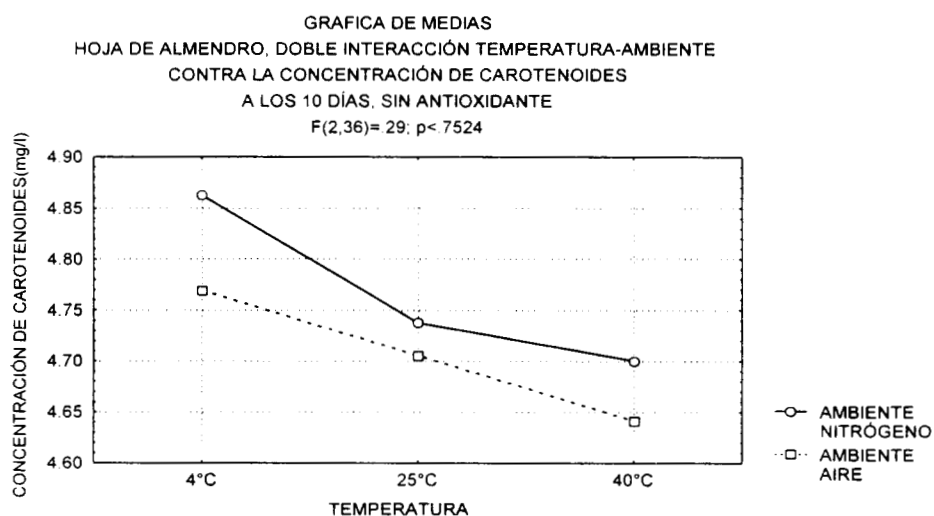
- * I con antioxidante-luz
- II con antioxidante-oscuridad
- III sin antioxidante-luz
- IV sin antioxidante-oscuridad

ANEXO 7. Estabilidad de extractos de hoja de almendro : Interacciones dobles y triples.

PRIMERA PRUEBA DE ESTABILIDAD A PIGMENTOS DE HOJA DE ALMENDRO (*T. catappa*).

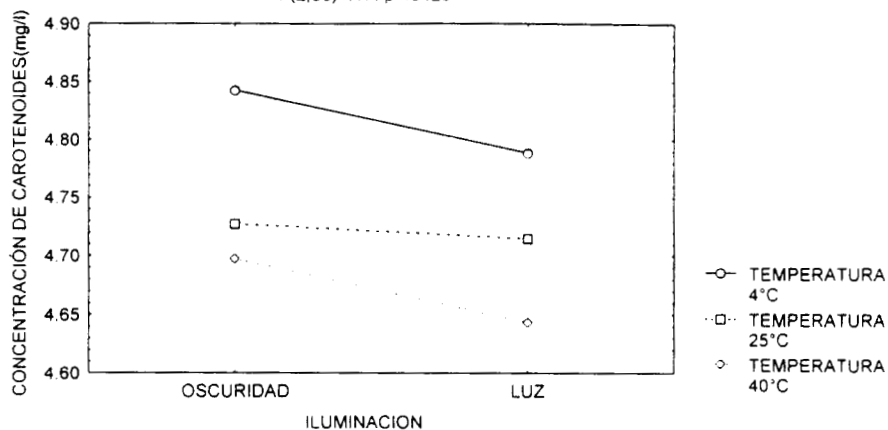


Doble interacción Iluminación-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 10 días, sin antioxidante.



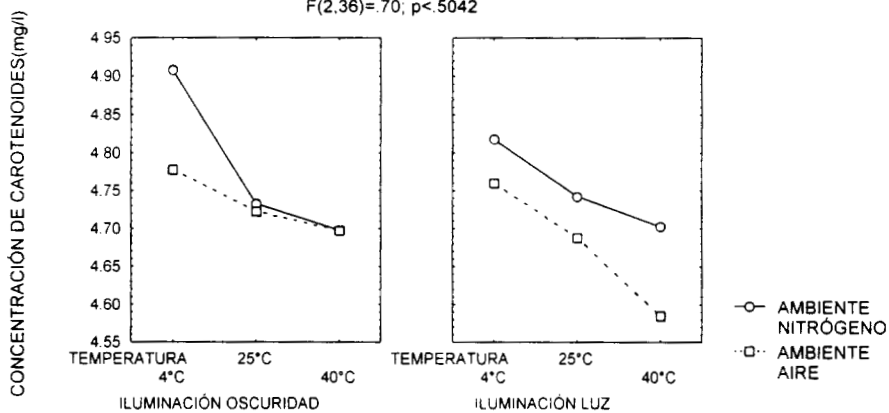
Doble interacción Temperatura-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 10 días, sin antioxidante.

HOJA DE ALMENDRO. DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES(mg/l),
 A LOS 10 DÍAS, SIN ANTIOXIDANTE
 $F(2,36)=.17$; $p<.8425$

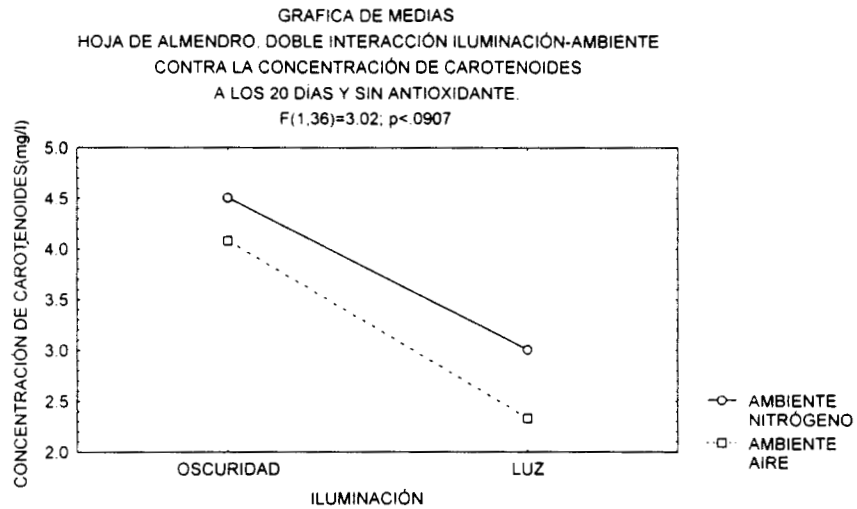


Doble interacción Iluminación-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 10 días, sin antioxidante.

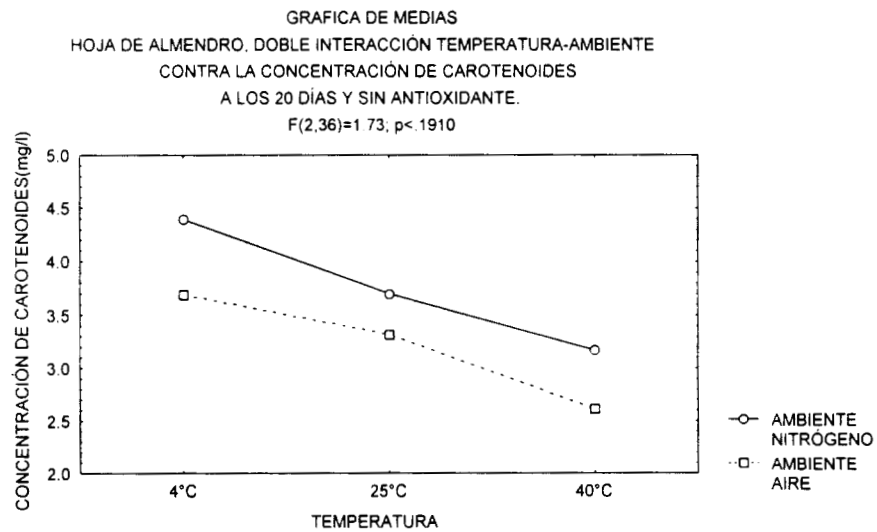
GRAFICA DE MEDIAS.
 HOJA DE ALMENDRO, TRIPLE INTERACCIÓN ILUMINACIÓN-AMBIENTE-TEMPERATURA
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES,
 A LOS 10 DÍAS, SIN ANTIOXIDANTE
 $F(2,36)=.70$; $p<.5042$



