

Memoria de Investigación

Estudio sobre la susceptibilidad a la isomerización de los carotenoides maculares

Study about the susceptibility of macular carotenoids
to isomerization

Alumno:

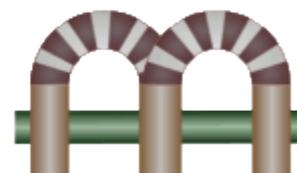
**Francisco Javier Gutiérrez
Rodríguez**

Línea de Investigación Color y Calidad de los Alimentos

2015-2016

Tutor de Investigación: Antonio Jesús Meléndez Martínez - Rafael Moreno Rojas

Palabras clave: carotenoides, luteína, zeaxantina, purificación, isomerización, (Z)-isómero,
(todo-E)-isómero, calor, luz



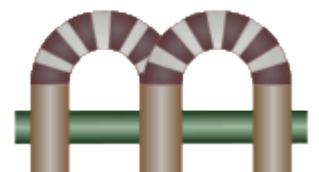
MÁSTER EN AGROALIMENTACIÓN

Memoria de investigación titulada: "**Estudio sobre la susceptibilidad a la isomerización de los carotenoides maculares**" (*Study about the susceptibility of macular carotenoids to isomerization*) realizada por Francisco Javier Gutiérrez Rodríguez, tutelado por: Antonio Jesús Meléndez Martínez - Rafael Moreno Rojas

Córdoba, 18 de enero de 2018

Fdo. el/a alumno/a:

VºBº Tutor de Investigación



Contenido

Resumen.....	3
Abstract	3
Introducción	4
Estructura y propiedades.....	4
Isomería Z/E.....	5
Fuentes dietéticas	7
Biodisponibilidad.....	9
Papel como antioxidante y filtro de luz azul.....	12
Luteína, zeaxantina y salud.....	13
Objetivos	15
Material y métodos.....	15
Reactivos.....	15
Muestras.....	15
Extracción de carotenoides	15
Saponificación.....	16
Purificación	16
Pos-Purificación.....	17
Isomerización.....	17
Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	17
Análisis estadístico	18
Resultados y Discusión	18
Extracción y saponificación.....	18
Purificación	19
Isomerización.....	20
Conclusiones.....	30
Propuestas.....	30
Bibliografía.....	31

Estudio sobre la susceptibilidad a la isomerización de los carotenoides maculares /

Francisco Javier Gutiérrez Rodríguez

Resumen

La luteína y la zeaxantina son carotenoides que pertenecen al grupo de las xantofilas. Junto a la mesozeaxantina, se localizan con una alta selectividad en una zona de la retina, denominada mácula, por ello, se conocen como carotenoides maculares, a los que se les atribuyen multitud de propiedades saludables. Estos compuestos son susceptibles de sufrir un proceso denominado isomerización geométrica, esto conlleva a que puedan encontrarse en dos configuraciones: todo-*E* o *Z*. Precisamente, en este trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre la susceptibilidad a la isomerización de luteína y zeaxantina, debido a que algunos (*Z*)-isómeros de carotenoides se diferencian de sus (todo-*E*)-isómeros en términos de biodisponibilidad y estabilidad, entre otros. Por ello, se comenzó purificando ambos compuestos a partir de extractos saponificados de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y bayas de Goji (*Lycium Chinense*), consideradas buenas fuentes de luteína y zeaxantina, respectivamente. Una vez obtenidos, se procedió a estudiar la formación de isómeros sometiendo a estos compuestos a una fuente de calor (isomerización térmica) y a una fuente de luz blanca en presencia de yodo (isomerización catalizada por yodo). Los resultados han mostrado que el calor y la luz, junto al yodo, son capaces de provocar un aumento de (*Z*)-isómeros y una merma en los (todo-*E*)-isómeros de ambos carotenoides, pero aparte, la luteína mostró una mayor estabilidad térmica con respecto a la zeaxantina. Por otra lado, en ambas reacciones de isomerización se estableció un equilibrio donde la especie mayoritaria fue el (todo-*E*)-isómero, aunque el (13-*Z*)-isómero fue el (*Z*)-isómero predominante en la isomerización térmica y en el caso de la isomerización catalizada por yodo, el (9-*Z*)-isómero. A la luz de los resultados obtenidos, sería interesante estudiar a corto plazo la estabilidad de cada uno de los isómeros para evaluar en un futuro su posible bioactividad.

Abstract

Lutein and zeaxanthin are carotenoids belonging to the group of xanthophylls. Together with mesozeaxanthin, they are located with a high selectivity in a zone of the retina, called macula, therefore, they are known as macular carotenoids, which have many healthy properties. These compounds are susceptible to a process called geometric isomerization, which means that they can be found in two configurations: all-*E* or *Z*. Precisely, in this work, a study has been carried out on the susceptibility to the isomerization of lutein and zeaxanthin because some (*Z*)-isomers of carotenoids have been distinguished from their (all-*E*)-isomers in terms of bioavailability and stability, among others. For this reason, it was started by purifying both compounds from saponified extracts of cempasúchil (*Tagetes erecta*) and Gogi berries (*Lycium Chinense*), considered as good sources of lutein and zeaxanthin, respectively. Once obtained, the formation of isomers was studied by subjecting these compounds to a heat source (thermal isomerization) and to a white light source in the presence of iodine (iodine-catalyzed isomerization). The results have shown that heat and light, together with iodine, are capable of causing an increase in (*Z*)-isomers and a decrease in the (all-*E*)-isomers, but apart, the lutein presented a greater thermal stability with respect to the zeaxanthin. On the other hand, in both isomerization reactions an equilibrium was established where the major species

was the (all-*E*)-isomer, although the (13-*Z*)-isomer was the predominant (*Z*)-isomer in thermal isomerization and in the iodine-catalyzed isomerization, the (9-*Z*)-isomer. In the light of the results obtained, it would be interesting to study in the short term the stability of each of the isomers to evaluate in the future its possible bioactivity.

Introducción

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y por algunas bacterias no fotosintéticas y hongos¹. La mayoría de los carotenoides están formados por un esqueleto de 40 átomos de carbono donde se establecen dobles enlaces conjugados que son responsables del color, reactividad y su papel en procesos de transferencia de energía. Estos compuestos se pueden clasificar en dos grupos en función de la presencia o no de grupos funcionales oxigenados: xantofilas, que contienen oxígeno (como es el caso de la luteína y la zeaxantina), y carotenos, que sólo contienen carbono e hidrógeno (donde se incluyen α -caroteno, β -caroteno y licopeno²).

Los carotenoides y sus metabolitos derivados están implicados en numerosas acciones y funciones², de hecho, reciben un gran interés dada la multitud de evidencias que indican que son beneficiosos para la salud humana. Por ejemplo, los carotenoides en mamíferos actúan como precursores de la vitamina A, siendo esta vitamina esencial para el crecimiento y diferenciación celular, reproducción y mantenimiento de la visión y del sistema inmune, entre otros procesos³. Pero independientemente de su papel como precursores de vitamina A, se ha visto que los carotenoides intervienen disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades diversas, como distintos tipos de cáncer, trastornos oculares, enfermedades cardiovasculares, de la piel u óseas, entre otras^{4,5,6}. Estas acciones se suelen atribuir a su papel como antioxidantes, pero podrían deberse también a su actividad prooxidante, a la modulación de rutas de señalización intracelular, a la modulación de las propiedades de las membranas o incluso a su posible papel en el sistema inmune^{7,8,9}.

