

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

3.1. El maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cereales cultivados para la alimentación humana y animal en muchos países (Zarkadas et al., 1995), siendo de gran importancia económica a nivel mundial. Globalmente, el maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas, con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas, por lo que actualmente el maíz es el segundo cultivo más producido del mundo, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar (Bressani, 1991; FAO, 1993; Boyer y Curtis en Hallauer, 1994). Toda la planta puede ser aprovechada y las aplicaciones posibles de este cultivo incluyen alimento, forraje y materia prima para la industria. Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina y harina fina, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos. También pueden producirse almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (FAO, 1993).

La diversidad de los ambientes bajo los cuales se cultiva el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Se puede encontrar desde los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. La planta está adaptada a ambientes desérticos y extremadamente húmedos y elevaciones desde 0 a 4000 metros sobre el nivel del mar, aunque la mayor parte es cultivada a altitudes medias y su cultivo podría expandirse a nuevas áreas y a nuevos ambientes (Werner, 1997; Paliwal, 2001).

3.1.1. Biología

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y es la única especie cultivada de su género. Desde el punto de vista botánico, se trata de una planta anual perteneciente a la familia de las gramíneas, tribu Maydeas. Es una planta que produce hojas largas, estrechas y opuestas. Las flores masculinas y femeninas se encuentran en distintas partes de la planta. Las primeras se agrupan en inflorescencias, llamadas espigas, localizadas en la parte superior de la planta. Las flores femeninas se agrupan en inflorescencias que posteriormente darán lugar a las mazorcas y se ubican en la parte media de la planta. Los frutos son los granos de maíz. El peso de los granos depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42 % del peso seco de la planta (Castañeda, 1990; FAO, 1993; Paliwal, 2001).

El maíz es una especie que se reproduce por polinización cruzada, característica que ha contribuido a su gran variabilidad morfológica y adaptabilidad geográfica. Un cultivo de maíz puede recibir polen de otro maíz que se encuentra a más de un kilómetro de distancia. Lo anterior implica la formación de poblaciones heterogéneas y heterocigóticas, altamente variables. De esta forma, la planta puede medir desde 0.5 a 5 metros, producir 1 a 4 orejas por planta, 10 a 1800 granos por oreja y rendir de 0.5 a 23 toneladas de grano por hectárea (Castañeda, 1990; Werner, 1997).

3.1.2. Origen

Aunque se ha dicho y escrito mucho acerca del origen del maíz, todavía hay discrepancias respecto a los detalles de su origen. Generalmente se considera que el maíz fue una de las primeras plantas cultivadas por los agricultores hace entre 7 000 y 10 000 años (Castañeda, 1990; Paliwal, 2001).

Desde el punto de vista geográfico, muchos investigadores creen que el maíz se originó en México (Wheatherwax, 1955; Iltis, 1983; Galinat, 1988; Wilkes, 1989 en Paliwal, 2001), sobretodo por los fósiles de polen y de mazorcas de maíz encontradas en

cuevas en zonas arqueológicas en 1954, cuya antigüedad se estima entre 60 y 80 mil años (Castañeda 1990).

En cuanto al origen botánico del maíz están propuestas las siguientes teorías (Castañeda, 1990):

- El maíz actual procede de un maíz tunicado.
- Desciende del teosinte, ya sea por selección, mutaciones o por hibridación con otra gramínea.
- Es el producto de cruzamiento de un teosinte silvestre con otro cultivado.
- Es un híbrido natural entre el teosinte y una gramínea afín ya extinta.
- El maíz, el tripsacum y el teosinte son tres gramíneas emparentadas y por lo tanto descienden de una sola planta.
- Es un híbrido trigenérico de maíz tunicado, teosinte y tripsacum.
- Es un híbrido asiático, producto del cruzamiento de coix y sorgo.

3.1.3. Recursos genéticos

Aunque el maíz es una sola especie, tiene un gran número de razas y variedades que presentan diferencias entre si. Para poder comprender la existencia de la gran cantidad de tipos de maíz en la actualidad y cómo se han generado a lo largo de la historia, se deben comprender estos dos conceptos.

Por raza se entiende una población de individuos de una misma especie con genotipos similares; que manifiestan ciertos rasgos diferenciales, heredables, y que a su vez permiten separarlas de otras poblaciones. La formación de razas diferentes se origina por distintas modalidades de aislamiento que restringen la reproducción a un cierto número de individuos; estas barreras generalmente son de naturaleza ecológica. Dentro de una raza hay alto número de variedades (Castañeda, 1990).

Por otro lado, una variedad es un grupo de individuos de una especie y raza con rasgos diferenciales más estrechos que aquellos manifestados por las razas (Castañeda, 1990).

Las variedades agronómicas son producto de la selección humana, con la cual se forman grupos de plantas similares para su explotación económica; existen tantas, tal vez como productores, en una región agrícola. Hay variedades nativas y son aquellas que se originaron en un lugar determinado y ahí evolucionaron. Por otro lado, las variedades criollas son las introducidas y adaptadas a las condiciones existentes en el lugar de adopción, que, multiplicándose libremente y por selección natural o dirigida, han logrado producciones aceptables para los agricultores (Castañeda, 1990; Boyer y Curtis en Hallauer, 1994). Dependiendo del tipo de grano se han reportado diferencias en cuanto al tipo y cantidad de compuestos químicos almacenados en él.

En México, el maíz posee una gran biodiversidad genética, ya que se cuenta con miles de variedades. En un estudio llevado a cabo durante la década de 1940, los maíces se clasificaron en 32 razas agrupadas en 5 complejos raciales. Tiempo después, este trabajo fue refinado encontrándose al menos 42 razas agrupadas en 3 grandes complejos raciales (Werner, 1997).

Mediante la selección y la manipulación genética, se puede cambiar la composición del grano tanto en calidad como en cantidad reflejándose en su estructura y diversidad química (Boyer y Curtis en Hallauer, 1994). Muchos mejoradores de maíz piensan que en esta planta se encuentra toda la variabilidad genética necesaria para mejorar cualquier característica que se desee. En realidad los programas de mejoramiento han hecho poco o ningún uso de la diversidad de los recursos genéticos del maíz disponibles fuera de los criaderos de mejoramiento. La principal fuente de variabilidad genética usada en los trabajos con maíz provenía en general de los materiales de que disponía el mejorador o de un intercambio de germoplasma con otros mejoradores. De cualquier manera, hay una creciente preocupación entre los mejoradores profesionales de maíz para expandir la búsqueda de genes útiles que aumenten la variabilidad genética de modo de incrementar la sostenibilidad de la producción (Paliwal, 2001).

3.1.4. Tipos de maíz

Como ya se ha mencionado, durante el proceso evolutivo, los agricultores seleccionaron las variedades de granos de maíz de acuerdo a su utilización de tal forma que existe una gran variabilidad en el color del grano, la textura, la composición y la apariencia. De esta manera, el maíz puede ser clasificado en distintos tipos según (Paliwal, 2001):

- a) la constitución del endospermo y del grano
- b) el color del grano
- c) el ambiente en que es cultivado
- d) la madurez
- e) su uso

Los tipos de maíz más importantes son dentado, duro, reventador, harinoso, y ceroso. Económicamente, los tipos más importantes de maíz cultivados para grano o forraje y ensilaje caen dentro de las tres categorías más importantes de duro, dentado y harinoso. Un tipo de maíz que puede ser agrupado con los anteriores es el maíz con proteínas de calidad (MPC), obtenido en la búsqueda de una mejor calidad de las proteínas. (Paliwal, 2001).

3.1.4.1. Maíz dentado

Es el maíz de mayor importancia comercial, por lo que ocupa cerca del 73% de la producción mundial. Se utiliza para alimento para ganado y fabricación de productos industriales como almidón, aceite, alcohol, jarabes de maíz, entre otros. El endospermo está compuesto de un núcleo harinoso con inclusiones laterales de almidón duro. Cuando el grano se comienza a secar, el almidón blando en la parte superior del grano se contrae y produce una pequeña depresión, que produce la apariencia dentada característica. Muchos de los maíces dentados cultivados tienen granos de color blanco, preferidos para el

consumo humano o tienen granos amarillos, los cuales son preferidos para alimento animal (Magness et al., 1971; Paliwal, 2001; IMSA).

3.1.4.2. Maíz duro

Los cultivares locales originales de maíz, fueron en su mayoría del tipo duro. Los granos de este tipo de maíz son redondos, duros y suaves al tacto. Representa el 14% de la producción mundial y actualmente se cultiva en zonas donde se requiere tolerancia al frío. El grano de maíz tiene almidón duro rodeando toda la parte externa y solo una pequeña porción de almidón blando en el centro; como consecuencia, cuando se seca, se encoge uniformemente y no se desarrolla una depresión (Magness et al., 1971; Paliwal, 2001; IMSA). Muchos de los maíces duros cultivados comercialmente tienen granos anaranjado-amarillo o blanco-crema, aunque pueden presentar varios colores: amarillo, anaranjado, blanco, crema, verde, púrpura, rojo, azul y negro (Paliwal, 2001).

3.1.4.3. Maíz reventador

Los granos de este tipo de maíz son esféricos y pequeños, con una alta proporción de almidón duro. Cuando se calientan, la humedad atrapada en la parte harinosa del grano se expande, resultando en una ruptura explosiva de la epidermis, creando las palomitas de maíz (Magness et al., 1971; Paliwal, 2001).

3.1.4.4. Maíz harinoso

Es la variedad favorita para consumo humano, ocupando el 12% de la producción mundial. El endospermo de los maíces harinosos está compuesto casi exclusivamente de un almidón muy blando. Es el maíz predominante en las zonas altas de la región andina y de México. Los tipos de maíces harinosos muestran gran variabilidad en color de grano y textura (Grobman, Salhuana y Sevilla, 1961; Goertz et al., 1978 en Paliwal, 2001). Estos maíces son casi únicamente usados como alimento humano. Las razas de estos maíces presentan una gran variedad de colores y de algunos de ellos se extraen colorantes (Paliwal, 2001; INTA).