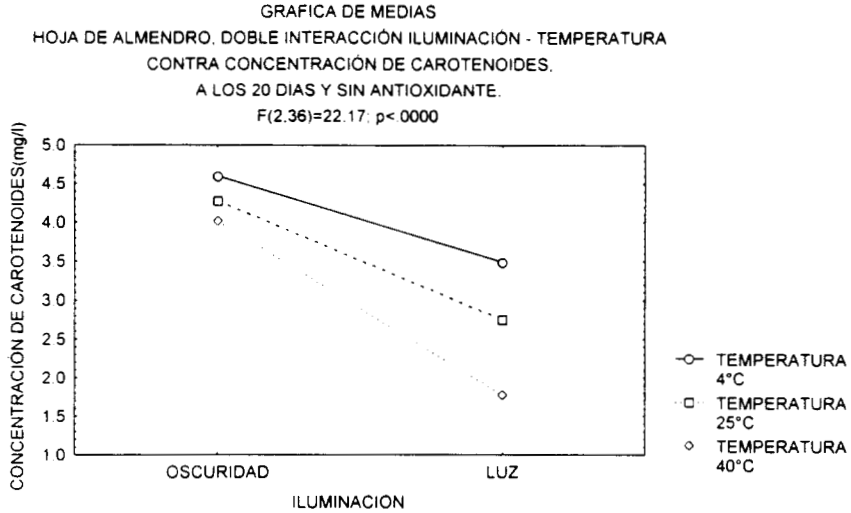
Triple interacción Iluminación-Ambiente-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 10 días, sin antioxidante.



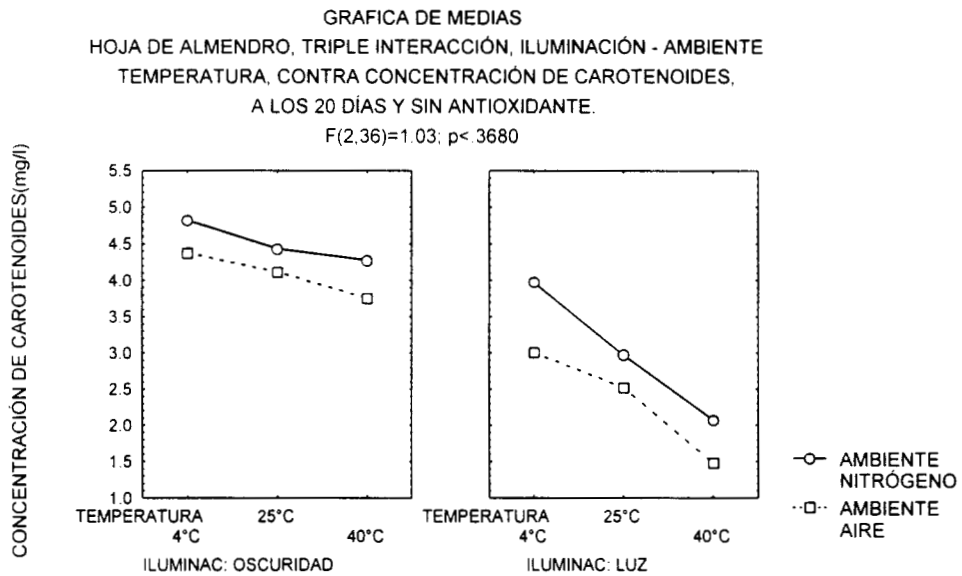
Doble interacción Iluminación-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 20 días, sin antioxidante.



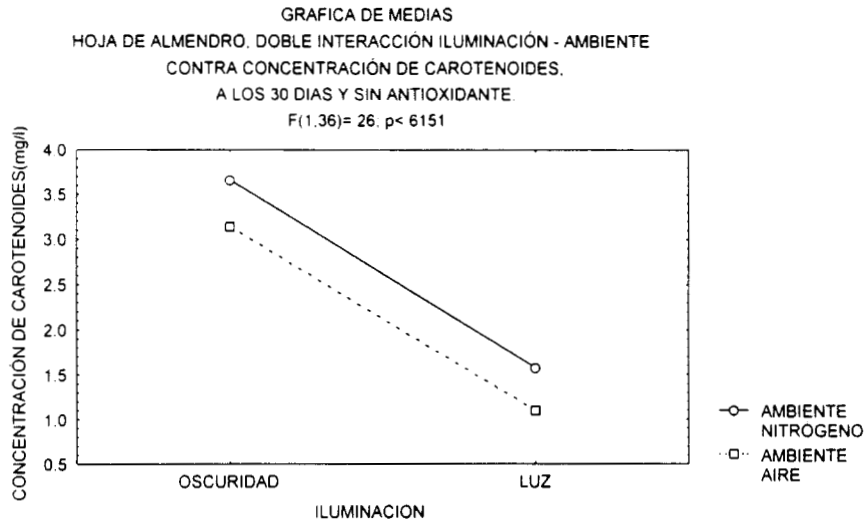
Doble interacción Temperatura-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 20 días, sin antioxidante.



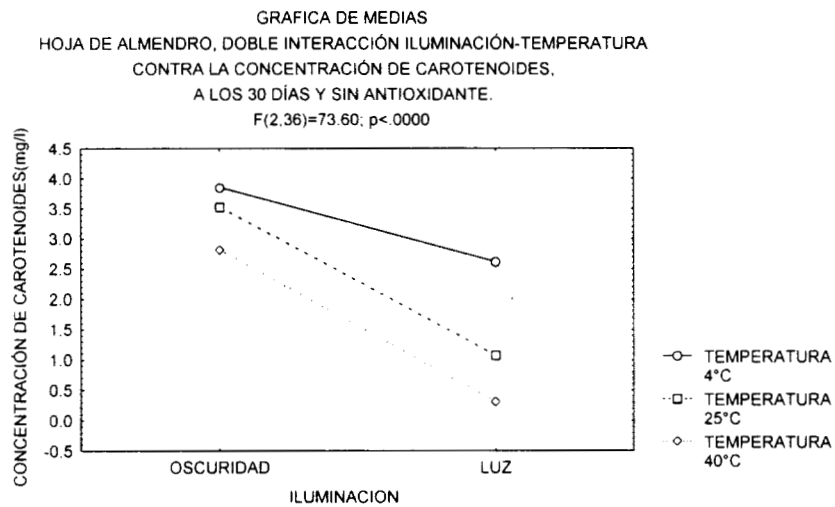
Doble interacción Iluminación-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 20 días, sin antioxidante.



Triple interacción Iluminación-Ambiente- Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 20 días, sin antioxidante.

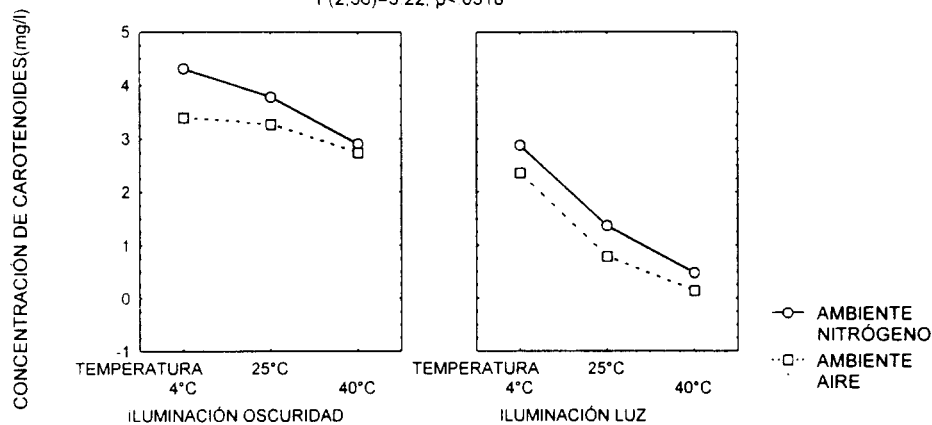


Doble interacción Iluminación-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 30 días, sin antioxidante.