Tradicionalmente, los carotenoides se han usado como colorantes en alimentos y piensos animales, como por ejemplo, para reforzar el color de los peces, aumentando de esta forma la percepción de calidad por parte de los consumidores, pero actualmente, con el estudio de sus propiedades saludables, la industria alimentaria ha focalizado su atención en el uso de estos compuestos como ingredientes funcionales. También, gracias a sus propiedades beneficiosas, el uso de carotenoides ha crecido rápidamente en la industria farmacéutica y cosmética, de hecho, ha surgido un nuevo mercado, denominado “cosmecéticos”, que tiene por objetivo combinar cosméticos e ingredientes nutracéuticos para crear productos que mejoren la piel y el cabello¹⁰. Por tanto, no resulta extraño que el mercado de los carotenoides tenga un importante peso económico. Este se valoró en 553 millones de euros en 2007 y se espera que crezca hasta 1.316 millones de euros en 2019.

Estructura y propiedades

Luteína y zeaxantina, pertenecientes al grupo de las xantofilas, son los carotenoides objetos de nuestro estudio (Figura 1). Estos carotenoides, junto a la mesozeaxantina (que es en realidad un isómero óptico de la zeaxantina que no se encuentra de forma natural en los alimentos corrientes), son los únicos que se concentran en la mácula humana y su consumo se

formada por dos átomos unidos por un doble enlace con dos sustituyentes distintos podría encontrarse en dos configuraciones geométricas diferentes, que de acuerdo con la nomenclatura actual, se denominarían isómeros *cis-trans* (*Z/E*)²¹ (Figura 3). Por lo tanto, teóricamente, cada doble enlace carbono-carbono existente en la cadena de polieno existente en los carotenoides podría experimentar isomerización *Z-E*, aunque no todos los dobles enlaces son susceptibles de sufrir la isomerización *Z* debido al impedimento estérico de algunos de estos. Este es el caso de los dobles enlaces: C-7,8; C-11,12; C-7',8' y C-11', 12'; en los que el impedimento estérico entre un átomo de hidrógeno y un grupo metilo impide la isomerización *Z*²². Esto conlleva a que los (*Z*)-isómeros de luteína y zeaxantina más encontrados en los alimentos sean los (9-*Z*)- y los (13-*Z*)-isómeros, a los que se añaden los isómeros (13'-*Z*)- y (9'-*Z*)-luteína (Figura 4), formados debido a que la luteína es asimétrica.

La importancia del estudio de la isomerización radica en que hay muchos vegetales y algunas frutas que son procesadas antes de ser consumidas. De hecho, los tratamientos tales como el secado, calentamiento por microondas, enlatado o cocinado son comúnmente usados en la industria alimentaria o en nuestros hogares para aumentar el tiempo de conservación de los alimentos. No obstante, estos tratamientos tienen el hándicap de que pueden afectar a la concentración de carotenoides, pero aparte de sufrir cambios en su concentración, los isómeros más comunes en alimentos crudos, es decir, los (todo-*E*)-carotenoides pueden convertirse en sus (*Z*)-isómeros²³, de los que se han visto algunas diferencias con sus respectivos (todo-*E*)-isómeros, en términos de biodisponibilidad y estabilidad, entre otros^{24,25,26}.

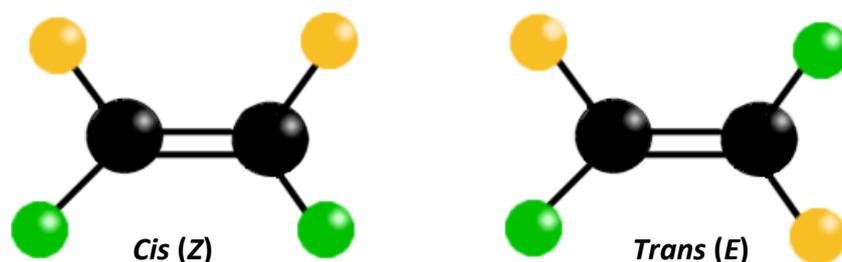


Figura 3: Ilustración esquemática de un doble enlace capaz de experimentar la isomerización *cis-trans* (*Z/E*).

Hay diversos mecanismos propuestos a través de los cuáles ocurre la isomerización de estas moléculas, entre los que destaca la ruptura homolítica o heterolítica de algún doble enlace de la molécula. No obstante, el calor, la luz, la presencia de sensibilizadores, como la clorofila y la presencia de compuestos electrofílicos, como las quinonas, se consideran los factores que afectan principalmente a la isomerización de los carotenoides en los alimentos²¹.

La isomerización de los carotenoides está relacionada con alteraciones en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Por lo general, los (*Z*)-isómeros son termodinámicamente menos estables y tienen puntos de fusión más bajos que sus homólogos en estado (todo-*E*)²⁷. De hecho, la mayoría de carotenoides en su estado natural se encuentran como (todo-*E*)-isómeros, ya que como se ha comentado son más estables, no obstante, hay algunos estudios que han indicado que algunos (*Z*)-isómeros podrían ser más estables que sus respectivos en forma (todo-*E*)²⁸.

En base a sus propiedades estructurales, los (todo-*E*)-isómeros se caracterizan por tener una estructura lineal y rígida, mientras que los (*Z*)-isómeros se caracterizan por tener una estructura abierta. En base a estas diferencias, los (todo-*E*)-isómeros tienen una tendencia mayor a agregar con respecto a los (*Z*)-isómeros. Esto, a su vez, implica diferencias en sus propiedades y acciones biológicas. Los (*Z*)-isómeros son más fáciles de solubilizar, absorber y transportar que los (todo-*E*)-isómeros¹⁶, por lo que debido a estas diferencias resulta muy interesante estudiar la formación de los posibles isómeros de los carotenoides de estudio, es decir, luteína y zeaxantina.

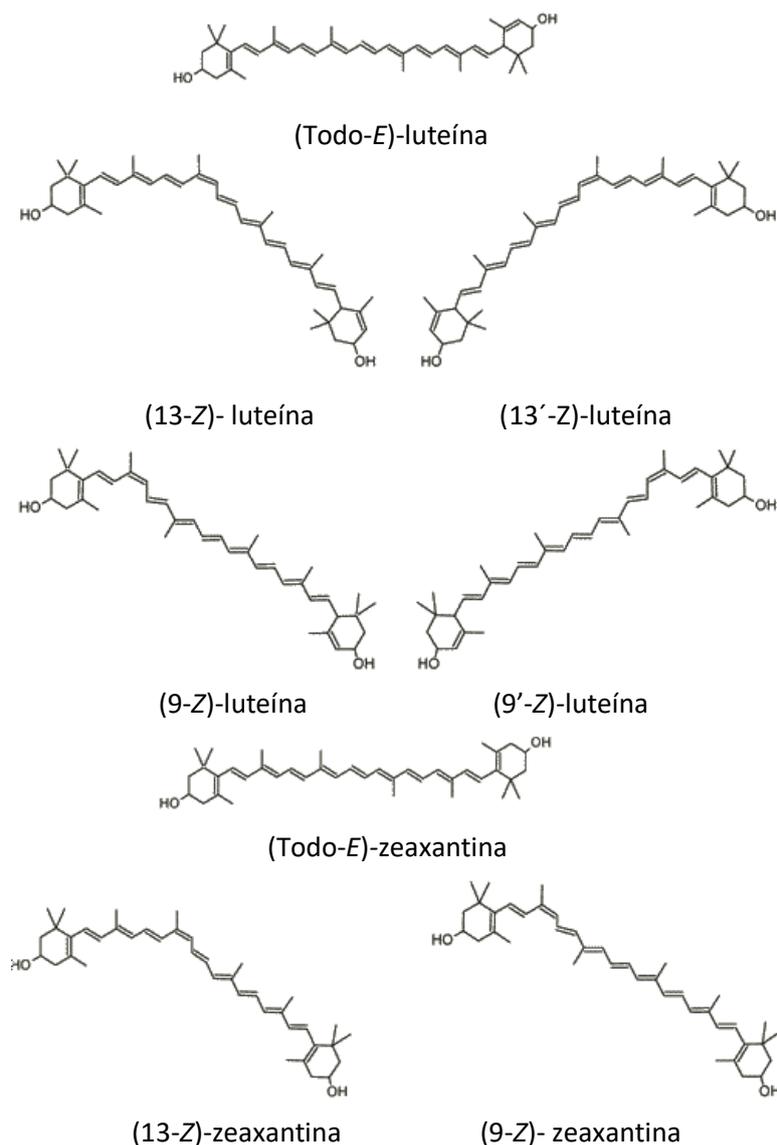


Figura 4: Estructuras químicas de los isómeros geométricos de luteína y zeaxantina. Esquema Adaptado²³.

