

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA



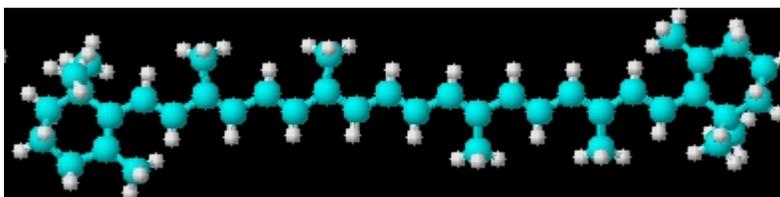
CAROTENOIDES

Profesor

Alejandro Martínez Martínez
Facultad de Química Farmacéutica
E-mail: amart@muisca.udea.edu.co

Medellín, Febrero de 2003

CAROTENOIDES



DEFINICION

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranyl-pirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). La Figura 1 muestra algunos ejemplos de los carotenoides más distribuidos en la naturaleza.

2. CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína).

A los carotenoides generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de los anillos laterales, en especial la posición del enlace doble. El β -caroteno, hoy es denominado β,β -caroteno, para indicar que los dos anillos de los extremos tienen el enlace doble en la misma posición relativa. El α -caroteno, ahora se denomina β,ϵ -caroteno.

En general para los carotenos se usa el sufijo caroteno, y para las xantofilas el sufijo ina.

3. DISTRIBUCION Y ESTADO NATURAL

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamingo son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria).