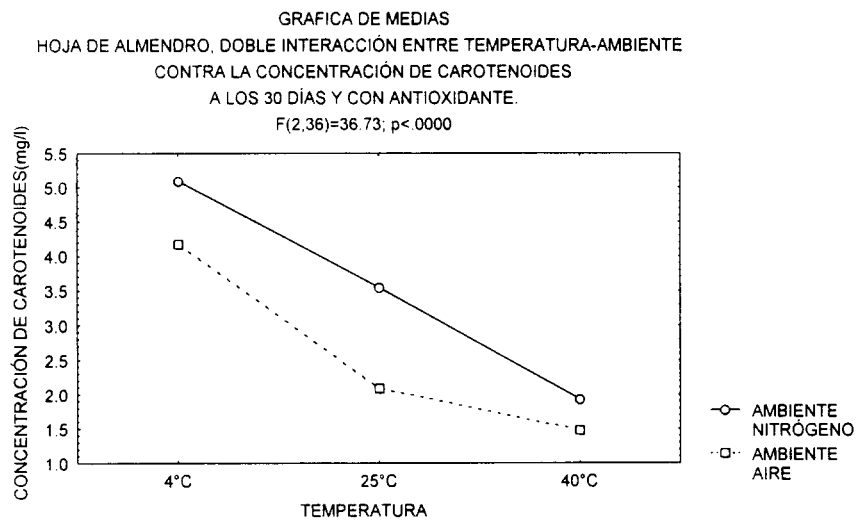


Doble interacción Iluminación-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 30 días, sin antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO. TRIPLE INTERACCIÓN AMBIENTE-ILUMINACIÓN-TEMPERATURA. CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES.
 A LOS 30 DÍAS SIN ANTIOXIDANTE.
 $F(2,36)=3.22$, $p < 0.0518$

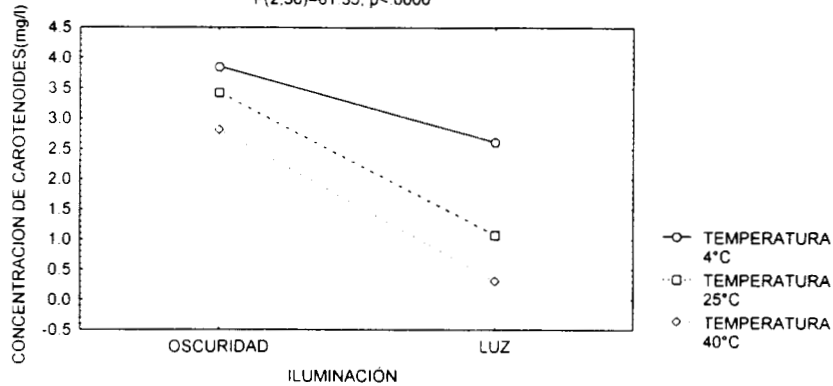


Triple interacción Iluminación-Ambiente-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 30 días, sin antioxidante.



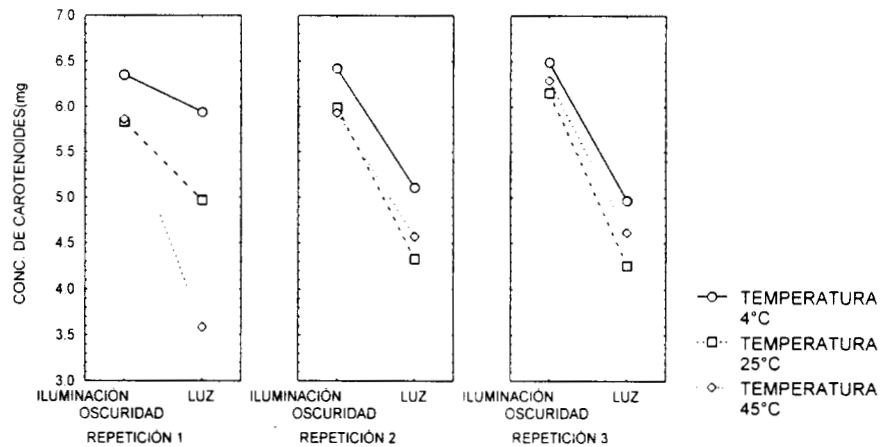
Doble interacción Temperatura-Ambiente de extracto de hoja de almendro a los 30 días, con antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO. DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES
 A LOS 30 DÍAS Y CON ANTIOXIDANTE
 $F(2,36)=61.35; p<.0000$



Doble interacción Iluminación-Temperatura de extracto de hoja de almendro a los 30 días, con antioxidante.

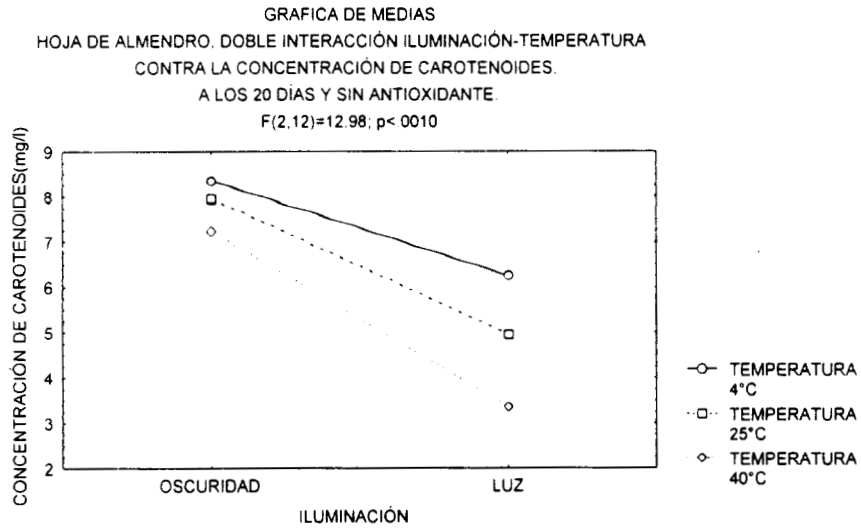
GRAFICA DE MEDIAS
 PRUEBA DE ESTABILIDAD. TRIPLE INTERACCIÓN. DE LA HOJA DE ALMENDRO
 CON ANTIOXIDANTE, 20 DÍAS



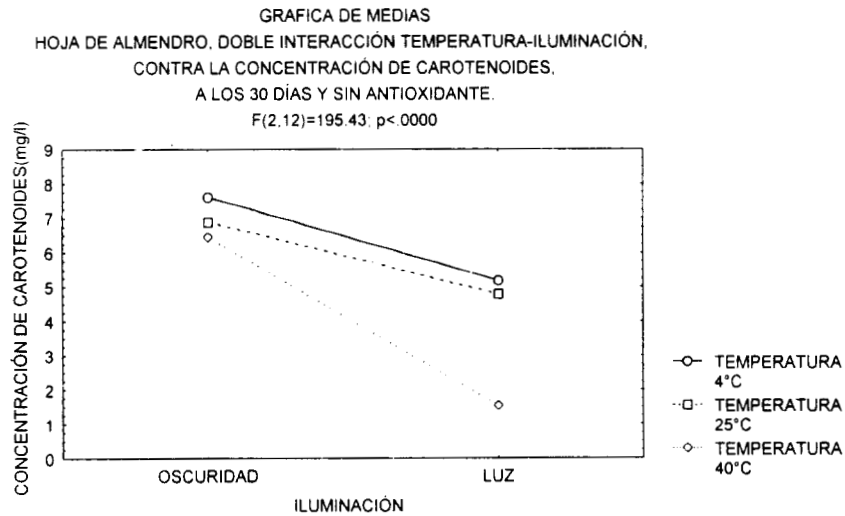
Triple interacción Iluminación-Ambiente-temperatura del extracto hoja de almendro, a los 20 días y con antioxidante.