Fuentes dietéticas

Salvo excepciones puntuales²⁹, los carotenoides no pueden ser sintetizados *de novo* por animales¹, por tanto, deben ser incorporados a través de la dieta. Se ha visto que las verduras de hojas verdes, como las espinacas, brócoli o col (Tabla 1), son las principales aportadoras de luteína en la dieta, mientras que, el maíz y sus derivados constituyen la

principal fuente de zeaxantina en la dieta (Tabla 2)³⁰. A pesar de que el maíz así como sus productos derivados constituyen las fuentes más ricas de zeaxantina, en el resto de verduras y frutas predomina el contenido en luteína. Esta abundancia de luteína sobre zeaxantina en la naturaleza se ha atribuido al papel dominante que ejerce la luteína en la fotosíntesis. Esto, a su vez, podría tener influencia en la valoración de la ingesta de xantofilas en diversas etnias. Por ejemplo, en un estudio de Bermudez et al.³¹ se ha visto que las principales fuentes de luteína y zeaxantina para las etnias hispana y blanca de los Estados Unidos fueron el maíz y los cereales, mientras que la etnia blanca obtenía mayores cantidades a partir de vegetales de hoja verde, tales como, el brócoli o la espinaca.

Tabla 1: Concentración de los carotenoides luteína y zeaxantina en frutas y verduras ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso fresco)^{30,32}

	(Todo-E)- luteína	(Todo-E)- zeaxantina	(Z)-luteína	(Z)-zeaxantina
Aceituna verde	79	0	76	0
Albaricoque desechado	0	0	0	0
Brócoli	1343	9,4	163,1	33,4
Brócoli cocinado	772	0	0	0
Cilantro	7703	0	0	0
Col rizada	88824	0	-	0
Espinacas	8447	130,8	704	394,2
Kiwi	171	0	-	0
Lechuga iceberg	171	12	0	0
Lechuga romana	3824	0	0	0
Mango	6	0	0	0
Melocotón	11	3	0	0
Naranja	350	250	-	-
Sandía	4	0	0	0
Uvas rojas	24	4	0	0
Uvas verdes	53	6	0	0

Por otro lado, se han encontrado fuentes de alto contenido en luteína y zeaxantina en frutas y hortalizas procedentes de Panamá. Curiosamente, es en el grupo de las frutas silvestres donde se encontraron las fuentes más importantes para ambos compuestos, como es el caso de la fruta de la sastra (*Garcinia intermedia*), aunque hay que tener en cuenta que la composición en carotenoides se ve modificada debido a factores como la variedad del cultivo, estado de la madurez y el clima, entre otros³³. La sastra tiene elevados niveles tanto de zeaxantina como de luteína (84.7 and 36.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ de materia fresca, respectivamente). En Panamá, este fruto crece en las orillas de los ríos y no es cultivada ni comercializada, a pesar de que es un fruto muy apreciado por los agricultores y los aborígenes. Estos datos podrían suponer una oportunidad para realizar un estudio sobre la viabilidad de domesticación de esta

planta, así como otro de aceptabilidad de los consumidores para evaluar su posible salida al mercado. A este respecto, resulta interesante que la sastrá crezca de forma óptima en las regiones tropicales de América, de hecho, es un cultivo que se encuentra extendido desde México hasta Ecuador³⁴.

Tabla 2: Concentración de los carotenoides luteína y zeaxantina en maíz y productos derivados del maíz ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso fresco)^{30,32}

	(<i>Todo-E</i>)- luteína	(<i>Todo-E</i>)- zeaxantina	(<i>Z</i>)-luteína	(<i>Z</i>)-zeaxantina
Cheetos	66	73	48	12
Corn Flakes	40	49	15	12
Crispix	25	21	2	3
Fritos	17	33	11	5
Maíz cocinado	202	202	37	25
Maíz enlatado	163,8	310	34,2	22,7
Palomitas	64	141	59	83
Tortita de Maíz	276	255	26	45

A diferencia de los dos compuestos anteriores, la mesozeaxantina que se encuentra en la mácula se forma mayormente a partir de la luteína³⁵, de hecho, su aporte a través de la dieta es muy escaso, ya que las rutas biosintéticas en plantas superiores tienen una escasa especificidad para la síntesis mesozeaxantina. Solamente hay unos pocos alimentos, tales como el caparazón del camarón, piel de pescado y grasa de tortuga, en los que se han podido detectar los tres carotenoides presentes en la mácula³⁶.

Se ha estimado que la ingesta diaria de los occidentales en luteína ronda entre 1-3,6 mg/día procedente principalmente de vegetales de hoja verde y frutas, mientras que, la ingesta media de zeaxantina es mucho menor, concretamente de 0,1 mg/día, aportada principalmente por huevos, maíz y pimentón³⁷.

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se define como la integración de los diversos procesos mediante los cuales una fracción de un nutriente u otro componente alimentario ingerido está disponible para la digestión, absorción, transporte, utilización y eliminación. De forma general, la biodisponibilidad de los carotenoides depende de su bioaccesibilidad, es decir, de la fracción de estos que es liberada desde una matriz alimentaria al tracto gastrointestinal, de forma que se convierten en disponibles para su absorción³⁸. La absorción de los carotenoides implica varios pasos y comienza con la rotura mecánica y enzimática de la matriz alimentaria. Tras esto, se produce su liberación, que continúa con la incorporación de estos a las micelas mixtas producidas gracias a las sales biliares, fosfolípidos, lípidos procedentes de la dieta y los productos de hidrólisis. Tras la solubilización en las micelas mixtas, los carotenoides son absorbidos por los enterocitos, se empaquetan en quilomicrones y son secretados al sistema linfático (Figura 5)³⁸.

Cada paso descrito puede estar influenciado por múltiples factores. De hecho, hay una regla nemotécnica, conocida como “SLAMENGI”, que trata de describir estos factores: “*Species of carotenoids, Linkages at molecular level, Amount of carotenoid, Matrix, Effectors, Nutrient status, Genetics, Hostrelated factors and Interactions among these variables*”. Esto implica que es difícil evaluar el efecto de cada factor en la biodisponibilidad de los carotenoides³⁹. Por ejemplo, el tipo de carotenoide influye en su biodisponibilidad, ya que los que están formados únicamente por un esqueleto hidrocarbonado tienen una biodisponibilidad relativa más baja que los que tienen oxígeno en su estructura, como son los casos de luteína y zeaxantina, ya que estos últimos al tener una polaridad más alta pueden ser incorporados más fácilmente en las micelas lipídicas formadas en el tracto gastrointestinal⁴⁰.

Por otro lado, la matriz alimentaria también es un importante factor a tener en cuenta, ya que la liberación de los carotenoides es el primer paso que debe ocurrir para que se produzca la absorción. Tal y como hemos visto, los alimentos, como las espinacas, el maíz, la col rizada, etc. contienen altas cantidades de luteína y otros carotenoides, considerándose estos alimentos como fuentes importantes de estos compuestos. Sin embargo, la compleja estructura celular de estas plantas impide una buena liberación de los mismos, ya que estos se encuentran fuertemente ligados en los cloroplastos⁴¹. Por tanto, la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos debe mejorarse con el fin de aumentar la concentración de estos carotenoides en suero. Esto se puede conseguir optimizando el modo de preparación de los alimentos, por ejemplo, cortando, macerando o cocinando el tejido de la planta en cuestión⁴².