3.1.4.5. Maíces cerosos

Actualmente estos maíces son cultivados en áreas muy limitadas de las zonas tropicales donde las poblaciones locales los prefieren para su alimentación; su nombre se debe a que su endospermo tiene un aspecto opaco y ceroso. El almidón en los maíces duros y dentados está comúnmente constituido por cerca 70% de amilopectina y 30% de amilosa; en cambio en los maíces cerosos está compuesto exclusivamente por amilopectina. Aunque es adecuado para la alimentación humana y animal, se usa principalmente a nivel industrial (Magness et al., 1971; Paliwal, 2001).

3.1.4.6. Maíces con proteínas de calidad (MPC)

Este tipo de maíz tiene un gen mutante recesivo *o2* que contiene cerca del doble de dos aminoácidos esenciales, lisina y triptófano, en su endospermo. Esto mejora sensiblemente la calidad de las proteínas del maíz, el cual normalmente es uno de los cereales con más bajo contenido proteico. En los MPC es afectada la calidad de las proteínas y no su cantidad. El grano típico de *opaco-2* tiene un endospermo muy blando con una apariencia yesosa y opaca. Estos defectos han sido eliminados por medio de cruzamientos y por la acumulación de genes modificadores adecuados los cuales han resultado en un grano con un aspecto muy similar a los maíces duros o dentados, con buen rendimiento y que retienen el gen *o2* y sus efectos positivos sobre la calidad de la proteína (Vasal, 1975, 1994; Bjarnason y Vasal, 1992 en Paliwal, 2001). Como este maíz no tenía apariencia opaca ni yesosa fue denominado maíz con proteínas de calidad (MPC). A pesar del valor de estos maíces su participación en la dieta humana es aún muy limitado y hay unos pocos países, entre ellos Brasil, China, Ghana y Sudáfrica que están haciendo esfuerzos para difundir su cultivo (Paliwal, 2001).

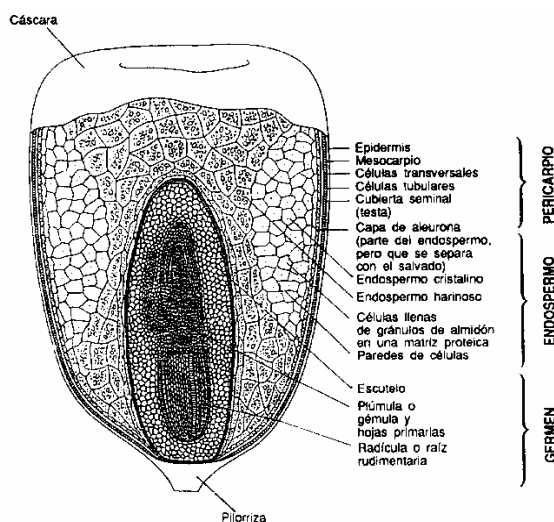
3.1.5. Estructura y composición química del grano de maíz

La composición química del grano de maíz es variable y está relacionada con: estadio, raza, variedad, tecnología del cultivo y clima, parte del grano que se analice, técnicas y métodos de análisis (Castañeda, 1990). Por este motivo, existen múltiples

estudios cuyo objetivo es tratar de comprender y evaluar las repercusiones de todos estos factores en los elementos constitutivos químicos y en el valor nutritivo del grano y sus partes anatómicas (FAO, 1993).

El grano de maíz contiene carbohidratos (70-77%), proteínas (7%-10%) y grasas (3%-5%), además de minerales, oligoelementos y pigmentos (FAO, 1993). Esta estructura está integrada por distintos tejidos, como puede observarse en la siguiente figura:

Figura 3.1. Estructura del grano de maíz



Fuente: FAO, 1993

El germen o embrión constituye en 12% del grano y es el responsable de formar una nueva planta. Este tejido contiene la mayor cantidad de grasa del grano, además de ceniza y azúcares. El endospermo (82%) del grano de maíz es la zona más importante de almacenamiento de los carbohidratos y de las proteínas sintetizadas por esta especie (albúminas, globulinas, prolamina o zeína y gluteína), aunque también contiene trazas de aceites. Biológicamente, el embrión tiene más valor nutritivo en proteínas debido a que contiene una mayor proporción de albuminas, globulinas y gluteína y en menor cantidad zeína. El pericarpio (5%) es la cubierta del grano, protege a la semilla de la entrada de hongos y bacterias antes y después de la siembra. El restante 1 % corresponde a los restos

del pedicelo en la base del grano (Landry y Moureaux, 1980; Castañeda, 1990; FAO, 1993; Boyer y Curtis en Hallauer, 1994, INTA, Paliwal, 2001). En la siguiente tabla se muestra la composición de las distintas partes del maíz:

Tabla 3.1. Peso y composición de las distintas partes del grano de maíz (FAO, 1993)

Composición (%)	Endospermo	Embrión	Pericarpio	Escutelo
Almidón	87,6	8,3	7,3	5,3
Grasas	0,8	33,2	1,0	3,8
Proteínas	8,0	18,4	3,7	9,1
Cenizas	0,3	10,5	0,8	1,6
Azúcares	0,6	10,8	0,3	1,6
Resto	2,7	18,8	86,9	78,6
% materia seca	83,0	11,0	5,2	0,8

Con base en los datos presentados anteriormente, se dice que el maíz tiene un alto valor nutritivo como fuente de energía, por su alto contenido de almidón y grasa, y su bajo nivel de fibra. Sin embargo, no posee las suficientes proteínas, tanto en cantidad como en calidad, por ser incompleto en dos aminoácidos esenciales, lisina y triptófano. Al igual que otros cereales, el maíz es muy deficitario en calcio, sodio, microminerales y vitaminas hidrosolubles. El contenido de fósforo es aceptable (0.27%, pero en gran parte se encuentra en forma de fitatos poco disponibles. (Castañeda, 1990; FEDNA, 2003).

3.2. Calidad de las proteínas

El análisis de proteínas es de gran importancia en la determinación del valor nutritivo de los alimentos (Wathelet, 1999). La calidad nutricional de una proteína está definida por la cantidad y proporción o balance de los aminoácidos presentes en ella y su capacidad para satisfacer las necesidades nutricionales animales (Bressani, 1991). De esta manera, las proteínas cuyo contenido de aminoácidos se aproxima al punto óptimo de satisfacción de las necesidades animales son consideradas de alta calidad y aquellas que no se acercan a ese punto son catalogadas como proteínas de baja calidad (Oropeza y Ortiz, 1989).

En general, el contenido de aminoácidos esenciales en los alimentos es relativamente un buen indicador de la calidad de una proteína, particularmente si la digestibilidad es alta. Por lo tanto, si se conoce el contenido de aminoácidos esenciales de un alimento y se compara con un patrón de referencia, se puede calcular su calidad con respecto a cada aminoácido, siendo de especial importancia aquellos que son limitantes (Bressani, 1991). Se llama así al aminoácido esencial que en una proteína dada se encuentra en cantidad relativa mas baja con respecto a una proteína patrón porque limita el aprovechamiento de ésta.

Los aminoácidos esenciales son metionina, cisteina, lisina, treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina y triptofano. Para el cálculo y la predicción de la calidad de una proteína, el perfil de aminoácidos esenciales se compara con una proteína de referencia “ideal” de valor biológico conocido. El contenido de aminoácidos esenciales de un producto es corregido con respecto al contenido de proteínas y luego es comparado con el porcentaje del aminoácido en la proteína de referencia, dándole así una puntuación a cada aminoácido (White y Hart, 1992).

3.2.1. Proteínas del maíz

La principal fuente de proteínas en las plantas son los granos de las legumbres y los cereales. Entre los cereales, el maíz y el arroz son los alimentos base para la mayor parte de los países latinoamericanos, África y Asia (Toro, et al., 2003).

Las proteínas de los cereales tienen un valor nutricional pobre para los humanos y otros animales monogástricos (Moro et al., 1996). Sin embargo, los estudios realizados para evaluar la proteína del grano de maíz han demostrado su baja calidad en comparación con proteínas de origen animal, pero, con relación a otros cereales, la calidad proteica del maíz es superior o similar (Brezan, 1972; Sikka y Johari, 1979 en Oropeza y Ortiz, 1989).

El maíz contiene 7-13% de proteínas (Moro *et al.*, 1996 en Zarkadas et al., 2000). Como todos los granos de cereales, las semillas de maíz contienen tres grupos de proteínas: proteínas de almacenamiento, que constituyen una reserva de aminoácidos depositados tempranamente en el desarrollo de las semillas; las enzimas involucradas en el metabolismo; y las proteínas estructurales.

Las proteínas del grano tradicionalmente se clasifican con base en su solubilidad en diferentes disolventes. Diferentes investigadores han aplicado condiciones variadas para solubilizar proteínas. Las albúminas son solubles en agua y comprenden cerca del 7% de todo el nitrógeno del grano. Las prolaminas son solubles en alcohol con o sin agentes reductores y constituyen cerca del 52% del nitrógeno del grano. Finalmente, las gluteínas son solubles en medio alcalino y forman parte del 25% del nitrógeno total del grano (Oropeza y Ortiz, 1989; Boyer y Curtis en Hallauer, 1994).