**ANEXO 8. Estabilidad de extractos de hoja de almendro, en aceite de ajonjolí:
Interacciones dobles y triples.**

**SEGUNDA PRUEBA DE ESTABILIDAD A PIGMENTOS DE HOJA DE ALMENDRO
(*T. catappa*).**



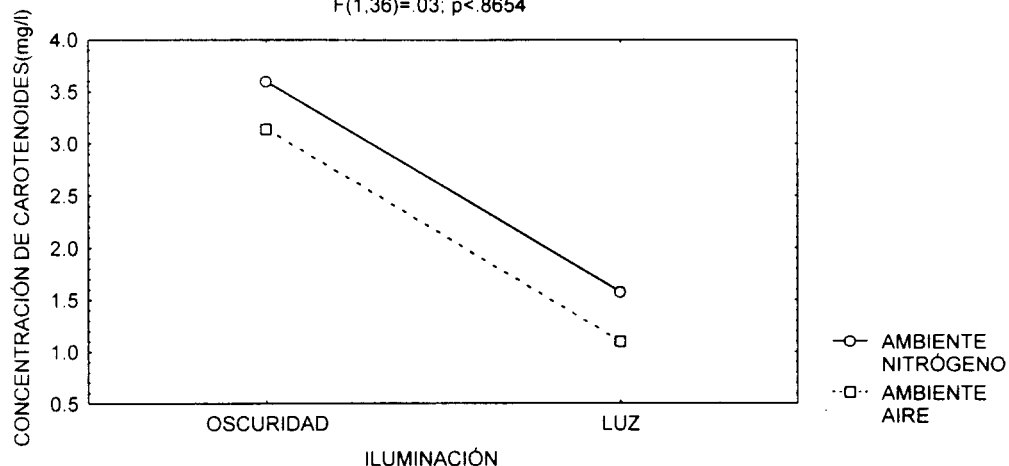
Doble interacción Iluminación-Temperatura, para el extracto de hoja de almendro a los 20 días y sin antioxidante.



Doble interacción Iluminación-Temperatura, del extracto de hoja de almendro a los 30 días y sin antioxidante

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO, DOBLE INTERACCIÓN AMBIENTE-ILUMINACIÓN,
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES
 A LOS 30 DÍAS Y CON ANTIOXIDANTE.

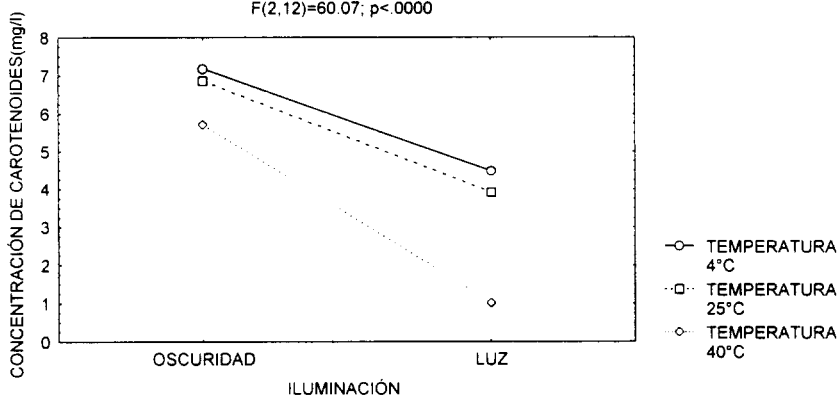
$F(1,36)=.03; p<.8654$



Doble interacción ambiente - Iluminación, del extracto de hoja de almendro a los días 30 días y con antioxidante.

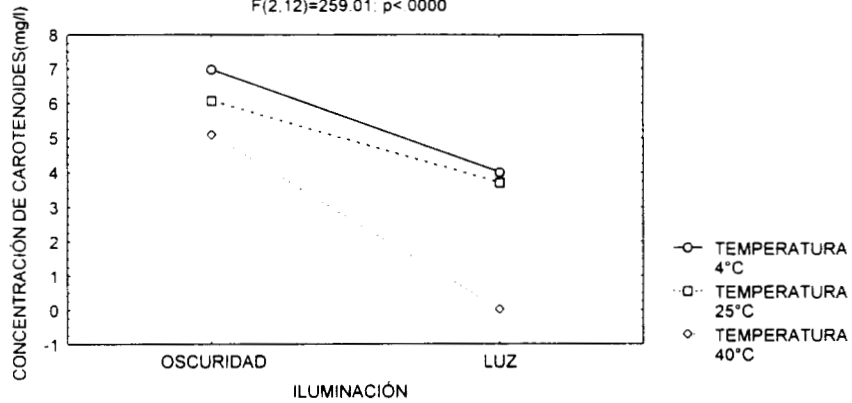
GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO, DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN,
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES,
 A LOS 40 DÍAS Y SIN ANTIOXIDANTES.

$F(2,12)=60.07; p<.0000$



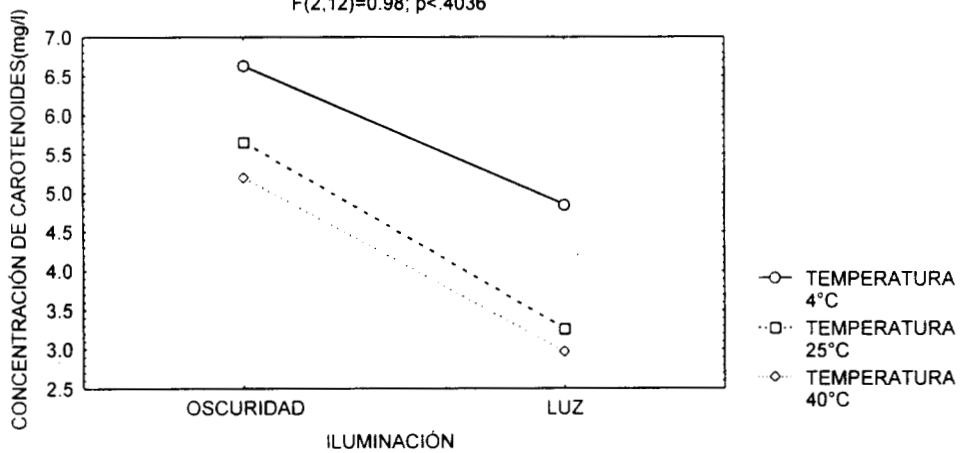
Doble interacción temperatura-iluminación, del extracto de hoja de almendro a los 40 días y con antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO, DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES.
 A LOS 50 DÍAS Y SIN ANTIOXIDANTE.
 $F(2,12)=259.01; p < 0000$



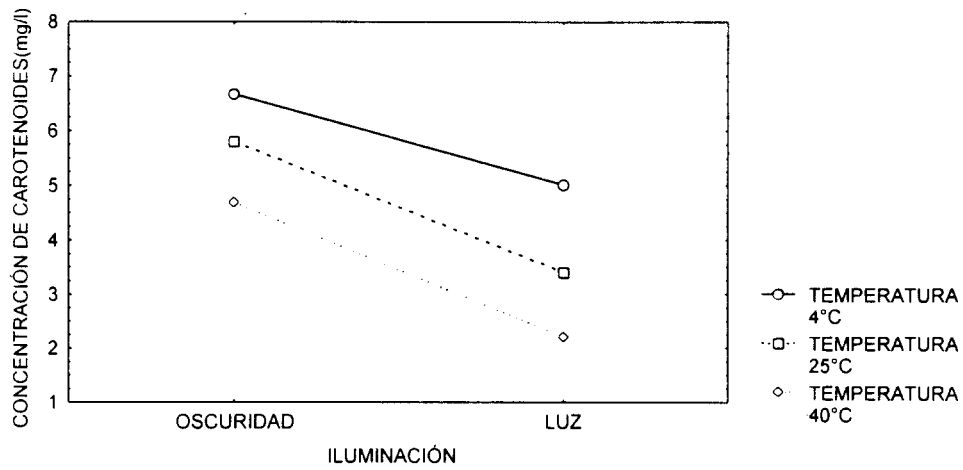
Doble interacción Temperatura-Illuminación del extracto de hoja de almendro a los 50 días y sin antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS.
 HOJA DE ALMENDRO, DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES.
 A LOS 30 DÍAS Y CON ANTIOXIDANTE.
 $F(2,12)=0.98; p < .4036$



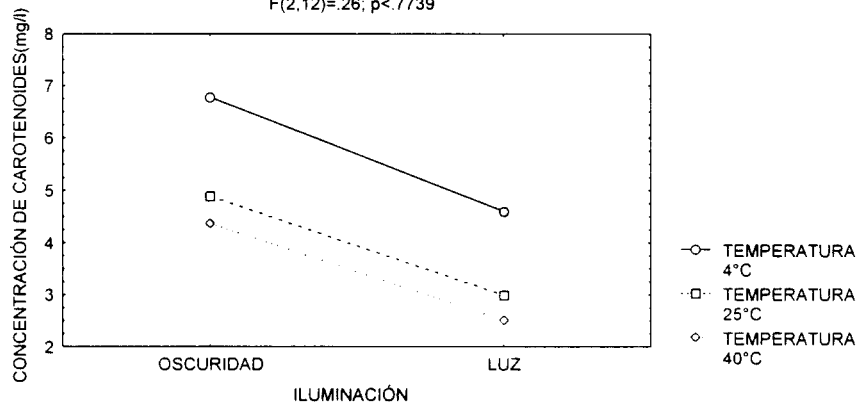
Doble interacción Temperatura-Illuminación del extracto de hoja de almendro a los 30 días y con antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO. DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-ILUMINACIÓN
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES
 A LOS 40 DÍAS. CON ANTIOXIDANTE.