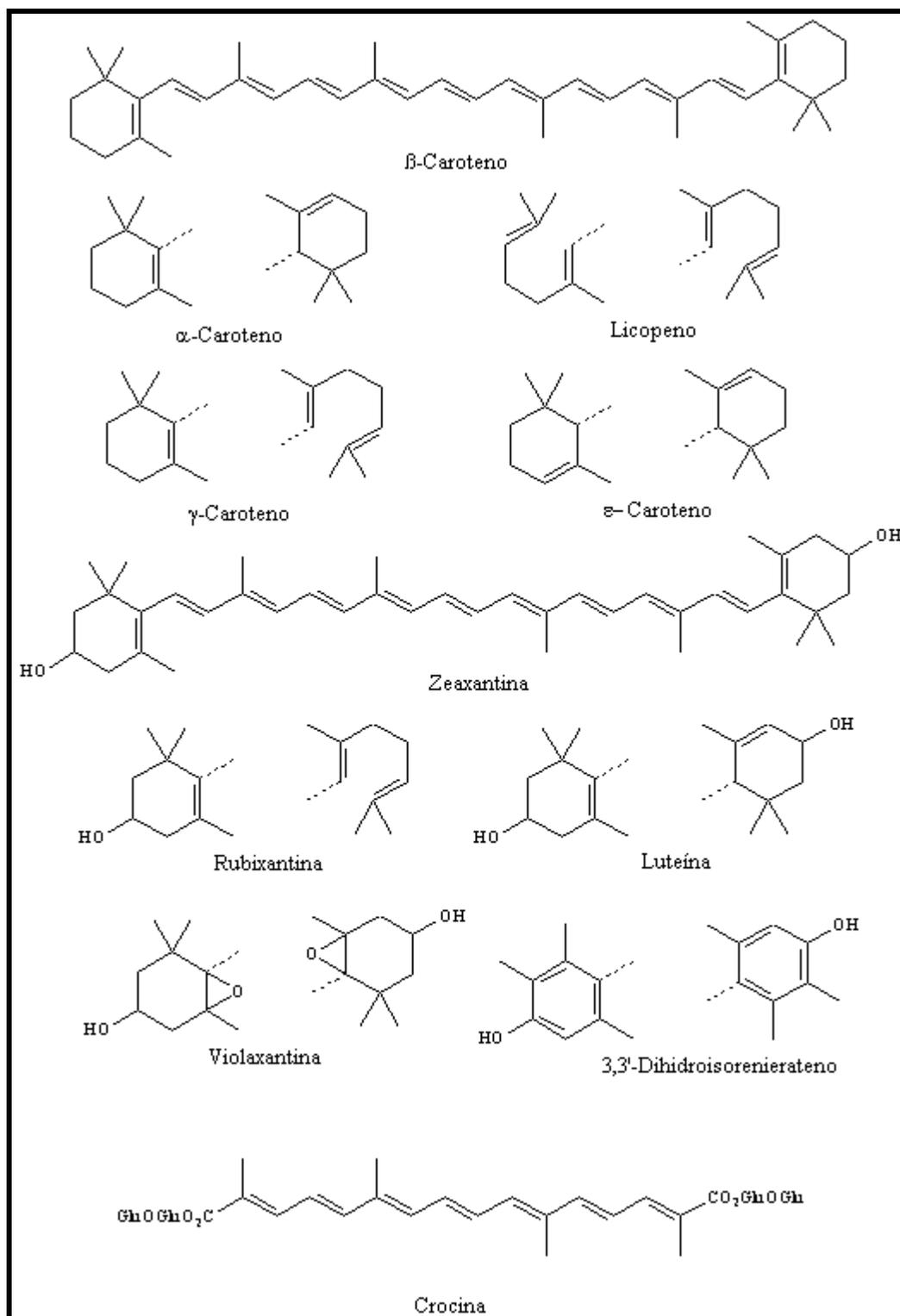


Figura 1. Ejemplos de carotenoides naturales ampliamente distribuidos

El caroteno más comúnmente encontrado es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25-30 % del contenido total de carotenoides en las plantas. La luteína es la xantofila más abundante (40-45 %), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno¹.

Los carotenoides junto con los flavonoides y las clorofilas, son los pigmentos vegetales más distribuidos. En especial existen carotenoides que confieren coloraciones amarilla, naranja, roja y violeta a tejidos vegetales y algunos órganos animales. Los flavonoides confieren también coloraciones similares, inclusive coloración azul a muchas flores y frutos, mientras que las clorofilas se reconocen fácilmente por su coloración verde. Existen también vegetales tan conocidos como la remolacha *Beta vulgaris*, que debe su color característico a pigmentos nitrogenados denominados betacianinas, menos distribuidos que los primeros.

4. EXTRACCION Y AISLAMIENTO

Los carotenoides debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo isomerismo *cis* y *trans*) es un factor a considerar al momento de realizar su extracción. El calor también favorece reacciones térmicas de degradación. El aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. Por estas razones la extracción de carotenoides se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además se debe realizar lo más rápido posible, y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros; y a que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua la cual dificulta una extracción eficiente, es conveniente eliminar dicho agua. Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede entonces extraer con un solvente apolar. Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire.

Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de KOH 60% alcohólico. Esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, con atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados. Si se desea un proceso más rápido, es aconsejable la ebullición durante 5-10 minutos.

¹ Britton, G., Hornero-Méndez, D., "Carotenoids and Colour in Fruit and Vegetables", In: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Tomás-Barberán, F. A. and Robins, R. J., eds., Clarendon Press, Oxford, 1997, pp. 11-27.

Las mezclas de carotenos y las xantofilas mono- y dihidroxiladas pueden separarse agitando una solución en éter de petróleo con un volumen de metanol al 90%. Las xantofilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las monohidroxiladas y los carotenos quedan en la fase etérea. Repitiendo este proceso con la fase etérea se separan en la fase metanólica las xantofilas monohidroxiladas, y en la fase etérea quedan los carotenos. Las xantofilas separadas en las fases metanólicas pueden recuperarse extrayéndolas con éter etílico.

Debido a que los extractos de carotenoides generalmente están impurificados por otras sustancias como los esteroides, estos se pueden eliminar dejando el extracto concentrado en solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche. De esta manera los esteroides se precipitan y pueden ser retirados por centrifugación o filtración.

Una vez obtenido el extracto o los extractos de carotenoides, estos se pueden separar y analizar por cromatografía en capa fina, en papel o en columna. El método más usado es la cromatografía en capa fina con varias clases de fases estacionarias que incluyen: óxido de magnesio activado, sílica gel, hidróxido de calcio y fosfato de magnesio entre otros. La Tabla 1 resume los valores Rf de varios carotenoides naturales.

Tabla 1. Valores Rf en CCF de varios carotenoides naturales²

| Pigmento | Rf x 100 (Ver eluentes en pie de tabla) | | | | | |
|-------------------------|---|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| α -Caroteno | 66 | 80 | 88 | - | - | - |
| β -Caroteno | 49 | 74 | 84 | - | - | - |
| γ -Caroteno | 11 | 41 | 45 | - | - | - |
| ε -Caroteno | 70 | 84 | - | - | - | - |
| Licopeno | 01 | 13 | 15 | - | - | - |
| Luteína | - | - | - | 10 | 35 | 56 |
| Zeaxantina | - | - | - | 05 | 24 | 55 |
| Violaxantina | - | - | - | 05 | 21 | 84 |
| Criptoxantina | - | - | - | 54 | 75 | 07 |
| Capsantina | - | - | - | 06 | 16 | - |
| Neoxantina | - | - | - | - | - | 93 |

Fases estacionarias y eluentes: 1. MgO activado, éter de petróleo (90-110°)-Benceno (1:1), 2. MgO activado, éter de petróleo (90-110°)-Benceno (1:9), 3. Sílica gel-Hidróxido de calcio (1:6), éter de petróleo-benceno (49:1), 4. Fosfato de magnesio, éter de petróleo (40-60°)-benceno (9:1), 5. Sílica gel, Diclorometano-Acetato de etilo (4:1).