También son numerosos los estudios existentes que apoyan la necesidad de consumir cierta cantidad de grasas para mejorar la absorción de estos compuestos^{43,44}. Además, se ha visto que los aceites incrementan la absorción de luteína y zeaxantina. No obstante, dependiendo de la grasa mayoritaria en estos varía su absorción, ya que se ha observado que los aceites ricos en ácidos grasos saturados, como es el aceite de palma, mejoran su biodisponibilidad en comparación con otros aceites ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, como es el aceite de oliva o el aceite de pescado⁴⁵.

También es importante tener en cuenta la yema del huevo como fuente de luteína y zeaxantina, ya que a pesar de tener concentraciones menores de ambos que algunas verduras de hoja verde, tales como la espinaca o la col rizada, su alto contenido en lípidos facilita la digestión gastrointestinal y su absorción, mejorando, de esta forma, la biodisponibilidad de los carotenoides⁴⁶. Como consecuencia, se ha encontrado una mayor concentración de estos compuestos en suero tras la suplementación con yema de huevo en comparación con extractos de espinacas y col rizada⁴⁷. Al contrario que las grasas, se ha visto que las fibras pueden reducir la biodisponibilidad de luteína y zeaxantina⁴⁸, por la interacción de estas con los ácidos biliares que resulta en un aumento de la excreción fecal de grasas y sustancias solubles en las grasas, como son los carotenoides.

Las interacciones entre carotenoides es otro factor a tener en cuenta. Las interacciones más estudiadas han sido las producidas entre el β -caroteno y las xantofilas, como es el caso de la luteína. Kostic et al.⁴⁹ estudiaron la respuesta del suero bajo dosis equivalentes de β -caroteno y luteína y se observó que cuando se combinaban ambos, el β -

caroteno reducía significativamente la concentración de luteína en suero, sugiriendo la interacción entre ambos carotenoides. Por tanto, estudios como el anterior demuestran que estas moléculas pueden interactuar entre sí en algún momento de su absorción, metabolismo o transporte. Habría diversas formas de interacción, por ejemplo, en la mucosa intestinal, estos compuestos podrían inhibir o aumentar la actividad de las enzimas que catalizan la ruptura de los carotenoides, o bien, en la circulación, podría variar la concentración de carotenoides en función de la mayor o menor afinidad con las lipoproteínas⁵⁰.

Con respecto a los cambios fisiológicos que ocurren con la edad, la biodisponibilidad de nutrientes cambia con ella. Un gran porcentaje de la población de tercera edad desarrolla una patología, denominada, gastritis atrófica que resulta en una reducción de la acidez estomacal. La gastritis atrófica afecta a la biodisponibilidad de carotenoides, ya que la absorción es pH dependiente⁵¹, de forma que el pH del lumen intestinal afecta a las cargas de la superficie de las micelas y a las cargas de las membranas de los enterocitos. Cuanto más ácido sea el ambiente, menor será la resistencia a la difusión de las partículas, y como consecuencia, ante esta patología disminuiría la absorción de luteína y zeaxantina⁵².

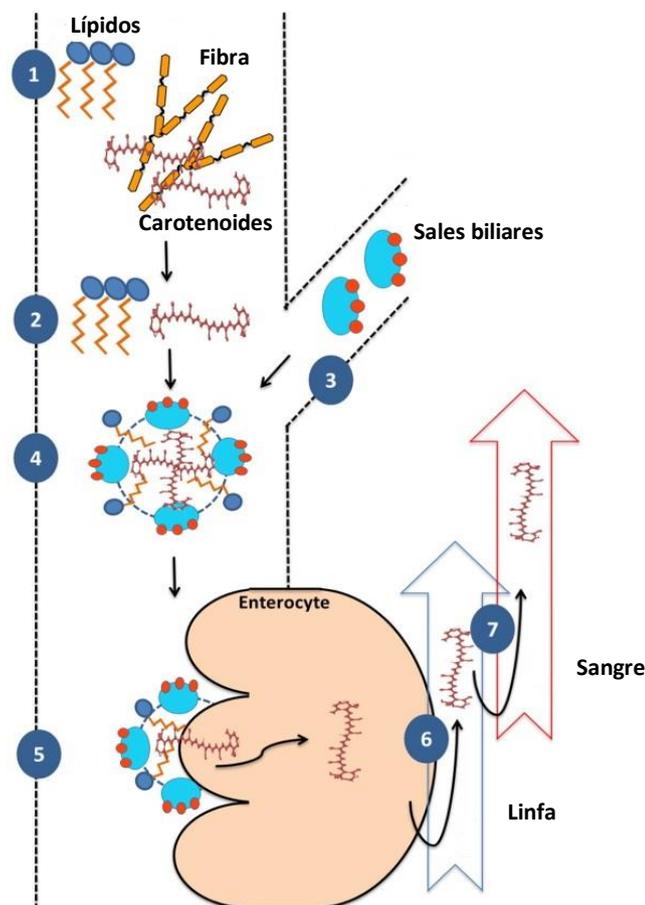


Figura 5: Proceso de absorción de carotenoides contenidos en una matriz alimentaria: 1,2) liberación de su matriz alimentaria, 3) liberación de las sales biliares a través del conducto biliar, 4) unión de los carotenoides liberados a las gotas lipídicas y formación de micelas, 5) absorción por la célula intestinal y 6) liberación de la molécula de carotenoide a la circulación sanguínea³⁸.

Papel como antioxidante y filtro de luz azul

Se piensa que los carotenoides actúan como antioxidantes en las células, es decir, como una molécula que protege contra el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS)⁵³. Los ROS pueden reaccionar con el ADN, proteínas o lípidos, afectando de esta forma a la función fisiológica normal de la célula. Por lo general, se piensa que estos compuestos reaccionan con los ROS a través de tres mecanismos: eliminación física, aceptación o donación de electrones⁵⁴ o a través de la aceptación o eliminación de hidrógeno¹⁷. Con respecto a los ROS a eliminar, se ha visto que los carotenoides son buenos eliminadores de radicales peróxilos, pero sobre todo de oxígeno en estado singlete⁵⁵.

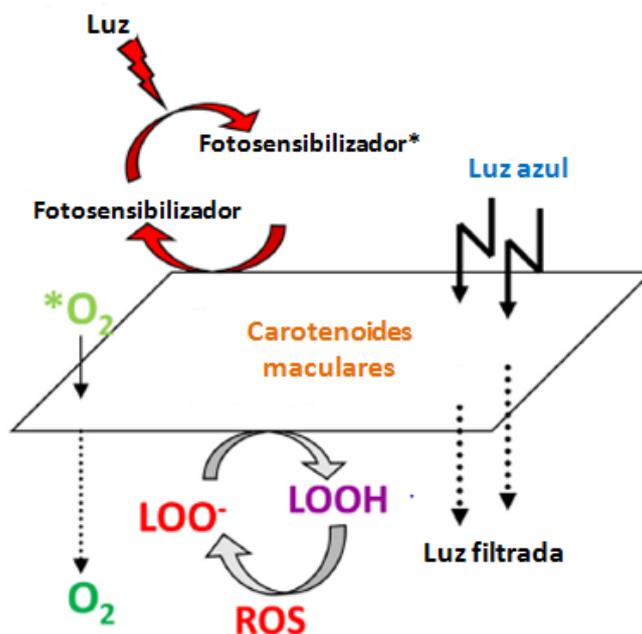


Figura 6: Efecto protector de los carotenoides maculares. En el diagrama se esquematiza su efecto antioxidante y su efecto como filtro de luz azul de los carotenoides maculares. Abreviaturas: especies reactiva de oxígeno (ROS); *O₂ (oxígeno en estado singlete); LOO· (radicales peróxidos lipídicos); LOOH (peróxidos lipídicos). Esquema Adaptado⁵⁶.