Doble interacción Temperatura-Iluminación del extracto de hoja de almendro, a los 40 días y con antioxidante.

GRAFICA DE MEDIAS
 HOJA DE ALMENDRO. DOBLE INTERACCIÓN TEMPERATURA-LUZ,
 CONTRA LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES
 A LOS 50 DÍAS Y CON ANTIOXIDANTE.
 $F(2,12) = .26, p < .7739$



Doble interacción Iluminación - Temperatura del extracto de hoja de almendro, a los 50 días y con antioxidante.

**ANEXO 9. Estabilidad de extracto de hojas de Almendro, en aceite de ajonjolí:
comparación de medias de Duncan**

a) Considerando las fuentes de variación.

Fuente de variación		Valores medios ^{a,b,c}			
Adición de antioxidante	Si	No			
		4.762 ^a	5.020 ^b		
Temperatura (°C)	4	25	40		
		6.021 ^a	5.102 ^b	3.550 ^c	
Iluminación	oscuridad	luz			
		6.110 ^a	3.712 ^b		
Tiempo de almacenamiento (días)	20	30	40	50	
		5.856 ^a	5.123 ^b	4.489 ^c	3.855 ^d

^{a,b,c} Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes

b) Considerando las cuatro condiciones de almacenamiento.

Condición**	Fuente de variación	Valores medios*			
I	Temperatura (°C)	40	4	25	
		4.950 ^a	3.541 ^b	2.984 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	20	30	40	50
		4.710 ^a	3.792 ^b	3.538 ^c	3.262 ^d
II	Temperatura (°C)	4	25	40	
		6.623 ^a	5.583 ^b	4.888 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	20	30	40	50
		6.020 ^a	5.891 ^b	5.658 ^c	5.224 ^d
III	Temperatura (°C)	4	25	40	
		4.982 ^a	4.338 ^b	1.48 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	20	30	40	50
		4.848 ^a	3.831 ^b	3.138 ^c	2.584 ^d
IV	Temperatura (°C)	4	25	40	
		7.528 ^a	6.944 ^b	4.848 ^c	
	Tiempo de almacenamiento (días)	20	30	40	50
		7.849 ^a	6.978 ^b	6.586 ^c	4.348 ^d

^{a,b,c} medias con diferentes letras son significativamente diferentes

- * I con antioxidante-luz
- II con antioxidante-oscuridad
- III sin antioxidante-luz
- IV sin antioxidante-oscuridad

**ANEXO10. Estabilidad de extractos de hojas de almendro en aceite de ajonjolí:
Análisis de varianza.**

a) Sin antioxidante, a los 20 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
Temperatura	6.07965	12	0.000000
Iluminación	40.53001	12	0.000000
Temperatura x iluminación	1.18411	12	0.000997

b) Sin antioxidante, a los 30 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	9.53431	12	0.000000
iluminación	44.55680	12	0.000000
Temperatura x iluminación	3.53722	12	0.000000

c) Sin antioxidante, a los 40 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	10.41540	12	0.000000
iluminación	53.49227	12	0.000000
Temperatura x iluminación	1.76136	12	0.000001

d) Sin antioxidante, a los 50 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	14.48281	12	0.000000
iluminación	53.71661	12	0.000000
Temperatura x iluminación	3.04665	12	0.000000

e) Con antioxidante, a los 20 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	2.508800	12	0.000531
iluminación	7.761800	12	0.000018
Temperatura x iluminación	0.088800	12	0.599633

f) Con antioxidante, a los 30 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	4.90560	12	0.000167
iluminación	19.82401	12	0.000001
Temperatura x iluminación	0.23216	12	0.422685

g) Con antioxidante, a los 40 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	6.94191	12	0.000003
iluminación	20.22480	12	0.000001
Temperatura x iluminación	0.14405	12	0.422685

h) Con antioxidante, a los 50 días de almacenamiento

<u>Fuente de variación</u>	<u>Error</u> cuadrado medio	grados de libertad	P>
temperatura	7.83802	12	0.000011
iluminación	17.32642	12	0.000002
Temperatura x iluminación	0.05041	12	0.806252

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Characterization and Stability of Pigments Extracted from *Terminalia Catappa* Leaves

E. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E. PONCE-ALQUICIRA, F. CRUZ-SOSA, I. GUERRERO-LEGARRETA

ABSTRACT: *Terminalia catappa* is a tree growing in Southeast Mexico; its leaf color ranges from red to yellow and it is a potential source of natural pigments. Petroleum ether:acetone and hexane:acetone were used for pigment extraction. The maximum extraction was 24 mg/100 g of leaves with 70:30 petroleum ether:acetone. Seven pigments were identified in the extracts (violaxanthin, violeoxanthin, lutein epoxide, lutein, two lutein isomers and β -cryptoxanthin). A lower pigment concentration was obtained in saponified than in unsaponified extracts. Antioxidant-free extracts underwent deterioration when stored under light. Conversely, pigments remained stable after 10 days at 40 °C, provided they were preserved with 0.1% BHT and stored in the dark.

Keywords: carotenoids, *Terminalia catappa*, solvent extraction, stability

Introduction

THERE IS A WORLDWIDE AND GROWING INTEREST IN NATURAL colorants, as they are considered suitable for various applications in foods, pharmaceuticals and cosmetics (López-Hernández and others 1993). Studies reported in the literature demonstrate that a number of synthetic colorants are toxic, causing hepatic alterations, excessive sensitivity and behavioral disturbances (Baublis and others 1994; Giusti and Wrolstad 1996; Gao and Mazza 1996).

Among natural colorants, carotenoids have been widely accepted due to their coloring properties as well as for their nutraceutical properties such as ulcer and cancer prevention (Adewussi and Bradbury 1993; Yen and Chen 1995); protection of the gastric mucosa (Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez 1993); and aging prevention (Willis and Ranga 1996).

Our study focused on the extraction of carotenoids from *Terminalia catappa*, a widely distributed tree growing in Southeast Mexico, mainly used for ornamental purposes, although of no commercial use. Its common name is "almedro tropical" (tropical almond), a *Combretaceae*, native of Malaysia and widely distributed in the tropics. Its leaves are approximately 25 cm long and purplish-red when fully ripened turning yellow during senescence; it has small white flowers and 5 cm long ovoid, reddish drupe fruit with an edible almond (Cano and Marroquín 1994). The objective of this work was to define the best extraction method using organic solvents, as well as to identify the pigments in saponified and unsaponified extracts. Pigment stability was also followed throughout the study in extracts with and without BHT, at 2 illumination conditions (light and darkness) and 4 temperatures.

Materials and Methods

Raw material

Leaves of *Terminalia catappa* were collected when the predominant color was red, from January through March in Villahermosa, Southern Mexico. Due to the fact that there was abundant supply of *T. catappa* leaves, samples were collected early in the morning and immediately processed, without the need of storage before analysis.

Protein and lipid analysis

Protein content was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as standard (Robyt and White, 1990) using a standard curve ($Y = 0.052 + 0.004153x$; $r = 0.98$) reading at 750 nm. Protein content was important as protein-pigment complex could be formed making extraction difficult. Lipid content was determined according to the method reported in AOAC (1980).