El principal tipo de proteínas, las prolaminas, se conocen también como zeínas. Estas proteínas contienen grandes cantidades de los aminoácidos glutamina, prolina, leucina y alanina y son relativamente de una calidad nutricional pobre ya que son deficientes en los aminoácidos esenciales lisina y triptofano, presentes en cantidades de 1.8-2% y 0.6-0.8% de la proteína total, respectivamente (Zarkadas *et al.*, 1995; Ortiz, 1982; Onñ y Gerra, 1983 en Oropeza y Ortiz, 1989; Boyer y Curtis en Hallauer, 1994). Al

parecer, el aminoácido limitante de las proteínas de más importancia, después de la lisina y del triptofano, es la isoleucina, según se ha determinado en experimentos de alimentación animal (Benton, Harper y Elvehjem, 1955 en FAO, 1993; Zarkadas et al., 1995). La mayoría de los investigadores que han indicado esos resultados señalan que el efecto de la adición de isoleucina se debe a un exceso de leucina que obstaculiza la absorción y la utilización de la isoleucina (Harper, Benton y Elvehjem, 1955; Benton et al., 1956) en FAO, 1993).

En la tabla 3.2 se muestra el contenido de aminoácidos esenciales de los maíces normales y se compara su contenido con la proteína de referencia manejada por la FAO, reportándose también la puntuación para cada aminoácido. Al mismo tiempo, si se divide el primer valor entre el segundo, se obtiene una puntuación para cada aminoácido y así se puede evaluar la calidad de las proteínas con respecto a cada uno de los aminoácidos esenciales que la componen.

Tabla 3.2: Puntuación química de los aminoácidos esenciales de maíces normales (Bressani, 1991)

Aminoácido	Maíz (mg/g N proteico)	Proteína patrón FAO (mg/g N proteico)	Puntuación Química
Lisina	28.32	54.4	0.75
Isoleucina	32.96	40	0.77
Leucina	132.32	70.4	1.15
Aminoácidos azufrados	30.08	35.2	0.85
Aminoácidos aromáticos	80.8	60.8	1.32
Treonina	34.08	40	0.79
Triptofano	5.6	9.6	1.30
Valina	46.72	49.6	0.96

Al igual que con otros compuestos químicos del grano de maíz, el contenido de nitrógeno, así como la calidad de las proteínas esta íntimamente relacionado con factores genéticos y ambientales.

Se ha establecido que los niveles de nitrógeno en el suelo pueden afectar directamente el contenido de proteínas del grano de maíz (Pierre et al., 1977 en Kniep y Mason, 1991). Cromwell et al. (1983) encontró que ocurría un incremento lineal en el contenido de proteína y lisina del grano en variedades de maíz opaco 2 y maíz normal conforme se incrementaba la fertilización con nitrógeno. El contenido de proteína se incrementaba más rápidamente que el contenido de lisina conforme se incrementaba el nitrógeno, resultando en una disminución lineal de lisina expresada como porcentaje de proteína. Esto sugiere que el valor nutritivo del grano se ve afectado adversamente por el incremento de la fertilización con nitrógeno.

Se han hecho pocos trabajos para examinar los efectos de la irrigación en el valor nutricional de las proteínas en el grano de maíz, aunque se ha observado que el riego incrementa el rendimiento del grano pero disminuía el contenido de proteína y lisina, pero incrementaba la lisina como porcentaje de proteína comparado con la ausencia de agua (Kniep y Mason, 1991).

La conclusión del estudio realizado por Kniep y Mason (1991) es que tanto el rendimiento de los granos así como su calidad nutricional, están relacionados estrechamente con la selección de híbridos, la irrigación y la fertilización con nitrógeno y que estos factores deben ser considerados por los productores de maíz.

3.2.2. Análisis de aminoácidos

La determinación de la proteína cruda y el índice químico, junto con la composición de aminoácidos esenciales, dan una buena estimación de la calidad de las proteínas. Para determinar el índice químico, primero se hidrolizan las proteínas y luego se analiza la proporción de los aminoácidos presentes (Wathelet, 1999). La demanda creciente de información relacionada al valor nutritivo ha conducido al desarrollo de métodos precisos para medir aminoácidos.

La mayoría de los procedimientos para el análisis de aminoácidos dependen del uso de métodos cromatográficos (Pellet et al., 1980), en especial la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica cuantitativa, rápida y altamente sensible, capaz de producir una buena resolución entre compuestos químicamente similares, por ejemplo, aminoácidos y vitaminas, por lo cual es la técnica de elección cuando es necesario cuantificar estos compuestos. Esta técnica emplea columnas con diámetros de 2-5 mm, empacadas con partículas muy pequeñas (3-10 μm) y fases móviles cuyo flujo se controla de manera muy precisa (White y Hart, 1992). El único inconveniente de esta técnica recae en la preparación de derivados antes o después de la separación cromatográfica, ya que, por si solos los aminoácidos no son detectados fácilmente por UV o fluorescencia (Pellet et al., 1980; Wathelet, 1999).

3.2.2.1. Cromatografía de Líquidos de alta resolución en fase reversa de aminoácidos

La cromatografía de intercambio iónico es el método de análisis de aminoácidos más utilizado; sin embargo, si el análisis no se lleva a cabo de manera rutinaria, los altos costos hacen que la cromatografía en fase reversa sea el método de elección (Pellet y Hart, 1980; White y Hart, 1992; Anders, 2002).

En la cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias: partículas esféricas de poliestireno y divinilbenceno, unidos por enlaces cruzados; y el tipo más común lo constituyen partículas de sílice recubiertas por grupos no polares orgánicos como $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_7$ y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. De éstas, las fases estacionarias de octadecilsilano (denominadas ODS o C_{18}) son las más populares y con menor frecuencia se utilizan las C_8 . Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice. De manera que la distribución de los solutos entre la película superficial y la fase móvil se parece a una

extracción líquido- líquido. Además, cuanto más larga sea la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve mas “orgánica”. Como resultado, las cadenas mas largas interaccionan con mas fuerza con los solutos que se disuelven en las fases orgánicas (Skoog y Learly, 1994; Rubinson y Rubinson, 2000). La partición de los componentes de la muestra dependerá de sus respectivas características de solubilidad. Los componentes menos hidrofóbicos se asociaran primariamente con la fase hidrofílica, mientras que los componentes más hidrofóbicos se encontrarán en la fase lipofílica (White y Hart, 1992).

En cuanto a las fases móviles empleadas en la separación en fase reversa, los disolventes poco polares son eluyentes más poderosos y hay gran variedad de ellos disponibles. La fase móvil puede ser considerada como una solución acuosa de un disolvente orgánico, el tipo y concentración determinarán su poder extractor. Algunos solventes orgánicos usados comúnmente para incrementar la hidrofobicidad son metanol, propanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. La elección del componente orgánico depende de su selectividad para separar ciertos pares de aminoácidos y por la forma en que su presencia influye en la presión de la columna. Los cambios en el disolvente producen desplazamientos en el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria. La separación cromatográfica se puede mejorar pasando de una elusión isocrática (pasa un único eluyente) a una elusión en gradiente. Esta última se consigue mezclando dos o más eluyentes diferentes de manera que la composición de la fase móvil cambie con el tiempo (White y Hart, 1992; Rubinson y Rubinson, 2002). Dependiendo del poder extractor del eluyente, una menor o mayor parte del componente de la muestra será retenido reversiblemente por la fase estacionaria. Cuanto mayor es la fracción de un compuesto retenida en la fase estacionaria, mayor tiempo tardará en moverse a lo largo de la columna. Los compuestos hidrofílicos se moverán siempre más rápido que los compuestos hidrofóbicos, ya que la fase móvil es siempre más hidrofílica que la fase estacionaria (White y Hart, 1992; Skoog y Learly, 1994).

3.2.2.2. Métodos de derivatización para la separación cromatográfica de aminoácidos

En algunos casos, es conveniente transformar los componentes de una muestra en otros compuestos antes, o a veces después, de proceder a la separación cromatográfica. Este tratamiento puede ser necesario para reducir la polaridad de las especies y de este modo poder usar columnas de reparto y no de intercambio iónico, para aumentar la respuesta del detector para todos los componentes de la muestra o bien, para aumentar selectivamente la respuesta del detector para determinados componentes de la muestra (Scoog y Learly, 1994).

La mayoría de los aminoácidos no derivatizados (con la excepción de los aromáticos) no contienen cromóforos adecuados para su detección, excepto a longitudes de onda muy cortas, por ejemplo a 200 nm. Como hay muchos compuestos que absorben a esta longitud de onda, pueden estar presentes muchas interferencias, la selección de los solventes es difícil y se requiere que sean de alta pureza. Por lo tanto, los aminoácidos la mayoría de las veces tienen que convertirse en derivados adecuados antes o después de la separación cromatográfica. Los procedimientos de derivatización se dividen en precolumna y postcolumna (Fontaine, 2003).

La derivatización postcolumna involucra los siguientes pasos: separación de los aminoácidos en la columna cromatográfica, introducción de un reactivo de derivatización (ninhidrina u ortoftalaldehído) en el sistema efluente de la columna; paso de los líquidos combinados a través de un colector mezclador seguido por un espiral de reacción (que debe ser calentado) y finalmente bombeo de los aminoácidos derivatizados a través de un sistema de detección (White y Hart, 1992). La separación se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico.

Por otro lado, después de la derivatización precolumna con reactivos no polares fluorescentes o detectables a longitudes de onda del ultravioleta-visible en el grupo amino, todos los aminoácidos pueden separarse mediante HPLC en fase reversa. Esto representa

una ventaja en laboratorios donde el análisis de aminoácidos no se hace de manera rutinaria y no se cuenta con un analizador automático de aminoácidos (Fontaine, 2003).