Para la separación y aislamiento cromatográfico con sílica gel algunos autores recomiendan alcalinizar la sílica con KOH al 3% para prevenir la isomerización durante el desarrollo cromatográfico. Además, como los carotenoides comienzan a descomponerse al secarse la placa por la evaporación del eluente, recomiendan trabajar con atmósfera de un gas inerte.

² Harborne, J. B., "Phytochemical Methods", John Wiley & Sons, New York, 1973, 119-128 pp.

Para proteger los colores contra la oxidación, las placas cromatográficas pueden rociarse con una solución de aceite de parafina al 5% en éter de petróleo.

Más recientemente y gracias al avance de los métodos cromatográficos instrumentales es posible el aislamiento rápido de carotenoides puros. En este sentido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es muy utilizada actualmente, debido a que se puede trabajar a bajas temperaturas, en ausencia de luz y aire, y es muy sensible por los grupos dienos conjugados abundantes en las estructuras de los pigmentos carotenoides. Aunque se han utilizado columnas de fase normal, son más utilizadas las de fase reversa, especialmente las de octadecilsilano (columnas C18)³.

En la actualidad, el procedimiento de análisis e identificación de los carotenoides en muestras biológicas se realiza en tres etapas principales. En la primera, se obtiene el extracto crudo. Posteriormente, el extracto es sometido a extracción en un cartucho con una fase sólida (de sílica gel para eliminar interferencias polares, o de octadecilsilano u octilsilano, para eliminar impurezas apolares, ó ambos). El extracto se recupera nuevamente por elución con un solvente adecuado, y finalmente se somete a análisis y/o fraccionamiento preparativo por CLAE. La identificación puede hacerse por comparación con los tiempos de retención de carotenoides estándares, o en el caso preparativo los carotenoides aislados se someten a análisis espectrales de masas, RMN, etc.

El desarrollo reciente de interfaces CLAE-Espectrometría de masas, y detectores como los de arreglo de diodos, permiten obtener los correspondientes espectros de masas y UV-visible, los cuales facilitan el proceso de identificación.

Como muestras de referencia pueden obtenerse β -caroteno, canthaxantina y crocina (del azafrán), luteína, violaxantina y neoxantina (de las hojas de cualquier planta superior), licopeno (del tomate rojo o de salsa ó pasta de tomate comercial), y capsantina del pimentón rojo.

En el libro de Harborne, se describen métodos para el aislamiento de carotenoides de hojas, de pétalos (de Compuestas como las crisantemas, caléndula, diente de león, etc.), y de frutos (pimentón rojo).

En el libro de Ikan, se describen procedimientos para el aislamiento y caracterización de capsantina (pimentón rojo), licopeno (de la pasta de tomate comercial), y para la determinación de β -caroteno y clorofilas en plantas.

En el libro de Weedon y Moss (1995), se muestra una revisión de estos compuestos y sus métodos de extracción y caracterización⁴.

³ Burns, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M., Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables, *Phytochemistry* 62 (6) 939-947 (2003).

⁴ Weedon, B.C.L., Moss, G.P., "Carotenoids. Vol. 1^a: Isolation and Analysis", Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds., Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 27-70.

Otros métodos analíticos recientes:

- Aislamiento por Cromatografía en Contracorriente⁵.
- Determinación de carotenoides en preparados galénicos⁶.

5. BIOSINTESIS

Los carotenoides son tetraterpenoides (terpenoides con 40 átomos de carbono) que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico a través de dos unidades C₂₀ de geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP). La Figura 2 esquematiza la biogénesis de la unidad C₄₀ denominada fitoeno.