Carotenoid extraction

To fresh leaves (30 g, 59.7 % moisture) were added 0.1% BHT, 3 g CaCO_3 , 10 g anhydrous Na_2SO_3 and 400 mL of a solvent system, according to the method reported by Cano (1991). Samples were then homogenized in a Waring blender for 15 s. Different mixtures of petroleum ether-acetone and of hexane-acetone were used as extraction systems (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100). Each extraction was repeated 10 times. The extracted pigments were purified using low-pressure chromatography with a silica gel column (40 to 140 mesh, Baker, Mexico City) and hexane-ethyl acetate (50:50) in a first elution and methanol-hexane (80:20) in a second elution. After the extraction, the samples were left in the dark for 2.5 h in order to achieve complete pigment extraction while preventing oxidation due to light incidence.

Total carotenoid content was analyzed using a Genesys 2PC spectrophotometer (Genesys Co., Rochester, NY) according to the method reported by Hart and Scott (1995). A standard curve ($Y = 0.0283 + 212.343x$; $r = 0.9996$) was used. Maximum absorbance was fixed at 450 nm after wavelength scanning in the visible range of the 60:40 hexane-acetone extracts and expressed as total xanthophylls. Absorbance at the various solvent proportions was obtained for the 2 solvent systems. The maximum absorbance was considered as the best extraction.

Pigment saponification

Half of each concentrated sample was saponified with KOH-20% methanol in aqueous solution at room temperature followed by 1 hour standing in the dark. The methanol phase was extracted with n-hexane, and the organic phase was

Table 1—Conditions used in HPLC analysis of carotenoids

Time (min)	% water	% acetone
0	25	75
10	25	75
15	25	75
20	5	95
27	5	95
32	25	75
37	25	75

washed with water until alkaline-free at pH = 7 (Lasellier and others 1993; Hart and Scott 1994). The maximum absorbance of saponified and unsaponified extracts was then obtained.

HPLC analysis

The pigments present were identified in the extracts after filtration and concentration at under vacuum (Rivas 1989). The extracts were then filtered through 0.45- μ membranes before injection. R_f values obtained from the analysis were compared to R_f values reported in the literature (Table 2) in analysis carried out under similar conditions. Pigment concentration was calculated from a standard curve ($Y = 0.08347 + 75.283x$; $r = 0.9763$) correlating peak areas and α -carotene concentration in the same solvent system as standard. A Waters HPLC, model 2487, fitted with a diode arrangement detector and Millennium software, was used; the column was a reverse-phase Waters Symmetry C18, 5 mm particle size, 4.6 mm internal diameter, 250 mm length fitted with a pre-column of the same material (5 cm length \times 4 mm I.D.). The analytical conditions were: 1.5 mL/min flow rate, 20 μ L injection volume and detection at 450 nm, using the acetone-water gradient shown in Table 1, and a total time of analysis of 40 min. A 25/75 water/acetone gradient was used to re-equilibrate the column for the next run.

Pigment stability

Pigment stability was tested in extracts randomly allocated to the following conditions and levels: antioxidant (0 and 0.1% BHT) (Tsimidou and Tsatsaroni 1993); storage in the dark or under light; temperature (4, 25 and 40 °C) (Giusti and Wrolstad 1996). The lamp used was a daylight-21 cm diameter, 127 V, 60 Hz, 1105 lumen Phillips model TLE 22W (Bangkok, Thailand). An extra storage condition at 60 °C was only applied to samples stored in the dark. Illumination was achieved by using a circular 22-Watt incandescent lamp at 300 mm from the samples (Baublis and others 1994). All samples were stored in the air. Total carotenoid content, expressed as total xanthophylls, was analyzed using a Genesys (Rochester, NY) 2PC spectrophotometer, as described above. The experiment was replicated 4 times. The experimental design was a $2^2 \times 3 \times 4$ complete factorial in a random design for illuminated samples, and a $2^2 \times 4^2$ complete factorial for samples stored in the dark. Data were analyzed using a SAS package (SAS Institute 1989).

Results and Discussion

THE PROXIMATE COMPOSITION OF *TERMINALIA CATAPPA* LEAVES was: water 59.7%; ether extract 3.72%; nitrogen-free extract 31.37%. Total carotenoid content was 36.36 mg/100 g, expressed as total xanthophylls. The maximum extraction yield was obtained using petroleum ether-acetone (70:30) and hexane-acetone (60:40) as shown in Figure 1 measured at 450 nm.

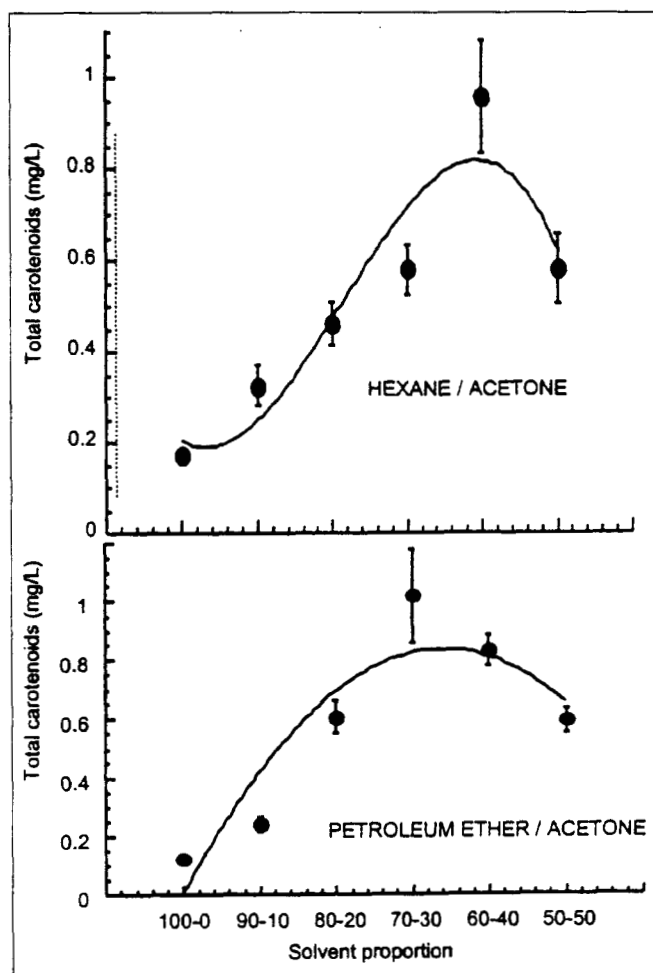
The mean concentration of extracted pigments with these

Table 2— R_f values of carotenoids found in *T. catappa* and in the literature (López-Hernández and others 1993; Fisher and Kocis 1987; Adewusi and Bradbury 1993)

Identified pigments	R_f literature	R_f experimental	λ_{max} literature	λ_{max} experimental
Violaxanthin	0.34	—	420, 443, 462	420, 445, 472
Violeoxanthin	0.39	0.41	419, 444, 469	419, 444, 469
Lutein	0.6	0.63	424, 445, 475	424, 448, 475
Lutein epoxide	0.5	0.49	421, 443, 478	424, 442, 474
Lutein isomer	0.55	0.55	—	—
Lutein isomer	0.56	0.56	—	—
β -Cryptoxanthin	0.85	0.85	422, 450, 476	421, 450, 476

2 systems was 24 mg/100 g of leaves obtained with 70:30 petroleum ether:acetone, as shown in Figure 2. This concentration is much higher than the one found in other plants such as *Amaranthus udinis* (12.6 mg/100g), *Mangifera indica* (2.21 mg/100 g), *Ashirantes aspera* (2.67 mg/100 g) and *Carica papaya* (2.7mg/ 100 g) (Bhaskarachary and others 1995) making *Terminalia catappa* a better carotenoid source than the other plants.

Extraction yields of saponified samples were considerably lower than in unsaponified samples (Figure 2) and higher when petroleum ether:acetone was used. Lasellier and others (1993) concluded that if the sample does not have a high

**Figure 1—Yields of pigments extracted with organic solvents**

chlorophyll concentration, it is advisable not to saponify. This is because during saponification an aldol condensation to β -8' apocarotenal may occur.

Figure 3 shows the results of HPLC; 7 compounds were identified in unsaponified extracts of *T. catappa*: violaxanthin (1), violeoxanthin (2), lutein epoxide (3), lutein (4), lutein isomers (5 and 6) and β -cryptoxanthin (7). Besides comparing retention times of peaks versus standards, values reported in the literature (Table 2) were used to identified the pigments (Fisher and Kocis 1987; López-Hernández and others 1993; Adewusi and Bradbury 1993; Mínguez-Mosquera and Hornero-Méndez 1993; Britton and others 1995). Lycopene, β -carotene, canthaxanthin, γ -carotene and 8'-apo- β -carotenal were absent in saponified or unsaponified extracts.