En la derivatización precolumna la mezcla de aminoácidos se hace reaccionar con el agente de derivatización antes de que los aminoácidos sean separados. Todo el tiempo se están desarrollando nuevos reactivos de derivatización. Las técnicas difieren principalmente en las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, separación del reactivo, estabilidad de los derivados y método de detección). Una de las desventajas de esta técnica, es que una porción sustancial de todos los derivados será idéntica (la parte del reactivo de derivatización). Las pequeñas diferencias entre las cadenas laterales de los aminoácidos derivatizados tendrá un efecto menor en el comportamiento cromatográfico del derivado, que en el caso del comportamiento cromatográfico de los aminoácidos solos, cuando los aminoácidos pueden diferenciarse y separarse mas fácilmente. Esto hará que la separación sea un poco más difícil. Sin embargo, ya que la derivatización precolumna permite el uso de la cromatografía en fase reversa en vez de la de intercambio iónico, se está volviendo rápidamente el método de elección. La derivatización precolumna elimina la necesidad de utilizar reactores postcolumna costosos, y los derivados hidrofóbicos de los aminoácidos pueden ser separados rápida y eficientemente con columnas en fase reversa. Estos sistemas, acoplados con detectores sensibles, permiten la detección de aminoácidos presentes en concentración picomolar (White y Hart, 1992; Fontaine, 2003).

Aunque la derivatización precolumna ofrece estas ventajas, no ha podido desplazar completamente a los métodos postcolumna tradicionales por varias razones. Para la aplicación del análisis de aminoácidos de manera rutinaria, el agente de derivatización precolumna debe satisfacer los siguientes requerimientos (White y Hart, 1992):

- 1) Debe reaccionar rápidamente bajo condiciones moderadas para dar rendimientos cuantitativos del derivado.
- 2) Debe reaccionar tanto con aminoácidos primarios como secundarios
- 3) Los derivados deben ser estables por varios días, de preferencia a temperatura ambiente para permitir el análisis automatizado de varias muestras.

- 4) No debe haber interferencia del reactivo, productos de ruptura o reacciones secundarias
- 5) Debe haber una respuesta lineal a los intervalos de concentración típicos de la mayoría de las aplicaciones.
- 6) Los derivados deben tener factores de respuesta molar razonablemente similares.

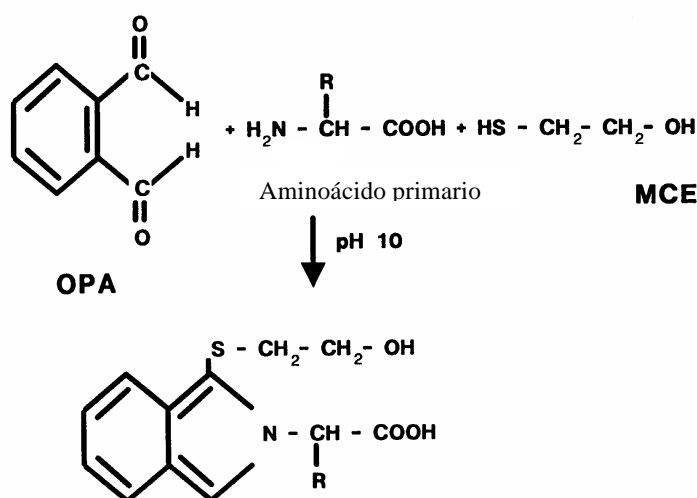
Se han investigado diferentes reactivos de derivatización precolumna, pero ninguno ha podido alcanzar una aceptación universal debido a que no cumple con uno o mas de los requerimientos mencionados anteriormente. En los siguientes apartados se describen los reactivos utilizados comúnmente para esta técnica.

3.2.2.3. Reactivos de derivatización precolumna

3.2.2.3.1. Ortoftalaldehído

Es el reactivo de derivatización precolumna mas comúnmente usado en la cromatografía en fase reversa para la determinación de aminoácidos. La reacción entre el OPA y los aminoácidos primarios tiene lugar en presencia de un grupo tiol como el del 2-mercaptoetanol o etanotiol para formar derivados altamente fluorescentes como se esquematiza en la siguiente figura (White y Hart, 1992):

Figura 3.2. Reacción de los aminoácidos con OPA. MCE = 2-mercaptoetanol.



Las ventajas que presenta este método de derivatización es que la reacción se lleva a cabo rápidamente (1 minuto a temperatura ambiente) y la especificidad y sensibilidad de la detección fluorescente, midiendo la emisión a longitudes de onda superiores a 430 nm (Fontaine, 2003).

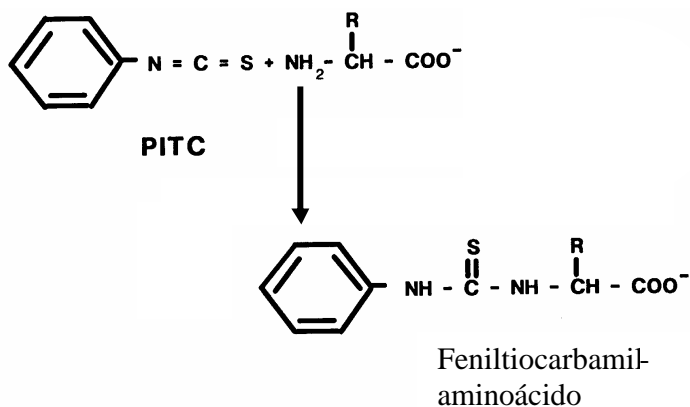
No hay necesidad de remover el exceso de OPA antes de la inyección de la muestra ya que el OPA por si solo no interfiere con la separación o la detección. Sin embargo, ya que los derivados OPA-aminoácido son inestables, es necesario controlar el tiempo de la reacción para obtener resultados reproducibles. El procedimiento de separación es altamente reproducible y rápido comparado con los procedimientos postcolumna en los que el reactivo de derivatización se agrega de manera continua. Sin embargo, la reproducibilidad y la sensibilidad del procedimiento están directamente afectadas cuando tiempo de reacción y tiempo antes de la inyección no son controlados estrictamente (Fontaine, 2003; White y Hart, 1992).

El OPA no reacciona con aminoácidos secundarios pero esta desventaja puede solucionarse mediante la adición de un segundo reactivo de derivatización, el que se utiliza comúnmente es el 9-Fluorenilmetil cloroformato.

3.2.2.3.2. Fenilisotiocianato (PITC)

El fenilisotiocianato ha sido usado por mas de 30 años en la degradación de Edman para secuenciar péptidos y proteínas. El PITC reacciona con los aminoácidos libres para dar feniltiocarbamil aminoácidos, como se ilustra en la figura:

Figura 3.3. Reacción de derivatización de los aminoácidos con PITC (White y Hart, 1992).

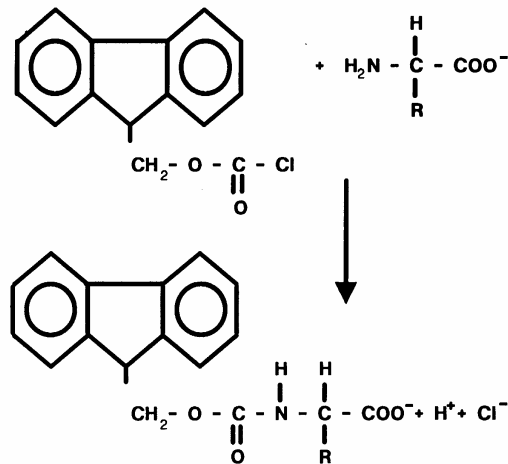


Con este método se pueden cuantificar aminoácidos secundarios como la prolina y la hidroxiprolina, así como los productos de oxidación de la metionina y la cisteína, metionina sulfona y ácido cistéico, respectivamente (Fontaine, 2003). Bajo condiciones moderadas, la reacción es prácticamente completa a los 5-10 minutos; ya que el reactivo es volátil, se puede usar en exceso y eliminarlo fácilmente bajo presión reducida en un rotavapor (Heinrikson y Meredith, 1984). Aunque no es tan sensible como algunos reactivos fluorescentes, los derivados pueden cuantificarse en niveles picomolares en la región del ultravioleta a 254 nm. Los derivados pueden ser estables hasta por 4 semanas a -20°C (White y Hart, 1992).

3.2.2.3.3. 9-Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl)

Otro reactivo fluorescente para de derivatización precolumna es el FMOC-Cl. Originalmente se usó como un reactivo protector del grupo amino durante la síntesis de péptidos por Carpino y Han. Reacciona rápidamente con todos los aminoácidos a temperatura ambiente, pero más lentamente que el OPA. Los derivados son estables y pueden almacenarse por varios días en el refrigerador (Fontaine, 2003).

Figura 3.4. Reacción de derivatización de aminoácidos con FMOC-Cl

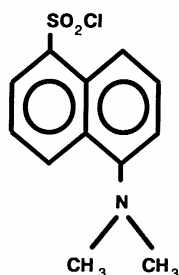


En contraste con otros reactivos de derivatización, el FMOC-Cl es fluorescente por si solo. En presencia de agua se forma 9-fluorenilmetanol, por lo que el exceso de reactivo y los productos fluorescentes secundarios tienen que ser eliminados antes de la separación y detección de los aminoácidos derivatizados (Fontaine, 2003).

3.2.2.3.4. Cloruro de dansilo y cloruro de dabsilo

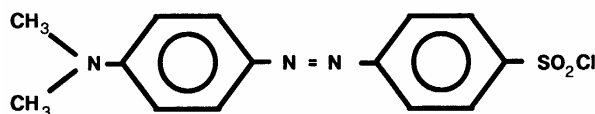
El cloruro de dansilo (cloruro de 5-N,N-dimetilamino-naftalen-1-sulfonilo) es un reactivo de derivatización fluorogénico bien conocido para la determinación de aminas primarias y secundarias. La dansilación ha sido ampliamente utilizada como un método para determinar aminoácidos. Los aminoácidos dansilados son altamente fluorescentes ($\lambda_{\text{excitación}}=360\text{nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=470\text{ nm}$). También es posible detectarlos en la región ultravioleta ($\lambda_{\text{max}}=250\text{nm}$). Los niveles de detección caen dentro del intervalo picomolar en la detección con fluorescencia, en contraste con la sensibilidad nanomolar del cloruro de dabsilo, un compuesto relacionado (White y Hart, 1992).