6. ENSAYOS DE RECONOCIMIENTO

Los carotenoides como se anotó anteriormente, son en su mayoría pigmentos liposolubles de colores amarillo, naranja y rojo. Por lo cual se les puede reconocer fácilmente en los extractos vegetales con ayuda de la CCF. Al adicionarle ácido sulfúrico conc. a las manchas sobre la placa cromatográfica, o a una solución anhidra en un solvente como cloroformo o diclorometano; los carotenoides toman coloraciones azulosas. Debido a la presencia de varios enlaces dobles C=C conjugados, reaccionan también con el reactivo de Liebermann-Burchard, usado para el reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides, por lo tanto debe tenerse en cuenta que los carotenoides son falsos positivos para esteroides y/o triterpenoides, sin embargo la presencia de los carotenoides en una muestra vegetal se reconoce por sus colores característicos (amarillo-naranja-rojo), mientras que la mayoría de esteroides y triterpenoides conocidos hasta hoy son incoloros.

7. CARACTERIZACION ESPECTRAL

Como se anotó anteriormente, aunque es relativamente fácil identificar la mayoría de carotenoides por comparación de muestras y estándares mediante la CCF y la CLAE, cuando se tienen carotenoides que no es posible identificar por tales métodos, es necesario recurrir a los métodos espectrales como UV-visible, IR, EM y RMN.

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nm. Se observa un máximo alrededor de 450 nm y generalmente se aprecian dos máximos u hombros a cada lado. La Figura 3 muestra el espectro visible del β -caroteno en éter de petróleo. La Tabla 2 presenta los datos de los espectros visible de algunos carotenoides, en n-hexano y en cloroformo.

⁵ Li, H-B., y col., J. CHROMATOGRAPHY, 905, 151-155 (2001).

⁶ Gatti, R., y col., J. CHROMATOGRAPHY, 905, 345-350 (2001).

Tabla 2. Datos del espectro visible de varios carotenoides en dos solventes

| PIGMENTO | MAXIMOS DE ABSORCION (nm) | |
|----------------------|---------------------------|------------------------|
| | n-Hexano ó éter de p. | Cloroformo |
| α -Caroteno | 422, 444, 473 | 454, 485 |
| β -Caroteno | 425h, 451, 482 | 466, 497 |
| γ -Caroteno | 437, 462, 494 | 447, 475, 508 |
| ϵ -Caroteno | 419, 444, 475 | 418, 442, 471 (Etanol) |
| Licopeno | 446, 472, 505 | 456, 485, 520 |
| Luteína | 420, 447, 477 | 428, 456, 487 |
| Violaxantina | 443, 472 | 424, 452, 482 |
| Zeaxantina | 423, 451, 483 | 429, 462, 494 |
| Neoxantina | 415, 437, 466 | 421, 447, 477 |
| Rubixantina | 432, 462, 494 | 439, 474, 509 |
| Fucoxantina | 425, 450, 478 | 457, 492 |
| Criptoxantina | 425, 451, 483 | 433, 463, 497 |