Figure 3 also shows the effect of saponification on the extracts. There was a decrease in concentration of lutein, violeoxanthin, lutein epoxide and β -cryptoxanthin in saponified extracts. However, no stereochemical changes were observed, in agreement with Chen and Chen (1983). Violaxanthin was not present in saponified samples; lutein isomers were not affected.

Carotenoid degradation occurs at a high rate due to reaction with free radicals originated by lipid oxidation. The oxidation reaction occurs even faster due to the presence of lipoxygenases (Gordon and An 1995). Because of the presence of double bonds, these compounds are highly reactive to

Table 3—Pigment stability. Duncan multiple range tests

Source of variation	Mean values*			
Antioxidant addition	yes	no		
	5.113 ^a	4.010 ^b		
Temperature (°C)	40	4	62	25
	4.945 ^a	4.707 ^b	4.612 ^b	4.201 ^c
Illumination	darkness	light		
	4.948 ^a	4.124 ^b		
Storage time (days)	0	10	20	30
	5.737 ^a	5.260 ^b	4.024 ^c	3.259 ^d

*means with different letters are significantly different

light and oxygen as well as to acid degradation (Chen and Chen 1993).

Pigment stability, expressed as total carotenoid concentration, depends on oxidation and subsequent disintegration of carotenoids. This process always starts in the open end of the molecule before taking place in the β -ionone ring. Double bonds are saturated and the characteristic color disappears. On the other hand, the pigment undergoes autooxidation after reacting with oxygen from the air. The rate at which this reaction takes place depends on the presence of light, as well as pro- and antioxidants. These reactions occur due to coupled lipid-pigment oxidation (Britton and others 1995).

Under these circumstances, all sources of variation (antioxidant addition, temperature, illumination and storage time) as well as interactions were significant ($P > 0.0001$). Table 3 shows Duncan multiple range tests for pigment concentrations. Storage conditions (antioxidant-light, antioxidant-darkness, without antioxidant-light, without antioxi-

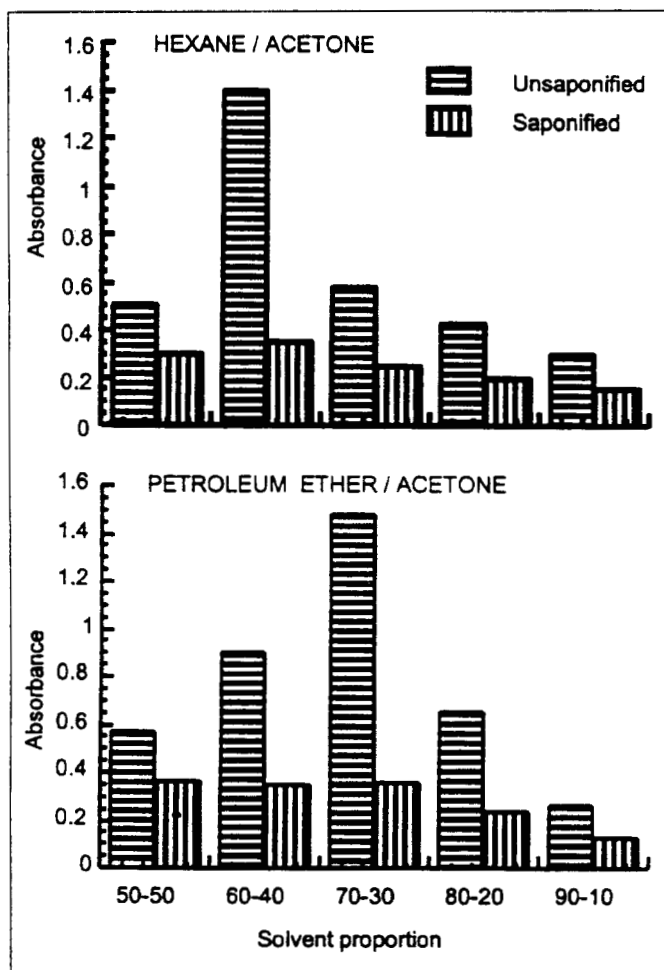


Figure 2—Mean concentration in unsaponified and saponified samples of pigments extracted with organic solvents

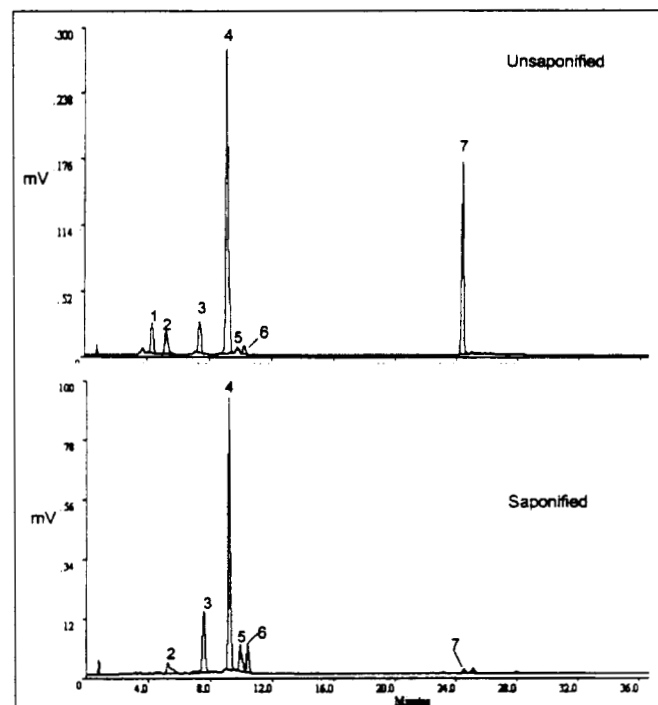


Figure 3—HPLC analysis of carotenoid pigments in extracts 1. violaxanthin; 2. violeoxanthin; 3. lutein epoxide; 4. lutein; 5. lutein isomer; 6. lutein isomer; 7. β -cryptoxanthin

ant-darkness) produced significantly different pigment stability. Table 4 shows Duncan multiple range tests for the 4 storage conditions.

It was assumed that these differences are due to the type of pigment present. Xanthophylls are very susceptible to oxidative degradation via linoleic acid oxidation, catalyzed by a lipoxygenase (Biacs and others 1992). Degradation started by light incidence occurs via stereomutarotation due to the fact that double bonds are in trans configuration in nature and change to cis.

Storage under light affected pigment stability in all samples (Figures 4 and 5). When light was combined with high temperature (40 and 60 °C) carotenoid concentration was reduced to values as low as 0.15 and 0.7 mg/L in samples with 0 and 0.1% BHT, respectively. Samples stored in the dark showed higher xanthophyll concentration, although significantly different when stored at 4 and 25 °C. No significant differences were found in samples stored at 0 or 10 days (Table 4).

Antioxidant addition prevented xanthophyll deterioration to a certain extent in all storage conditions. No significant differences were observed in antioxidant-free samples stored at 4 and 25 °C after 20 days of storage, meaning fast deterioration even when stored under refrigeration. Significantly lower values were obtained in samples stored at 40 °C. Samples with BHT stored in the dark at 4, 25 and 40 °C had similar values. Conversely, rapid deterioration took place after day 10 in all samples with BHT when stored under light (Figure 5).

It can be concluded that illumination was a more determinant factor of stability than temperature. Stability of pigments stored under light has been reported by several authors, although stability at high temperatures is not documented in the literature. Extracts with BHT can be stored up to 40 °C for 30 days, undergoing similar deterioration as BHT-free extracts. In both cases, pigments must be stored in the dark. In our case, temperature stable pigments are an important fact due to high ambient temperatures in the humid tropics (30 to 45 °C). All samples remained stable for the first 10 days of storage, apparently the initiation period before autoxidation takes place.