Figura 3.5. Estructura del Cloruro de Dansilo.



Por su parte, el cloruro de 4-N, N- dimetil-aminoazobencen-4-sulfonilo (DABS-Cl) produce derivados de aminoácidos altamente estables, fácilmente separables en el HPLC y detectables a una concentración picomolar a 436 nm. La reacción se lleva a cabo en 12 min a 70 °C (Fontaine, 2003).

Figura 3.6. Estructura del Cloruro de dabsilo (White y Hart, 1992)



Una limitante del DABS-Cl es que la presencia de un exceso de sales, urea, fosfato, o bicarbonato de amonio interferirá con la reacción de dabsilación. Se ha demostrado que los enlaces de sulfonamida entre el DABS-Cl y los aminoácidos son los más estables. Los aminoácidos dabsilados pueden almacenarse a temperatura ambiente, en presencia de luz y en solución por más de un mes sin haber una degradación detectable.

3.3. Xantofilas

Los carotenoides son un grupo diverso de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono, sintetizados a partir de 8 unidades de isopreno invertidas en el centro de la molécula (o bien, 2 unidades de geranyl-geranyl pirofosfato), y que se encuentran en muchos sistemas biológicos. Una característica distintiva de estos compuestos es su sistema de dobles enlaces conjugados, que sirve como el cromóforo responsable de los colores amarillo, naranja, rojo y violeta que imparten a muchos alimentos (Kurilich y Juvik, 1999; Delgado-Vargas, et al., 2000; Martínez, 2001; Rodríguez-Amaya, 2001; Schoefs, 2002).

Figura 3.7. Isopreno (Gross, 1991)

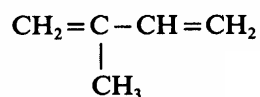
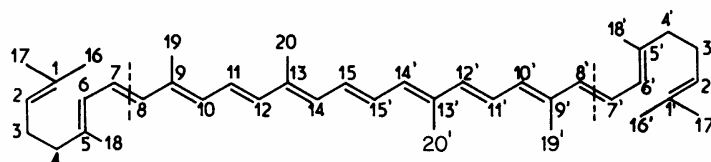
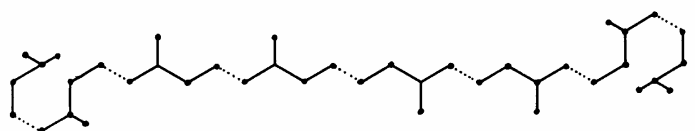


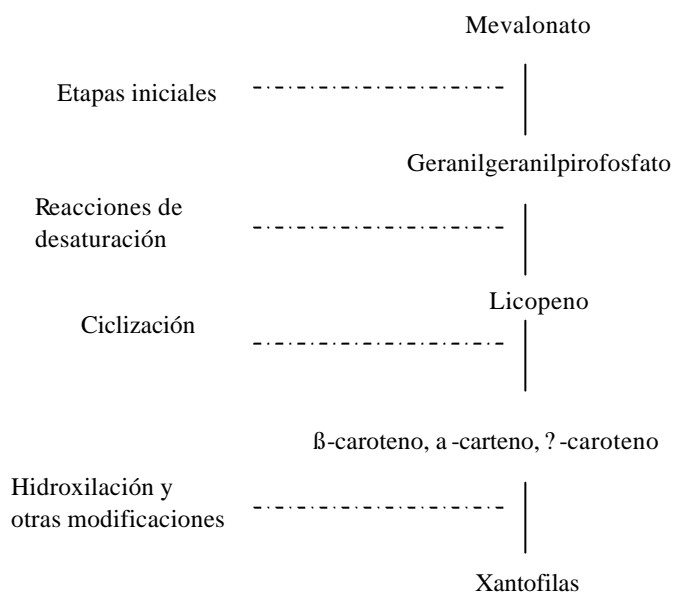
Figura 3.8. Unión de las unidades de isopreno (Gross, 1991)



Licopeno

Estos pigmentos pueden considerarse en su totalidad derivados del licopeno ($C_{40}H_{56}$), el cual sufre reacciones que involucran hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, inserción de oxígeno, migración de dobles enlaces, migración de metilos, elongación de la cadena, acortamiento de la cadena (Delgado-Vargas, et al., 2000; Rodríguez-Amaya, 2001).

Figura 3.9. Etapas propuestas para la biosíntesis de diferentes carotenoides (Delgado-Vargas, 2000)



3.3.1. Clasificación

Los carotenoides se clasifican de acuerdo a su estructura química en dos clases generales (Kurilich y Juvik, 1999; Delgado-Vargas, et al., 2000; Martínez, 2001; Rodríguez-Amaya, 2001):

- Carotenos, constituidos solamente por carbono e hidrógeno.
- Oxicarotenoides o xantofilas, que contienen carbono, hidrógeno y adicionalmente, oxígeno.

3.3.2. Distribución

Los carotenoides son el grupo de pigmentos mas ampliamente distribuidos. Han sido identificados en organismos fotosintéticos y no fotosintéticos: plantas superiores, algas, hongos, bacterias y animales. Los carotenoides son responsables del color rojo, naranja y amarillo de muchas frutas, vegetales, hongos, flores, pájaros, insectos, crustáceos y truchas. Solo los microorganismos y las plantas son capaces de sintetizar carotenoides. En el caso de los animales, éstos pueden ser modificados durante el metabolismo para ser acumulados en los tejidos. De esta manera, productos animales como la leche, la matequilla y la yema de huevo contienen carotenoides (Gross, 1991; Delgado-Vargas, et al., 2000; Rodríguez-Amaya, 2001; Schoefs, 2002)

Hasta 1992, se habían identificado alrededor de 600 carotenoides. Actualmente este número ha crecido considerando que se han aislado muchos carotenoides de organismos marinos. La producción total de carotenoides en la naturaleza ha sido estimada en 10^8 toneladas por año, la mayoría de la cual está concentrada en cuatro carotenoides: fucoxantina en algas marinas y luteína, violaxantina y neoxantina en hojas verdes (Delgado-Vargas, et al., 2000).

Hay varios factores que influyen de manera importante en la composición de carotenoides de los alimentos: variedad del cultivo, parte de la planta analizada, etapa de maduración, clima o sitio geográfico de producción, cosecha, manejo post-cosecha, procesamiento y almacenamiento. Las diferencias entre variedades pueden ser solo en términos de la composición cuantitativa, ya que esencialmente los mismos carotenoides se encuentran en las diferentes variedades (Gross, 1991; Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Rodríguez-Amaya, 2001). Se observa también que hay pérdidas durante el almacenamiento postcosecha en algunos vegetales, especialmente en condiciones favorables para el marchitamiento, altas temperaturas y exposición a la luz, ya que los carotenoides bajo estas condiciones son susceptibles a la oxidación e isomerización (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.3.3. Propiedades físicoquímicas

Para poder identificar y cuantificar carotenoides con mayor facilidad y exactitud, es fundamental conocer algunas de sus propiedades físicoquímicas.

3.3.3.1. Solubilidad

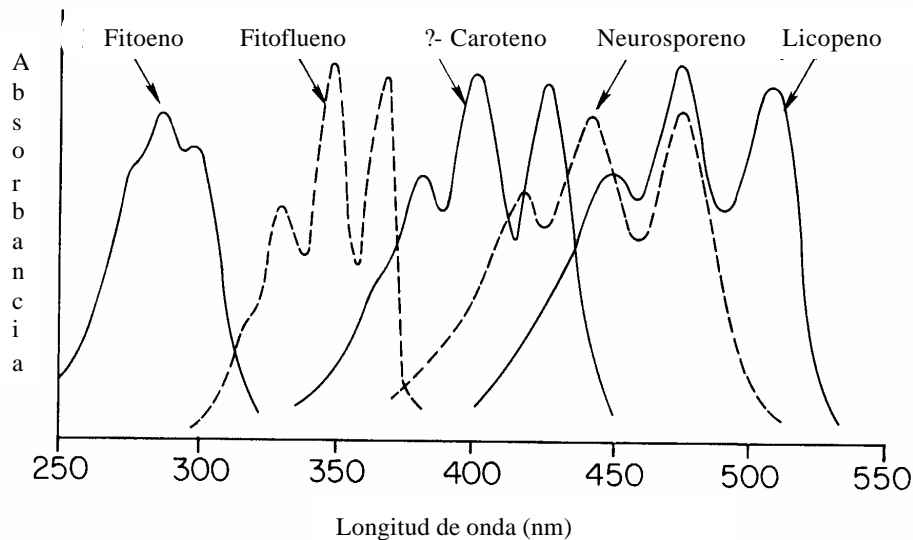
Con muy pocas excepciones, los carotenoides son lipofílicos. Son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, alcohol, éter etílico, cloroformo y acetato de etilo. Los carotenos se disuelven fácilmente en un medio apolar como éter de petróleo, hexano y tolueno; las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol, que son disolventes más polares que los anteriores (Gross, 1991, Rodríguez-Amaya, 2001).

3.3.3.2. Propiedades espectroscópicas

El sistema de dobles enlaces conjugados constituye el cromóforo que absorbe luz en la región ultravioleta y visible del espectro que le da a los carotenoides su color atractivo y provee es espectro de absorción que sirve como base para su identificación y cuantificación, ya que cada carotenoide se caracteriza por un espectro de absorción (Gross, 1991, Rodríguez-Amaya, 2001; Schoefs, 2002). De hecho, esta es la primera herramienta de diagnóstico para identificar y cuantificar carotenoides.