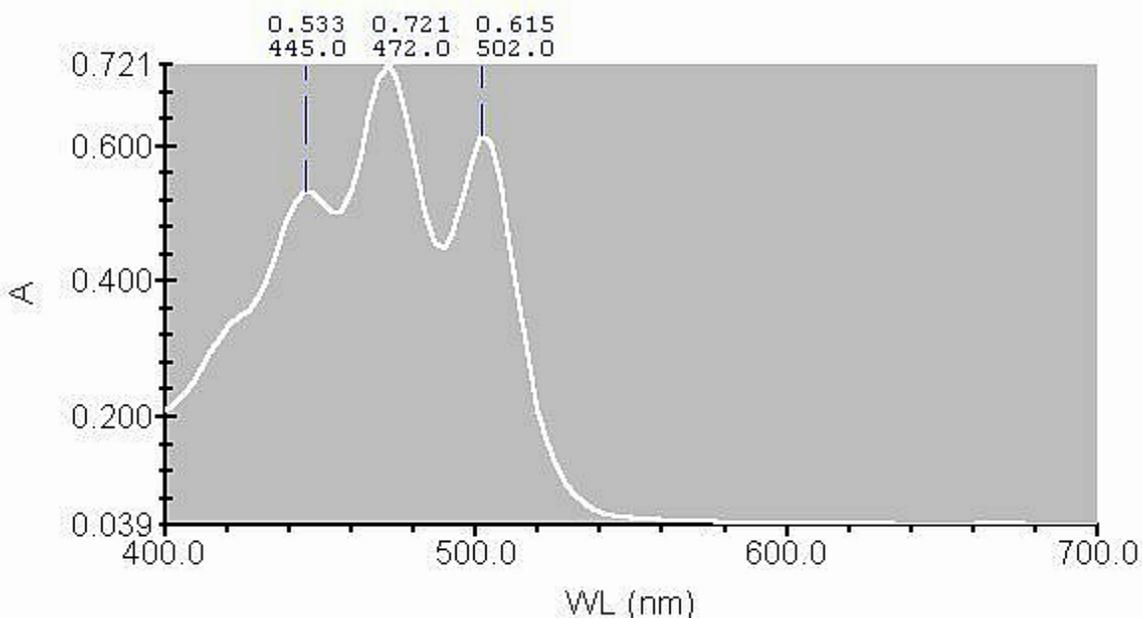


Figura 3. Espectro visible del licopeno en n-hexano

El espectro IR generalmente no es muy útil para la caracterización de la mayoría de carotenoides, sin embargo puede servir para el reconocimiento de carotenoides raros, pues proporciona información sobre la presencia de otros grupos funcionales como grupos carbonilo y enlaces triples C-C.

Debido a la baja volatilidad de los carotenoides, sus espectros de masas de impacto electrónico son de difícil interpretación y no proporcionan el ion molecular, por lo cual prácticamente no se usan. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas de ionización suave, se obtiene información estructural muy valiosa.

Como en la gran mayoría de metabolitos secundarios, en lo correspondiente a la caracterización química, la mejor técnica para la elucidación estructural de los carotenoides es la RMN en sus diferentes modalidades mono- y bidimensionales.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Es conocido que los carotenoides de las frutas y verduras de la dieta son la principal fuente de vitamina A. La molécula de β -caroteno se parte en dos moléculas de vitamina A (retinol), en un proceso que ocurre en el intestino y en el que participa un complejo enzimático dioxigenasa. Cualquiera de los carotenoides que posean el anillo β no sustituido, característico del β -caroteno, es precursor de la vitamina A, por ejemplo α -caroteno, β,β -caroteno-5,6-epóxido y β -criptoxantina.

El uso biomédico de los carotenoides está fundamentalmente dirigido a la producción de vitamina A, sin embargo actualmente se investiga el potencial del licopeno, la luteína y la zeaxantina, en la prevención de enfermedades como el cáncer y la enfermedad coronaria. Algunos estudios recientes son:

- El β -caroteno suplementado en la dieta ha mostrado alguna evidencia de acción antitumoral en ratas. Las bastadinas aisladas de esponjas marinas presentan acción antitumoral, contra el cáncer de la piel y en leucoplasias orales.
- El Vesanoid[®], es un derivado de la vitamina A que presenta acción citotóxica, y es usado para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda⁷.
- La astaxantina, es el carotenoide responsable del color del salmón. Este carotenoide se produce comercialmente mediante síntesis química, para usarlo en la cría de salmón. Sin embargo, tiene uso potencial en medicina, debido a que ha mostrado efecto estimulante en el sistema inmune humano, reduce el cáncer oral en ratas e inhibe el cáncer de seno en ratones. Recientemente se ha logrado mediante la ingeniería genética producir este y otros carotenoides, con cultivos bacterianos y plantas como el tabaco⁸.

7. FUNCIÓN BIOLÓGICA

Aunque no se conoce hasta ahora de manera precisa la función de los carotenoides en las plantas, los autores sugieren que por conferir colores a tejidos y órganos importantes para la reproducción vegetal (flores y frutos), servirían como factor importante en la atracción de insectos polinizadores.

Por otro lado, dada la actividad antioxidante demostrada por ejemplo por el β -caroteno y su capacidad de absorber radiaciones en el espectro visible, podrían ser factores importantes en procesos como la fotosíntesis.

⁷ Manufacturing Chemist (Abril 1998), p. 16.

⁸ Borman, S., CHEM. ENG. NEWS 78, 39 (2000).

8. SINTESIS

Se ha reportado la síntesis total de fucoxantina y halocintiaxantina. También se ha estudiado la descomposición fotoquímica de carotenoides con grupos alénicos.

9. ESTUDIOS DE CAROTENOIDES DE DIFERENTES PLANTAS

Bixa orellana^{9,10}, Passiflora edulis¹¹, guayaba¹², maíz¹³.

⁹ Mercadante, A. Z. Y col., PHYTOCHEMISTRY 46 (8) 1379-1383 (1997).

¹⁰ Scotter, M. J. y col., J. AGRIC. FOOD CHEM. 46, 1031 (1998).

¹¹ Mercadante, A. Z., y col., J. AGRIC. FOOD CHEM. 46, 4102-4106 (1998).

¹² Mercadante, A. Z., y col., J. AGRIC. FOOD CHEM. 47, 145-151 (1999).

¹³ Kurilich, A. C., y col., J. AGRIC. FOOD CHEM. 47 (5) 1948-1955 (1999).