In general, concentration was lower than in antioxidant-

Table 4—Duncan multiple range tests. Four storage conditions

Condition**	Source of variation	Mean values*			
I	Temperature (°C)	4	25	40	
		5.360 ^a	4.898 ^b	3.896 ^c	
	Storage time (days)	0	10	20	30
		6.890 ^a	5.650 ^a	3.627 ^b	2.268 ^c
II	Temperature (°C)	4	25	40	60
		5.797 ^a	5.570 ^b	5.444 ^c	4.856 ^d
	Storage time (days)	0	10	20	30
		6.590 ^a	5.635 ^a	4.914 ^b	4.447 ^c
III	Temperature (°C)	40	25	4	
		4.025 ^a	3.405 ^b	2.846 ^c	
	Storage time (days)	0	10	20	30
		4.720 ^a	4.698 ^a	2.835 ^b	1.174 ^c
IV	Temperature (°C)	4	25	40	62
		4.550 ^a	4.387 ^b	4.439 ^b	4.368 ^b
	Storage time (days)	0	10	20	30
		4.720 ^a	4.698 ^a	4.212 ^b	4.065 ^b

*means with different letters are significantly different

**I antioxidant-light
 II antioxidant-darkness
 III without antioxidant-light
 IV without antioxidant-darkness

added samples. However, when stored in the dark, concentrations were significantly higher for all samples (Figures 4 and 5) as compared to samples stored in under light. Antioxidant addition and storage in the dark are the 2 major factors necessary for pigment stability.

Conclusion

TERMINALLA CATAPPA COULD BE CONSIDERED TO BE A BETTER carotenoid source as good as other plants, although it need further confirmation. It has a maximum extraction yield of 24 mg/100 g leaves. Seven compounds were identi-

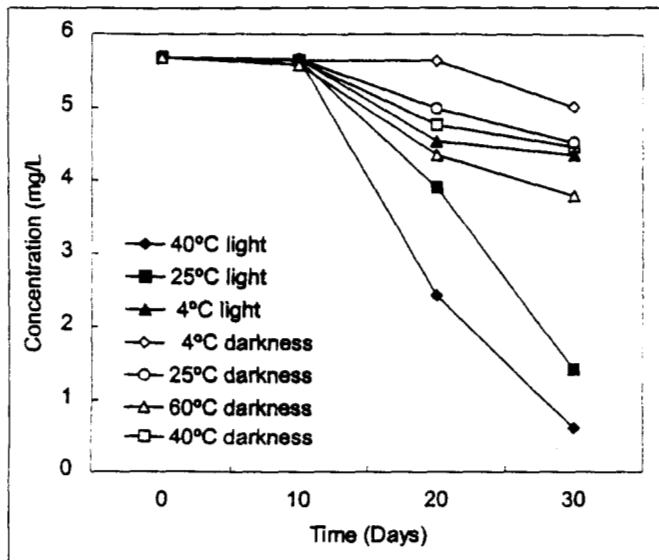


Figure 4—Carotenoid concentration in extracts stored with antioxidant under two illumination conditions

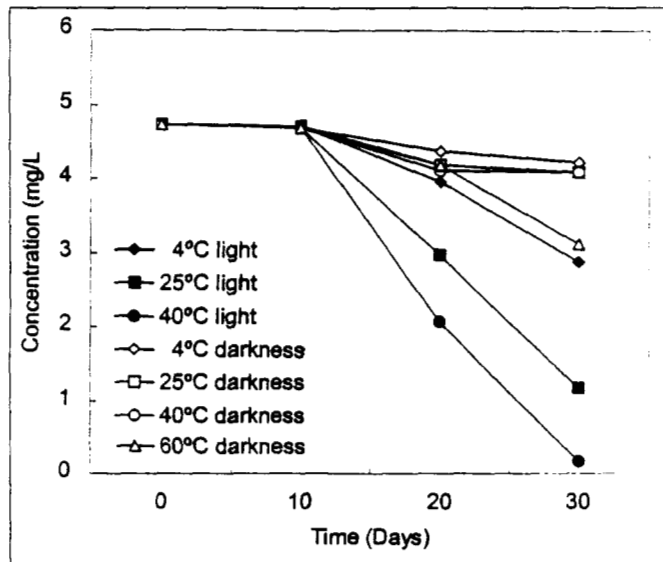


Figure 5—Carotenoid concentration in extracts stored without antioxidant under two illumination conditions

fied by HPLC in the extracts: violaxanthin, violoxanthin, lutein epoxide, lutein, two lutein isomers and b-cryptoxanthin. Although storage at 40 and 60 °C resulted in faster deterioration, more significant factors were illumination and antioxidant addition. This fact is important, due that ambient temperature in the humid tropical, where *Terminalia catappa* can be industrialized by pigment production are generally around 40 °C. This pigment could be used in several food products in Southeast Mexico, such as butter as this is an important dairy producing area. However, it is necessary to carry out toxicology tests.

References

- AOAC. 1980. Official methods of analysis. 13th edition. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Adewusi SRA, Bradbury HJ. 1993. Carotenoids in cassava: comparison of open-column and HPLC methods of analysis. *J Food and Agric* 62:375-383.
- Baublis A, Spomer A, Berber-liménez MD. 1994. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J Food Sci* 59(6):1219-1234.
- Bhaskarachary K, Sankar Rao DS, Deosthales YG, Reddy V. 1995. Carotene content of some common and less familiar foods of plant origin. *Food Chem* 54:189-193.
- Biacs AP, Czinkotai B, Hoscheke A. 1992. Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. *J Agric Food Chem* 40(3):363-367.
- Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H. 1995. The carotenoids. Volume IA: Isolation and analysis. Biel-Benken, Switzerland: Birkhauser-Verlag. 199-214.
- Cano P. 1991. Separation of chlorophylls and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars. *J Agr Food Chem* 39(10):1786-1791.
- Cano CG, Marroquín de la Fuente J. 1994. *Taxonomía de Plantas superiores*. México City, México: Editorial Trillas. 239-241.
- Chen HB, Chen YY. 1993. Determination of carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *J Agric Food Chem* 41(8):1315-1320.
- Fisher C, Kocis AJ. 1987. Separation of paprika pigments by HPLC. *J Agric Food Chem* 35:55-57.
- Gao L, Mazza G. 1996. Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *J Food Sci* 61(3):600-603.
- Giusti MM, Wrolstad RE. 1996. Characterization of red radish anthocyanins. *J Food Sci* 61(2):322-326.
- Gordon MH, An I. 1995. Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *J Agric Food Chem* 43:1784-1788.
- Hart DI, Scott J. 1995. Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *J Agric Food Chem* 43:1784-1788.
- Lasellier HE, Marty C, Lebert A. 1993. Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J Chromat* 633:9-23.
- López-Hernández E, Valadez VA, Maupoey PF, Chiralt BA. 1993. Obtención de Colorantes de Cochinilla. (*Dactylopius coccus* C.). *Univ. y Ciencia* 10(20):79-87.
- Minguez-Mosquera MI, Hornero-Mendez D. 1993. Separation and quantification of the carotenoid pigment in red peppers (*Capsicum annum* L.), paprika oleoresin by reverse-phase HPLC. *J Agric Food Chem* 41:1616-1620.
- Robyt JY, White B. 1990. *Biochemical techniques: theory and practice*. Brooks/Cole Publishing Co. 234-236.
- Rivas JDL. 1989. Reverse-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *J Chromat* 464:442-447.
- SAS Institute. 1989. *SAS User's Guide*. Cary, NC: SAS Institute.
- Tsimidou M, Tsatsaroni E. 1993. Stability of saffron pigments in aqueous extracts. *J Food Sci* 58(5):1073-1075.
- Yen WJ, Chen HB. 1995. Isolation of xanthophylls from Taiwanese orange peels and their effect on the oxidation stability of soybean oil. *Food Chem* 53:417-425.
- Willis RBH, Ranga A. 1996. Determination of carotenoids in Chinese vegetables. *Food Chem* 56(4):451-455.
- MS 20000712
- Author López-Hernández thanks CONACYT (National Council of Science and Technology, Mexico) a Ph.D. scholarship and the Universidad Tecnológica de Tabasco for the facilities to carry out the experimental part.
- Authors López-Hernández, Alquicira, Sosa, and Legarreta are with the Univ. Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Apartado Postal 55-535, C.P. 09340 Mexico D.F., Mexico; Author López-Hernández is also affiliated with the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico. Direct inquiries to author Guerrero (E-mail: meat@xanum.uam.mx).