La eliminación del oxígeno en estado singlete depende mayormente de su eliminación física, que implica la transferencia de energía directa entre dos moléculas⁵⁷. Esto sucede, de forma que, la energía del oxígeno en estado singlete se transfiere a la molécula de carotenoide, con el fin de producir oxígeno en estado fundamental, quedándose el carotenoide en estado excitado, cuya energía es disipada al medio en forma de calor⁵⁵. La eficacia de estos compuestos para eliminar el oxígeno en estado singlete está relacionada con el número de dobles enlaces conjugados presentes en la molécula, ya que a un mayor número, el nivel de energía del carotenoide excitado será más bajo⁵⁸. Concretamente, la luteína y zeaxantina se consideran muy eficientes en la eliminación del oxígeno en estado singlete por su buena capacidad de absorber la energía y transmitirla al medio en forma de calor⁵⁹.

También, los carotenoides reaccionan eficazmente con los radicales peróxilos, que se generan en la peroxidación lipídica, que es un proceso mediado por los ROS y que provoca cambios indeseables en los lípidos. En este proceso, se generan gran cantidad de radicales

peróxidos que pueden reaccionar con otros ácidos grasos, por ello, los carotenoides al secuestrar los radicales, interrumpen eficazmente las reacciones que generan daño severo en los compartimentos lipídicos. Por tanto, debido a su lipofilia y a su propiedad específica para eliminar estos radicales, estas moléculas desempeñan un papel importante en la protección de las membranas celulares contra el daño oxidativo⁶⁰.

Por último, en los sistemas biológicos, la exposición a la luz conduce a la formación de ROS, por ello, la formación de ROS en la retina o la piel es alta, especialmente, en los segmentos más externos de la retina, dada la gran concentración de ácidos grasos poliinsaturados⁶¹. Por tanto, resulta de gran importancia la presencia de luteína y zeaxantina en estas zonas por su carácter protector basado en su papel como antioxidantes y a su actuación como filtros de luz azul (400-500 nm; ondas de elevada energía), que constituyen las ondas más efectivas de la luz visible para producir ROS.

Luteína, zeaxantina y salud

La luteína y la zeaxantina representan el 20-30% de los carotenoides totales del suero humano, pero este porcentaje aumenta hasta el 80-90% en la retina humana. En cambio, la mesozeaxantina, que es un derivado metabólico de la luteína, sólo ha sido hallada en la retina, no siendo detectada en ningún otro lugar del cuerpo⁶². Dentro de la retina, estos carotenoides se concentran con una mayor densidad en una región denominada mácula, que media la visión aguda central y del color. De hecho, esta región presenta un color amarillento que se debe, precisamente, a la presencia de estos tres compuestos⁶³. La mácula contiene una elevada densidad de fotorreceptores, de esta forma, la importancia de los carotenoides en esta región radica en proteger a estas células de los radicales libres, producido por la gran tensión de oxígeno y por la enorme exposición a la luz existente en esta zona de la retina. Este carácter protector se debe principalmente a la actuación de estas moléculas como antioxidantes y filtro de luz azul¹². Por tanto, no resulta extraño que estudios epidemiológicos hayan demostrado una relación inversa entre el consumo de dietas ricas en luteína y zeaxantina, y la incidencia de una enfermedad que afecta selectivamente a la mácula, denominada degeneración macular asociada a la edad (AMD), que se considera la mayor causa de ceguera en personas mayores de 65 años en países occidentales⁶⁴. Otro ejemplo de investigación llevada a cabo a cerca de tema, es el estudio conocido como AREDS1 (Age-Related Eye Disease Study 1), que mostró que grandes dosis de vitamina C (500 mg), vitamina E (400 UI), β -caroteno (15 mg), Zinc (80 mg) y Cobre (2 mg) eran protectores contra el desarrollo de AMD, reduciendo así, el riesgo de padecer AMD en un 25%⁶⁵. Pero a parte de esta enfermedad, los carotenoides de la mácula se han relacionado con una reducción en la severidad de enfermedades tales como, las retinopatías prematuras y asociadas a la diabetes¹⁵ y una reducción del riesgo de sufrir cataratas⁶⁶.

También la piel, junto a los ojos, está permanentemente en contacto con la luz procedente del sol. Se ha estudiado que las ondas visibles de la luz recibida son capaces de producir radicales libres en la piel y concretamente, la denominada luz azul, constituye las ondas de la luz visible más efectivas para producir estos radicales libres. Por tanto, resulta de gran interés que la luteína junto a la zeaxantina, también se encuentren en la piel. De hecho, se ha demostrado que la suplementación dietética de luteína y zeaxantina disminuye los efectos de la radiación ultravioleta en ratones sin pelo, disminuyendo, de esta forma, la

respuesta inflamatoria y la respuesta hiperproliferativa de la piel ante el daño producido por la radiación ultravioleta. También hay otros estudios que han indicado el papel protector de la luteína y zeaxantina en piel humana. El primero de ellos se publicó en 2002 y consistió en la toma diaria vía oral de un complejo que contenía 6 mg de luteína y 0,18 mg de zeaxantina durante 8 semanas. A las dos semanas, se observó una disminución de la peroxidación lipídica de piel, que continuó decreciendo hasta el término del periodo de estudio⁶⁷. En consonancia, otro estudio, ha mostrado que una alta ingesta dietética diaria de luteína y zeaxantina puede reducir la incidencia de carcinoma de piel⁶⁸. A parte de estos beneficios, se ha demostrado que la administración tópica y oral, a la vez o por separado, de luteína y zeaxantina mejora los lípidos superficiales de la piel, disminuye su peroxidación lipídica, mejora su hidratación y su elasticidad, proporcionando así una mejora estética de la piel⁶⁹.

Por otro lado, gracias a su poder antioxidante y antiinflamatorio podrían promover la salud cardiovascular, reduciendo de este modo el riesgo de sufrir enfermedades coronarias arteriales. De hecho, estudios han mostrado una relación inversa entre la luteína plasmática y el LDL oxidado, sugiriendo efectos antioxidantes y antiinflamatorios de la luteína sobre el tejido aórtico, influyendo de esta forma en la disminución del riesgo en el desarrollo de arterioesclerosis. También, se ha relacionado un aumento de zeaxantina en plasma con una disminución del riesgo de arterioesclerosis⁷⁰. Del mismo modo, se ha visto en un estudio epidemiológico realizado con 4.412 individuos durante 20 años, que la luteína y la zeaxantina disminuye el riesgo de sufrir hipertensión⁷¹. Por último, en personas fumadoras, se ha observado una relación inversa entre la concentración de luteína y zeaxantina en suero y el riesgo de sufrir infarto de miocardio, sugiriendo un efecto protector de estos carotenoides⁷².

Por último, hay que destacar que la luteína y zeaxantina son los carotenoides mayoritarios en el cerebro humano, de hecho, constituyen entre 66-77% de los carotenoides totales del cerebro⁷³. Se sabe que estos compuestos tienen efecto neuroprotector⁷⁴, de hecho, hay un estudio que ha relacionado el nivel de luteína y zeaxantina con la función cognitiva cerebral de personas mayores. Para ello, se seleccionaron 118 ancianos entre 76-85 años y se midieron sus niveles de luteína y zeaxantina en suero, la densidad de luteína y zeaxantina en el tejido neural-retinal y se realizaron varias medidas de su función cognitiva. Los resultados mostraron que la densidad de luteína y zeaxantina del tejido neural-retinal se correlacionaba con una mejor velocidad de procesamiento, precisión y capacidad de ejecución⁷⁵. Por tanto, estos resultados indicaron que el aumento de las concentraciones de luteína y zeaxantina en el tejido cerebral podrían ser importantes en la función cognitiva de personas mayores. Recientemente se ha visto que la concentración de carotenoides maculares está directamente relacionada con la concentración de luteína y zeaxantina en la corteza occipital del cerebro. Esta investigación abre el camino para que la concentración de carotenoides maculares pueda ser usada como un biomarcador de la función cognitiva, ya que la densidad de los carotenoides maculares puede medirse de un modo no invasivo⁷⁶.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la formación de isómeros de los carotenoides maculares, concretamente, luteína y zeaxantina, ya que como se ha comentado, los (Z)-isómeros difieren en términos de biodisponibilidad y estabilidad con sus (todo-E)-isómeros, por lo que ligado a la importancia de los carotenoides en la dieta humana, el estudio de su isomerización resulta interesante desde el punto de vista tecnológico y nutricional. Para ello, se han fijado una serie de objetivos específicos que tienen el fin de alcanzar el objetivo principal.