La mayoría de los carotenoides tienen tres máximos de absorción (λ_{max}) resultando en un espectro de tres picos. A mayor número de dobles enlaces conjugados, mayores serán los valores de λ_{max} (Rodríguez-Amaya, 2001).

Figura 3.11. Efecto de la longitud del cromóforo en el espectro de absorción de los carotenoides (Gross, 1991)



Los carotenoides absorben principalmente en la región azul del espectro (430-470 nm), pero también absorben en la azul-verde (470-500 nm) y la verde (500-530 nm), y su color está determinado por la luz que reflejan. Con el desplazamiento de las bandas de absorción de un pigmento hacia mayores longitudes de onda (desplazamiento batocrómico), el color va del amarillo como el neurosporeno a naranja-rojo como el licopeno (Gross, 1991).

La ciclización trae como consecuencia un impedimento estérico entre el metilo del anillo en el carbono 5 y el átomo de hidrógeno en el carbono 8 de la cadena del polieno, poniendo a los electrones p del anillo en un plano diferente al de la cadena, resultando en un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento del λ_{max} a una longitud de onda menor. También se observa una pérdida de la estructura fina y una disminución en la absorbancia (Rodríguez-Amaya, 2001).

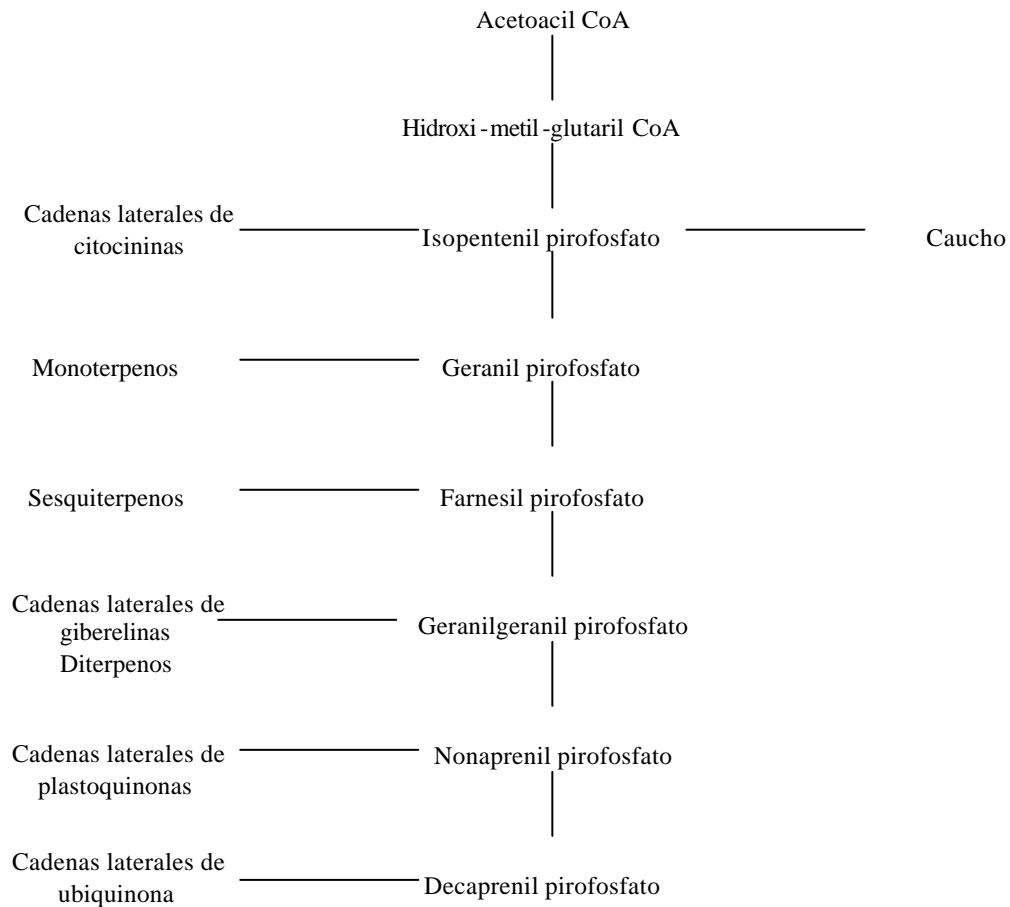
La introducción de sustituyentes hidroxilo y metoxilo en la molécula no afectan al cromóforo y por lo tanto, no hay ningún efecto sobre el espectro de absorción (Gross, 1991). Entonces, los espectros de la luteína, la zeinoxantina y la α -criptoxantina son como

el del α - caroteno, mientras que los de la β - criptoxantina y la zeaxantina son idénticos al del β -caroteno (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.3.4. Biosíntesis

Las características de carotenogénesis son similares en plantas superiores, algas, hongos y bacterias (Gross, 1991). Los carotenoides como terpenoides son sintetizados por la ruta del isopreno. La mayoría de las rutas han sido elucidadas, pero se requiere más información sobre las enzimas involucradas. El isopentenil pirofosfato (IPP) es el precursor común de muchos de los compuestos isoprenoides, de esta manera, deben existir mecanismos de control sofisticados para asegurar la producción de los niveles apropiados de estos compuestos en el contexto de la ruta metabólica, etapa de desarrollo y condiciones ambientales (Delgado-Vargas, et al., 2000).

Figura 3.12. Ruta de biosíntesis de compuestos isoprenoides (Delgado-Vargas, et al., 2000)



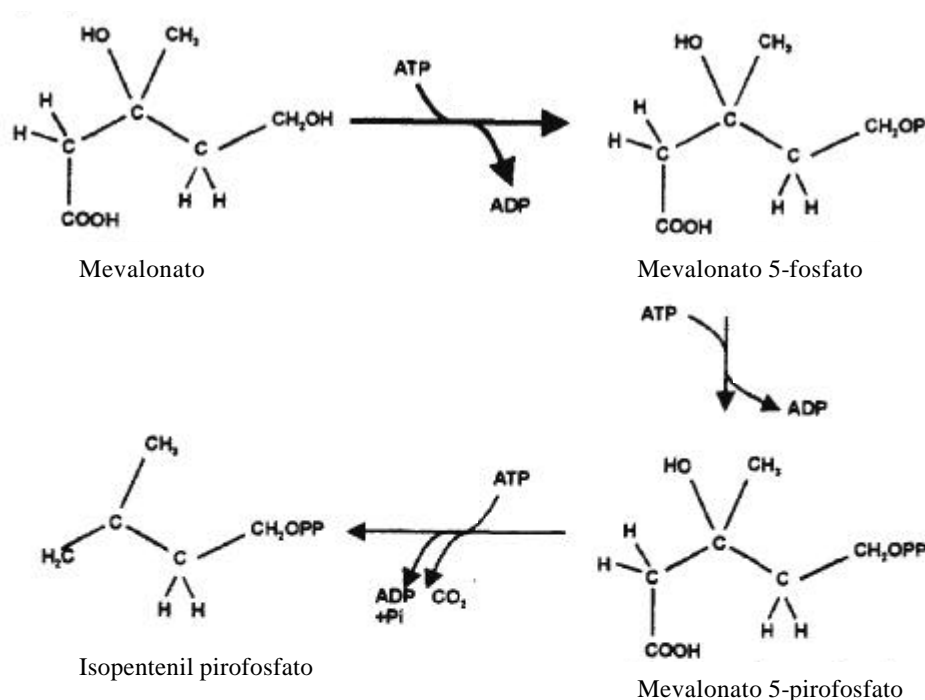
La biosíntesis de carotenoides involucra seis etapas (Gross, 1991):

- 1) Formación del ácido mevalónico
- 2) Formación de geranylgeranyl pirofosfato
- 3) Formación de fitoeno
- 4) Desaturación del fitoeno
- 5) Ciclización
- 6) Formación de xantofilas

Los pasos iniciales de la ruta involucran la fusión de tres moléculas de acetyl-CoA para producir 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Existe evidencia de que una enzima cataliza ambas reacciones usando como cofactores Fe^{2+} y quinona como cofactores. La conversión de HMG-CoA a mevalonato es catalizada por HMG-CoA reductasa, usando NADPH como cofactor (Delgado-Vargas, 2000).

La síntesis de isopentenil pirofosfato (IPP) a partir del mevalonato está bien caracterizada en plantas. El IPP se forma a partir del ácido mevalónico (MVA), que es fosforilado sucesivamente a ácido mevalónico 5-fosfato y 5-pirofosfato por enzimas cinasas en presencia de ATP. Posteriormente, el MVA-5-pirofosfato es descarboxilado para dar una unidad de isopreno (Gross, 1991)

Figura 3.13. Biosíntesis del isopentenil pirofosfato (Delgado-Vargas, 2000)



El isopentenil pirofosfato es la unidad básica para la construcción de terpenoides de cadena mas larga. El IPP por si no es lo suficientemente reactivo para iniciar las reacciones de condensación. Entonces, el primer paso es su isomerización a dimetilalilpirofosfato (DMAPP), la reacción es catalizada por la IPP isomerasa con un ión metálico divalente como cofactor. El siguiente paso es la condensación de un IPP y un y un DMAPP para obtener geranil pirofosfato (GPP). Después de esto, dos moléculas de IPP se condensan con el GPP para obtener el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) gracias a la GGPP sintasa (Ver figura 3.14). Debido a que el GGPP es un precursor de muchos otros compuestos, es posible que la transformación del GGPP, en esta parte de la ruta, esté altamente regulada por mecanismos complejos (Gross, 1991; Delgado-Vargas, 2000).