- Desarrollo de una metodología para la extracción y purificación de luteína y zeaxantina procedentes de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y bayas de Goji (*Lycium Chinense*), respectivamente.
- Estudio de la formación de isómeros de luteína y zeaxantina bajo los efectos del calor y de isómeros de zeaxantina bajo efectos del yodo y de la luz, y no de luteína porque recientemente ya ha sido estudiada⁷⁷.
- Comparar la estabilidad de luteína y zeaxantina bajo efectos del calor, y con ello, comparar la susceptibilidad a la formación de isómeros.
- Identificar los isómeros formados en la isomerización térmica y en la isomerización catalizada por yodo.

Material y métodos

Reactivos

La acetona, diclorometano y hexano utilizados para las extracciones, fueron de pureza analítica y adquiridos a la casa comercial Carlo-Erba (Milán, Italia), así mismo, el éter de petróleo y éter dietílico utilizados para las cromatografía en columna abierta provenían de la misma casa comercial. Por otra parte, la alúmina (Al_2O_3) y el óxido de magnesio (MgO) utilizados como fase estacionaria de las cromatografías en columna abierta provenían de Merck (Darmstadt, Alemania). El acetato de etilo, metanol y metil-terc-butil-éter(MTBE) de pureza HPLC provenían de Merck (Darmstadt, Alemania) y por último, el tolueno utilizado como disolvente para los estudios de isomerización provenía de la casa comercial Carlo-Erba (Milán, Italia).

Muestras

Para la obtención de luteína, se utilizó la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*). Estas fueron adquiridas en México por miembros del laboratorio de Color y Calidad, y a su llegada fueron liofilizadas durante 48 horas y almacenadas bajo atmósfera de nitrógeno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Respecto a la obtención de zeaxantina, se utilizaron bayas de Goji (*Lycium Chinense*), que fueron compradas en el mercado local, marca comercial Int-Salim (Barcelona, España). Según el fabricante, las bayas estaban desecadas al sol y fueron almacenadas en un recipiente hermético hasta su utilización.

Extracción de carotenoides

La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) constituye una de las fuentes más ricas de luteína en la naturaleza, de hecho, se calcula que el 0,1-0,2% en materia seca de estas flores corresponden a carotenoides, de los que el 80% corresponde a diésteres de luteína⁷⁸. Por ello,

para la extracción de luteína se partió de un extracto liofilizado de flores de *T. erecta*. A este liofilizado se le agregaron 10 ml de la mezcla hexano-acetona pura y se procedió a realizar la extracción en agitación con ayuda del vórtex. Este paso se repitió hasta que el solvente de extracción fue incoloro. El volumen recuperado se concentró evaporando el solvente a sequedad utilizando un concentrador (Concentrator plus, Eppendorf Research®, Madrid, Spain) y finalmente, el extracto fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

Las bayas de Goji (*Lycium Chinense*) se seleccionaron para la extracción de zeaxantina porque son una importante fuente natural de este carotenoide, de hecho, entre el 31-56% de los carotenoides totales corresponden a este⁷⁹. Se partió de 0,5 g de bayas de Goji desecadas, que se introdujeron en 15 ml de agua durante 10 min. Tras esto, se centrifugaron a 13000xg durante 5 min a 4 °C, y posteriormente, el agua fue eliminada y con ella diversos azúcares hidrosolubles. Consecutivamente, se agregó 10 ml de la mezcla hexano-acetona pura y se procedió a realizar la extracción con mortero y al igual que en el caso anterior, se fue agregando la mezcla hasta que no se obtuvo color en el solvente de extracción. El volumen recuperado se filtró con una membrana de 1 µm de poro y fue llevado a sequedad utilizando un concentrador (Concentrator plus, Eppendorf Research®, Madrid, Spain) y finalmente, el extracto fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

Saponificación

Como la luteína y zeaxantina se encuentran, en su mayoría, esterificadas con moléculas de ácidos grasos en estas fuentes naturales, se procedió a realizar una saponificación de los extractos obtenidos. Para ello, se saponificaron con una solución saturada de KOH-metanólico al 30% y diclorometano (1:1 v/v), en condiciones de oscuridad con agitación constante durante 24 horas. Después del tiempo establecido, se realizaron lavados con NaCl al 5% y posteriormente con agua, hasta la eliminación total del KOH. Tras el lavado, el extracto fue evaporado a sequedad utilizando el concentrador (Concentrator plus, Eppendorf Research®, Madrid, Spain) y almacenado a -20 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

Purificación

Se realizó cromatografía en columna abierta para llevar a cabo la purificación de luteína y zeaxantina a partir de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y bayas de Goji (*Lycium Chinense*), respectivamente. Actualmente, este término se usa para distinguir este método, que utiliza la fuerza descendente de la gravedad, de otros métodos en los que las columnas se utilizan bajo presión, como es el caso de la cromatografía líquida de alta presión, ampliamente conocida como HPLC.

La fase estacionaria elegida para la purificación de la luteína fue MgO-Hyflo Super Cel (proporción 1-1/p). La fase estacionaria fue sometida a un proceso de deshidratación en estufa durante 4 horas a una temperatura de 110 °C con el fin de aumentar su capacidad de adsorción. Una vez preparada la fase estacionaria con éter de petróleo, el extracto saponificado de flor de cempasúchil fue resuspendido en éter de petróleo. Tras ello, la luteína fue eluída con solventes en un orden creciente de polaridad: éter de petróleo; 8 y 12% de éter dietílico en éter de petróleo; y 15, 20 y 30% de acetona en éter de petróleo.

La fase estacionaria elegida para la purificación de la zeaxantina fue alúmina (Al₂O₃) con grado Brockmann III. Para transformar la alúmina grado Brockmann I existente en el

laboratorio, se adicionó un volumen correspondiente al 6% de su peso en agua. Tras su mezcla en agitación, se procedió a la preparación de la columna cromatográfica con éter de petróleo. El extracto saponificado de bayas de Goji se disolvió en éter de petróleo-éter dietílico (proporción 1-1/v), y se procedió a su elución con: éter de petróleo; 10, 20, 30, 40 y 80% de éter dietílico en éter de petróleo; éter dietílico; 50 y 75% de acetona en éter de petróleo; y acetona.

Ambas fracciones recogidas fueron concentradas (Concentrator plus, Eppendorf Research®, Madrid, Spain) y almacenadas a -20 °C bajo atmósfera de nitrógeno, y posteriormente, se determinó su pureza por HPLC.

Pos-Purificación

Las fracciones que no eran puras se volvieron a purificar utilizando cromatografía en columna abierta con las mismas fases estacionarias descritas en el apartado anterior, aunque se llevó a cabo una modificación de las fases móviles a utilizar. En el caso de la luteína, las fases móviles fueron: éter de petróleo; 8 y 12% de éter dietílico en éter de petróleo; y 15, 20 y 30% de acetona en éter de petróleo. Por otro lado, para la zeaxantina, las fases móviles fueron: éter de petróleo; 10, 15, 20, 30 y 40% de éter dietílico en éter de petróleo; y 25, 40, 50, 60 y 75% de acetona en éter de petróleo. Las fracciones purificadas fueron analizadas por HPLC siguiendo la metodología anteriormente descrita.

Isomerización

La isomerización mediante tratamiento térmico se llevó a cabo partiendo de una solución de 0,05 mg/ml de luteína y zeaxantina en tolueno. Estas soluciones fueron calentadas en un termobloque a 75°C. Se fueron tomando alícuotas a tiempos 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 500 y 600 minutos, fueron concentradas, re-disueltas en acetato de etilo y analizadas por HPLC.

La isomerización mediante iluminación fue llevada a cabo agregando una alícuota de 10 µl de una solución de 1 mg/ml de yodo en tolueno a la solución de 0,05 mg/ml de zeaxantina en tolueno en tubos de cristal transparentes. Estos fueron sometidos a una fuente de iluminación artificial (fuente de luz blanca) a una distancia de 50 cm. Se fueron tomando alícuotas a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120, 180 y 240 minutos. Al igual que en el caso anterior, estas fueron concentradas, re-disueltas en acetato de etilo y analizadas.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para el análisis por HPLC de los carotenoides, estos se resuspendieron en acetato de etilo y fueron inyectados en un sistema Agilent 1100, equipado con un detector de diodos y un módulo de control de temperatura (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Se utilizó una columna YMC C₃₀ (3 µm, 250 x 4.6 mm) (YMC, Wilmington, NC, USA), como fase estacionaria y a su vez, una precolumna de YMC 30 (3 µm, 40 x 4 mm) (YMC, Wilmington, NC, USA). El volumen de inyección fue de 1 µl, en el caso del análisis de las purificaciones, y de 3 µl en el análisis de los isómeros. La velocidad de flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente y las longitudes de onda seleccionadas para la detección de los carotenoides y otros posibles compuestos fueron 285, 450 y 486 nm.

Por otra parte, la fase móvil consistió en metanol (MeOH), metil-t-butil éter (TBME) y agua MiliQ. El gradiente de elución fue el descrito por Mouly et al.⁸⁰ y Meléndez-Martínez et al.⁸¹; 0 min: 90% MeOH + 5% MTBE + 5% agua; 5 min: 95% MeOH + 5% MTBE ; 10 min: 89% MeOH + 11% MTBE; 16 min: 75% MeOH + 25% MTBE; 2 min: 40% MeOH + 60% MTBE; 22.5 min: 15% MeOH + 85% MTBE; 25 min: 90% MeOH + 5% MTBE + 5% agua.

Los carotenoides detectados fueron identificados por comparación de sus características espectroscópicas y cromatográficas (espectro de absorción y tiempo de retención) de acuerdo a lo reportado en la bibliografía⁸².

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron con la media y la desviación estándar de dos determinaciones independientes.

Resultados y Discusión

Extracción y saponificación

Generalmente, un protocolo de extracción debe ser rápido y simple, respetando de esta forma las propiedades físicas y químicas del producto sobre el que se realiza la extracción, ya que los carotenoides son inestables ante la luz, las altas temperaturas, oxígeno, exposición a metales y presencia de solventes, como agua, acetona y diclorometano⁸³. En el caso de la flor de cempasúchil, se han descrito varios tipos de disolventes para realizar la extracción, entre los que se incluyen disolventes tales como el metanol⁸⁴, etanol, etil acetato o hexano⁸⁵; por otro lado, para las bayas de Goji se ha utilizado la mezcla hexano/etanol/acetona/tolueno en una proporción 10:6:7:7, v/v/v/v⁸⁶ o bien hexano/acetona (1:1/v)⁸⁷. En nuestro caso, tanto para la flor de cempasúchil y las bayas de Goji se eligió la mezcla hexano/acetona. Se seleccionó como disolvente el hexano porque la mayor parte de los constituyentes del extracto fueron más solubles en solventes orgánicos no polares y al mismo tiempo, se eligió la acetona porque tiene la capacidad de penetrar muy fácilmente la matriz sólida y disolver así tanto carotenos como xantofilas que se encuentren en ella.

Hay que tener en cuenta de que la luteína y la zeaxantina en tejidos vegetales se encuentran en los cloroplastos o cromoplastos, de forma, que estos deben ser rotos para obtener una buena extracción. Por ello, hay diversas formas de mezclar la muestra con el solvente, entre las que destaca el uso del ultra-Turax, maceración, ultrasonidos, la simple agitación de la muestra o el uso de un homogenizadores, entre otras⁸⁸. En el trabajo, se eligió la maceración para las bayas de Goji, ya que se trataba de un fruto desecado al sol y la agitación simple para las flores de cempasúchil, ya que se encontraban liofilizadas.

Por otro lado, se realizó una saponificación de los extractos obtenidos. Durante esta reacción, aparte de hidrolizar los ésteres de carotenoides, también se eliminan clorofilas, productos de degradación derivados de la extracción, lípidos no deseados y otras sustancias⁸⁸, por lo que es una buena técnica para eliminar posibles interferencias que puedan incidir en la purificación. El único inconveniente de esta técnica es que se produce una destrucción de los carotenoides, suponiendo esto una merma en la concentración total de estos, aunque para el

caso de este trabajo no debe considerarse este problema, ya que no se trata de realizar una cuantificación de estos.

Purificación

Los resultados obtenidos de la purificación referente a los extractos saponificados de flor de cempasúchil y de bayas de Goji se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente. El extracto de cempasúchil eluyó en una única fracción prácticamente puro de luteína y sus respectivos isómeros (Figura 7), a excepción, de un pequeño pico de fitoflueno que se detectó a 285 nm. Con respecto al extracto de bayas de goji, este eluyó en una sola fracción en su mayor parte como zeaxantina, aunque también eluyó con esta luteína y tocoferol, aunque en una cantidad menor con respecto a la zeaxantina (Figura 8).

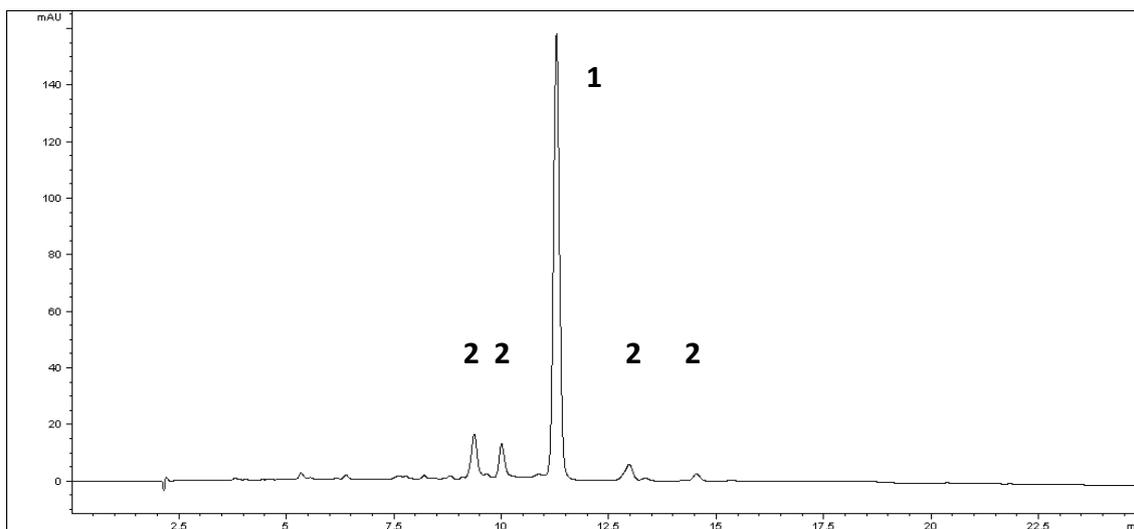


Figura 7: Perfil cromatográfico obtenido a 450 nm procedente de la purificación del extracto saponificado de flores de cempasúchil, cuyos picos corresponden a 1= luteína y 2= (Z)-isómeros de la luteína.