El primer paso específico de la síntesis de carotenoides (Figura 3.15) es la condensación de dos moléculas de GGPP para formar *cis*-fitoeno (C₄₀). El intermediario de esta reacción es un ciclopropano C₄₀, el prefitoeno pirofosfato (PPPP). La mayoría de los organismos (especialmente plantas superiores, algas y hongos) sintetizan 15, 15'-*cis*-fitoeno, aunque otros organismos pueden sintetizar el isómero *trans*-. La formación de uno

u otro isómero depende de la estereoquímica de la remoción de un hidrógeno en la condensación del GGPP. Esta molécula tiene la estructura básica de los carotenoides, y las reacciones subsiguientes involucran transformaciones químicas de esta estructura (Gross, 1991; Delgado-Vargas, 2000).

Figura 3.14. Polimerización del isopentenil pirofosfato para formar geranilgeranil pirofosfato (Delgado-Vargas, 2000)

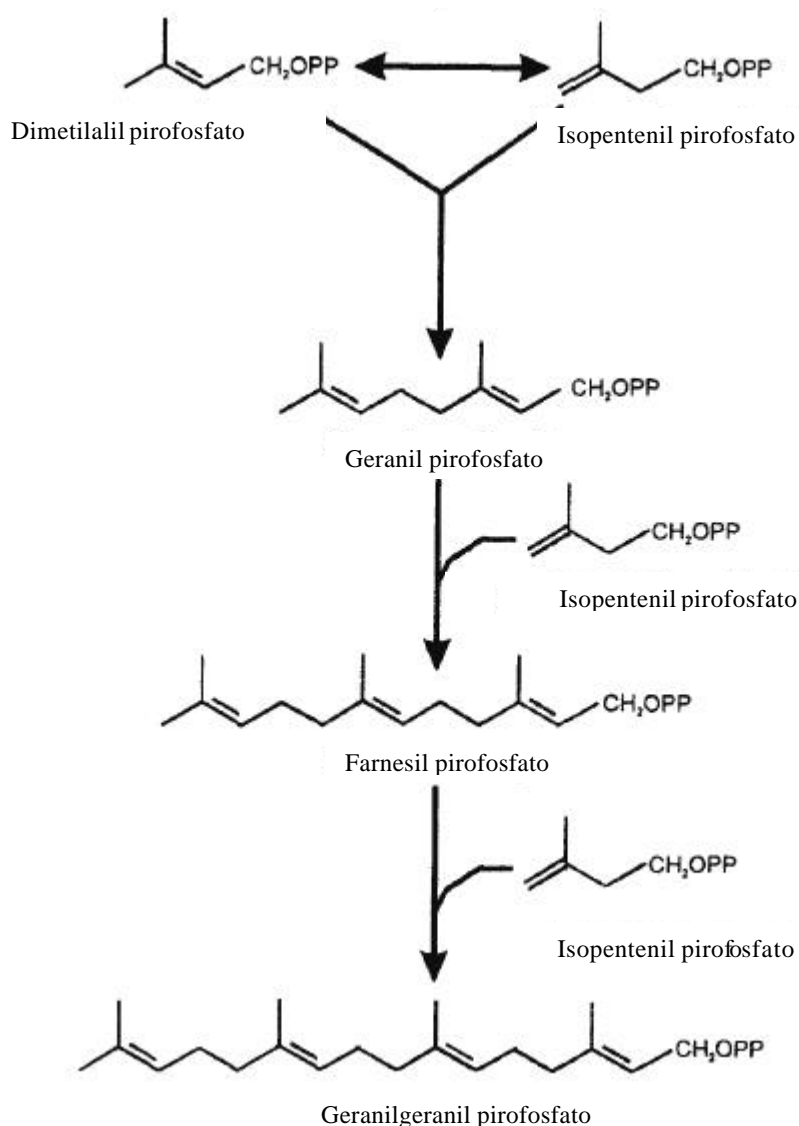
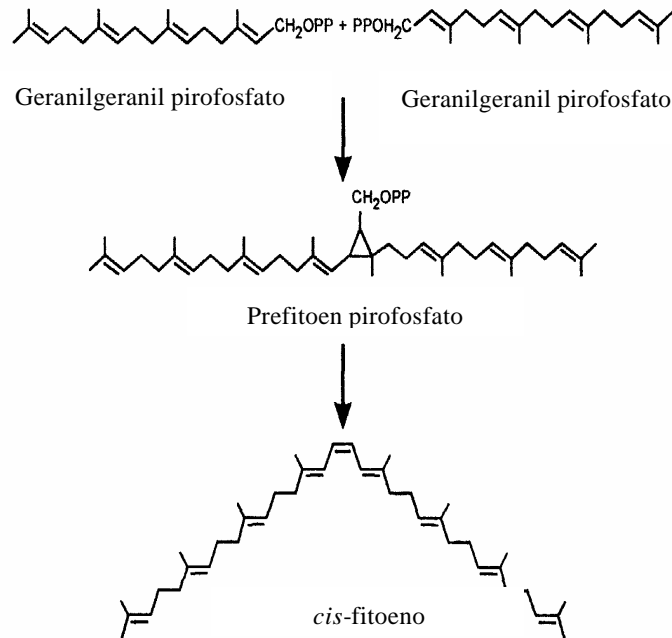


Figura 3.15. Biosíntesis de fitoeno



Después, el fitoeno sufre 4 reacciones de desaturación para dar fitoflueno, η -caroteno, neurosporeno y finalmente, licopeno (Figura 3.16).

La biosíntesis de carotenos cíclicos ocurre mediante la ciclización de uno o ambos grupos terminales del licopeno. En plantas superiores licopeno puede convertirse en β - o ϵ -caroteno gracias a licopeno ciclasas; estas enzimas aceptan otros sustratos acíclicos como el neurosporeno (Figura 3.17).

La inserción de oxígeno ocurre después de la ciclización en una etapa tardía de la biosíntesis, donde los carotenos correspondientes son oxidados. La hidroxilación ocurre principalmente en las posiciones 3 y 3', formándose las xantofilas mas comunes, pero también puede ocurrir en otras posiciones del anillo o en la cadena. Los epoxicarotenoides se sintetizan mediante la oxidación de carotenos o xantofilas, por un mecanismo desconocido. A partir de estos epóxidos se pueden formar carotenoides alénicos mediante rearrreglos moleculares (Gross, 1991).

Figura 3.16. Reacciones de desaturación para formar licopeno

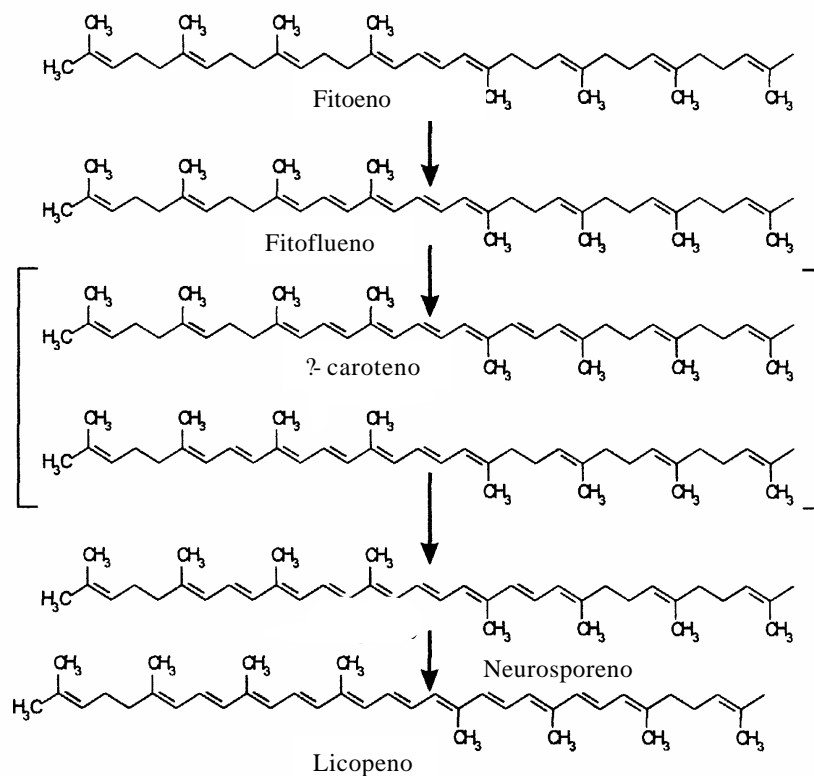
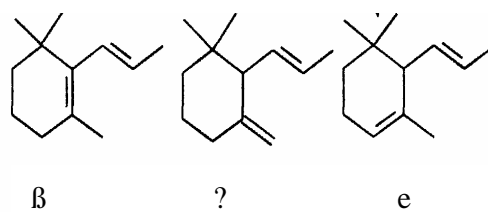


Figura 3.17. Anillos que se producen mediante la ciclización del licopeno



3.3.5. Funciones

3.3.5.1. Color

Los carotenoides dan color a flores, semillas, frutos y algunos hongos y el color tiene un papel importante en la reproducción: la coloración atrae animales que dispersan el polen, semillas o esporas (Delgado-Vargas, 2000; Leener, et al., 2000; Schoefs, 2002).

3.3.5.2. Fotosíntesis

Los principales pigmentos involucrados en la fotosíntesis son las clorofilas y carotenoides. Los carotenoides tienen dos funciones bien conocidas en la fotosíntesis: son pigmentos accesorios para captar la energía luminosa y fotoprotectores contra el daño oxidativo. Una de las características estructurales de los carotenoides es que absorben la luz visible. Se ha probado que los carotenos y las xantofilas tienen la capacidad de transferir la energía absorbida a las clorofilas. El mecanismo por el cual se transfiere la energía aun no está bien comprendido, pero la transferencia de energía es eficiente solamente cuando las moléculas se encuentran cerca. Por este motivo, en la membrana del tilacoide, los carotenoides están unidos a clorofilas y proteínas para formar complejos específicos denominados fotosistema I y fotosistema II. El principal carotenoide asociado al fotosistema I es el β -caroteno y la luteína está presente en el fotosistema II (Gross, 1991; Delgado-Vargas, 2000; Leener, et al., 2000).

Cuando las hojas son expuestas a una alta iluminación, los grupos epoxi de la xantofila violaxantina son removidos para formar anteraxantina y después zeaxantina. Este es uno de los mecanismos de protección contra el exceso de luz encontrados en la planta. El número de moléculas de carotenoides es superior en las hojas expuestas a la luz que en las hojas mantenidas en la oscuridad (Delgado-Vargas, 2000).

3.3.5.3. Precursores de vitamina A

En los mamíferos, un pequeño grupo de carotenoides, aproximadamente 50 de 600 compuestos conocidos, sirven como precursores de vitamina A. Parece que los carotenoides en los vertebrados son oxidados y divididos en el doble enlace 15-15' para dar dos

moléculas de retinal. En los mamíferos, los carotenoides sufren una digestión proteolítica en el estómago y el intestino delgado, convirtiéndolos en vitamina A en la mucosa intestinal; posteriormente son solubilizados por las sales biliares en el intestino delgado y absorbidos con otros lípidos (Leener et al., 2000).

3.3.5.4. Antioxidante

Los estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el papel fotoprotector de los carotenoides está relacionado con su actividad antioxidante o con la modulación de otros antioxidantes celulares, protegiendo a células y organismos del daño oxidativo. La protección se debe a la capacidad de los carotenoides para inactivar radicales libres, sobretodo a bajas presiones de oxígeno, frecuentes en la mayoría de los tejidos bajo condiciones fisiológicas (Gross, 1991).

También se ha establecido que la estructura del carotenoide tiene gran influencia en su actividad antioxidante; por ejemplo, la cantaxantina y la astaxantina muestran una mejor actividad antioxidante que el β -caroteno o la zeaxantina. En otro estudio se concluyó que la actividad antioxidante dependía del número de dobles enlaces, grupos ceto, etc. Miller et al. (1996) evaluó la actividad antioxidante de diferentes carotenoides en presencia de radicales y estableció el orden de actividad: licopeno > β -criptoxantina > luteína = zeaxantina > α -caroteno > equinonona > cantaxantina = astaxantina (Kurilich y Juvik, 1999; Delgado-Vargas, et al., 2000; Rodríguez-Amaya, 2001)

Algunas xantofilas, además de su importancia como pigmentos, son consideradas agentes antioxidantes potenciales y otras cuantas son precursores de vitamina A, tal es el caso de la criptoxantina (Kurilich y Juvick, 1999).

3.3.6. Análisis de Xantofilas

El análisis de los carotenoides es muy complicado debido a su inestabilidad, su tendencia a sufrir estereomutación, su foto y termolabilidad, y la facilidad con la que pueden oxidarse, además de que son parcialmente destruidos enzimáticamente, especialmente por lipooxigenasas (Gross, 1991, Leenheer, 2000, Rodríguez-Amaya, 2001;

Shoefs, 2002). Por estos motivos, cualquiera que sea el método analítico escogido, se deben tomar precauciones para evitar pérdidas cuantitativas y la formación de interferencias que incluyen (Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Zerlotti, 1999; Rodríguez-Amaya, 2001):

- Llevar a cabo en el menor tiempo posible
- Exclusión de oxígeno utilizando una atmósfera inerte de nitrógeno o argón o bien, emplear antioxidantes durante todos los pasos de la extracción, tales como hidroxitolueno butilado, pirogalol y palmitato de ascorbilo.
- Proteger las muestras de la luz.
- Evitar altas temperaturas (no mayores a 40°C).
- Evitar el contacto con ácidos.
- Utilizar solventes de alta pureza.

Dada la diversidad de materiales biológicos en los que se pueden encontrar carotenoides, no se puede señalar una técnica estándar para su extracción (Gross, 1991). El análisis usualmente consiste en los siguientes pasos (Rodríguez-Amaya, 2001):

- Preparación de la muestra
- Extracción
- Partición a un solvente compatible con el paso cromatográfico subsecuente
- Saponificación y lavado
- Concentración o evaporación del solvente
- Separación cromatográfica
- Identificación y cuantificación

Antes de la extracción se recomienda homogenizar el tejido. El material debe molerse o ser cortado en piezas pequeñas para que la extracción sea completa (Gross, 1991). La elección del mejor disolvente para la extracción depende de la muestra, su pretratamiento y la composición de carotenoides. En el caso de los tejidos frescos se prefieren los disolventes orgánicos miscibles en agua, usualmente acetona, metanol o etanol. Mientras que para las muestras secas o liofilizadas se prefieren los disolventes inmiscibles como el acetato de etilo o el dietil éter o bien, las muestras son rehidratadas (Zerlotti, 1999).

Estos extractos usualmente contienen una cantidad sustancial de agua, que puede ser removida mediante la partición a hexano, éter de petróleo, dietil éter, diclorometano o una mezcla de estos solventes. El dietil éter o una mezcla de éter con hexano o éter de petróleo se prefiere para extractos con gran cantidad de xantofilas (Rodríguez-Amaya, 2001).

Algunas veces después de este paso, se procede a saponificar la muestra. La saponificación es un método efectivo para remover clorofilas y lípidos no deseados que pueden interferir con la separación cromatográfica. Sin embargo, la saponificación extiende el tiempo del análisis y puede provocar la formación de interferencias y la degradación de carotenoides, por lo cual no siempre se realiza. Cuando es indispensable las muestras se saponifican después de la transferencia de los carotenoides a hexano o éter de petróleo. Se adiciona una cantidad igual de hidróxido de potasio al 10% en metanol y se deja toda la noche a temperatura ambiente, después de la cual la mezcla se lava varias veces con agua para remover toda la base (Kimura y Rodríguez-Amaya, 1999; Rodríguez-Amaya, 2001).

La separación de los carotenoides puede llevarse a cabo en cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alta resolución (en fase normal o reversa) o una combinación de éstas. Ya que los carotenoides son termolábiles, la cromatografía de gases no se emplea para la separación. La elección del método cromatográfico dependerá de (Zerlotti, 1999):

- La complejidad de la composición de carotenoides
- Cantidad de muestra
- Objetivo del análisis
- Resolución, pureza y velocidad requerida
- Equipo disponible

Actualmente, la cromatografía de líquidos de alta resolución en columnas C₁₈ es el método de elección para separar carotenos y xantofilas, debido al carácter hidrofóbico de estas moléculas (Schoefs, 2002). La mayoría de las separaciones se han llevado a cabo en columnas con partículas esféricas de 5µm de 250 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno (Rodríguez-Amaya, 2001).

Las propiedades más importantes a considerar en la selección de la fase móvil son polaridad, viscosidad, volatilidad y toxicidad, además de que tiene que ser inerte con respecto a los carotenoides. Se han sugerido muchos sistemas de solventes, pero los más utilizados son combinaciones de acetonitrilo y metanol (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.3.7. Carotenoides del maíz

El color de los granos de maíz es variable; el patrón puede ser de un color o combinado. Los pigmentos responsables de la coloración están localizados en uno o más tejidos; el pericarpio puede ser incoloro, naranja, rojo, rojo-morado o sus combinaciones; la capa de aleurona puede ser incolora, roja, roja-morada o café; el endospermo puede ser incoloro o de distintos tonos de amarillo y el germen puede ser incoloro, amarillo, rojo-naranja o morado (Gross, 1991; Hallauer, 1994).

Los pigmentos del maíz son principalmente carotenoides, aunque parte del color puede deberse a las antocianinas (Hallauer, 1994). Los carotenoides del maíz han sido extensivamente estudiados e identificados ya hace varios años. El maíz fue la primera fuente de muchos carotenoides y algunos de ellos recibieron nombres que derivados de esta fuente tales como: zeaxantina, zeinoxantina y α - y β -zeacaroteno (Gross, 1991).

Se han reportado diversidad en cuanto al contenido y composición de carotenoides en maíz, pero hay muy pocos estudios con un número limitado de genotipos que evalúen esta variabilidad (Kurilich y Juvik, 1999).

En las diferentes variedades de maíz pueden encontrarse un patrón complejo de carotenoides que puede caracterizarse como una mezcla de carotenos y mono y dihidroxicarotenoides de las series β , ϵ - y β , β - predominado la luteína y la zeaxantina. Este patrón de carotenoides es inusual, ya que no se encuentra en otros frutos. También es rara la acumulación en algunos granos de maíz de cinco carotenoides precursores de vitamina A: α -, β - y γ -caroteno, β -zeacaroteno y β -criptoxantina (Gross, 1991)

Resumiendo algunos estudios realizados, los carotenoides totales estaban presentes en una cantidad de 30-77 $\mu\text{g/g}$. Aunque el patrón no variaba mucho, las proporciones relativas de los carotenoides variaban marcadamente. La luteína, el pigmento mayoritario en casi todos los casos, constituía del 8 al 64% de los carotenoides totales, mientras que la zeaxantina, el segundo pigmento mayoritario variaba del 4.8 al 71.9%.

El maíz amarillo, por su parte, presenta una mezcla de seis a ocho compuestos carotenoides diferentes. La concentración de estos pigmentos en los granos de maíz es mayor en la región córnea del endosperma, existiendo una relación directa entre el endospermo amarillo y la provitamina A. Entre el maíz amarillo y el blanco, hay cierta diferencia nutricional, así en ensayos con cerdos se encontró que los animales alimentados con maíz amarillo ganaron mas peso y con mayor rapidez que con el blanco. Además, el maíz amarillo con altos niveles de xantofilas, da una pigmentación deseable a la piel de los pollos y a la yema de los huevos, siendo por tanto ventajoso su uso en la alimentación animal. (Kurilich y Juvik, 1999). Los niveles mas bajos de xantofilas corresponden a maíces deteriorados, almacenados durante largos periodos de tiempo (FEDNA, 2003).