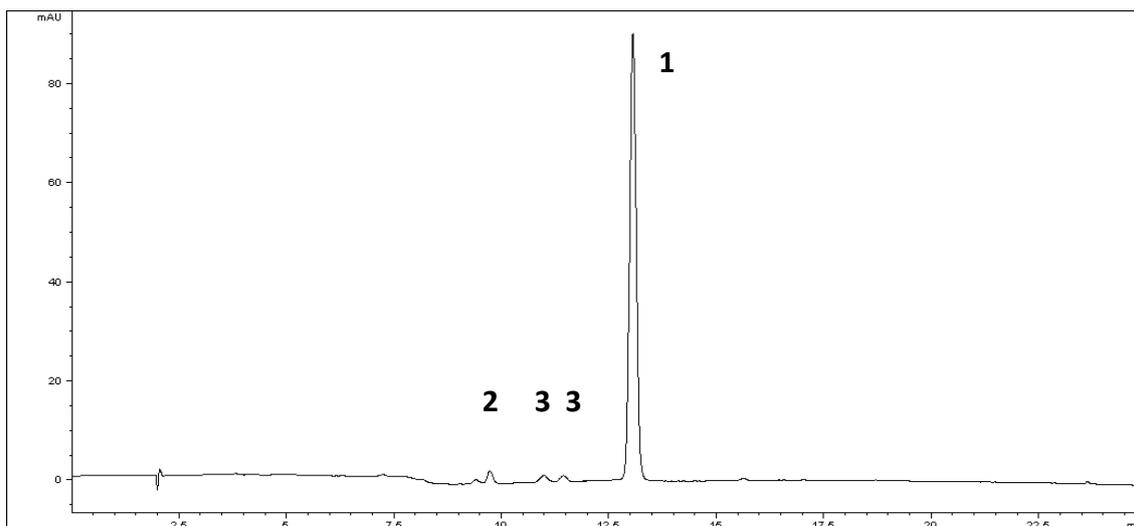


Figura 8: Perfil cromatográfico obtenido a 450 nm procedente de la purificación del extracto saponificado de bayas de Goji, cuyos picos corresponden a 1= zeaxantina, 2= luteína, 3= (Z)-isómeros de la zeaxantina.

Con respecto a estos datos, se concluye que los extractos no eluyeron puros de luteína ni de zeaxantina, por tanto, se realizó un segundo paso de purificación con el fin de eliminar las impurezas de las eluciones obtenidas, siguiendo el protocolo indicado en el apartado de Post-Purificación de Materiales y métodos. Tras realizar la misma, se obtuvo una única elución pura que contenía luteína y una reducción de sus respectivos isómeros (Figura 9), y del mismo modo, otra de zeaxantina (Figura 10), alcanzando, de esta forma, uno de los objetivos específicos planteados.

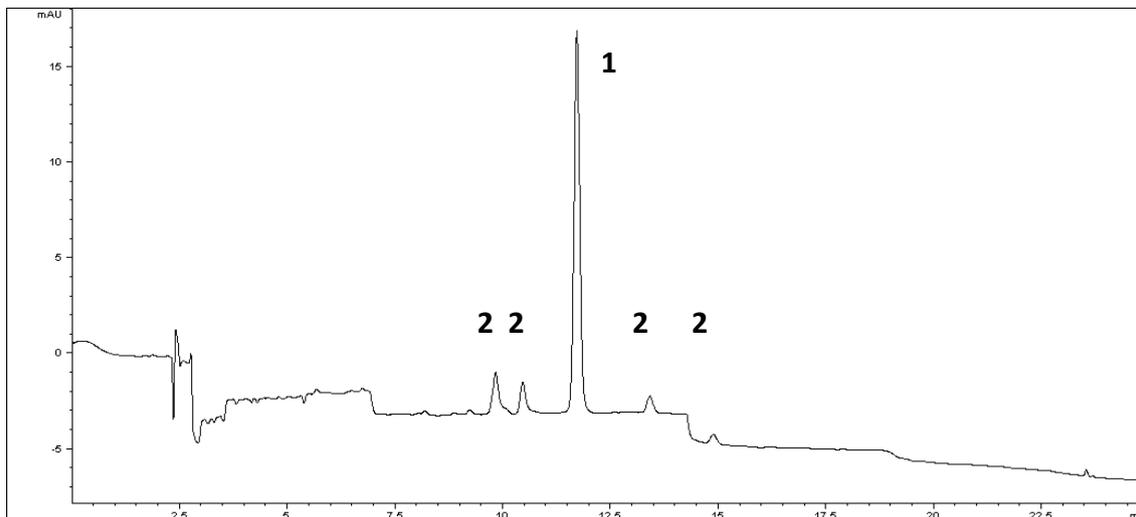


Figura 9: Perfil cromatográfico obtenido a 450 nm procedente de la pospurificación del extracto saponificado de flores de cémpasuchil, cuyos picos corresponden a 1= luteína y 2 a diferentes (Z)-isómeros de la luteína.

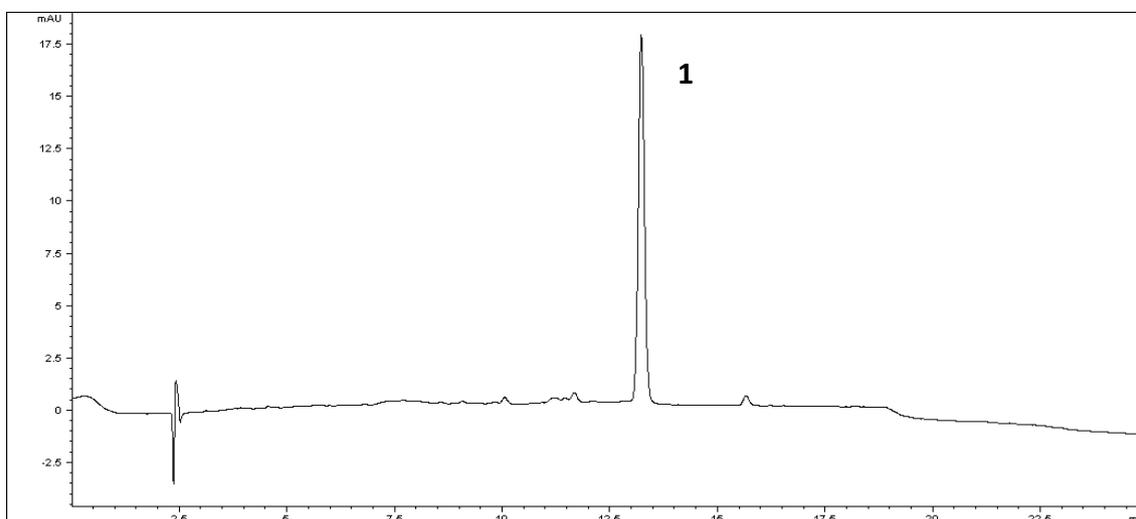


Figura 10: Perfil cromatográfico obtenido a 450 nm procedente de la pospurificación del extracto saponificado de bayas de Goji, cuyo pico corresponden a 1= zeaxantina.

Isomerización

La isomerización de los carotenoides está favorecida por factores tales como el calor o la luz. Por ello, resulta de gran interés que las reacciones de isomerización de estos compuestos puedan ser cinética o termodinámicamente controladas. Una reacción de

isomerización cinéticamente controlada puede lograrse al aplicar calor y en el caso de las termodinámicamente controladas utilizando yodo, como catalizador. En este estudio, se ha llevado a cabo ambos tipos de reacciones, tanto con calor como con yodo, para estudiar la formación de isómeros de luteína y zeaxantina.

Tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, las muestras de carotenoides fueron sometidas a una fuente de calor y se fueron tomando alícuotas a los diferentes tiempos. En las Figuras 11 y 12, se muestran la evolución de los isómeros geométricos, (Z)- y (todo-E)-isómeros, hallados en la cinética y en las Tablas 3 y 4 se muestra la cuantificación (en porcentaje, %) de cada una de las especies a los diferentes tiempos del experimento. Para observar los cambios en los porcentajes de las especies, se cuantificó el área correspondiente a su pico cromatográfico y se realizó su porcentaje teniendo en cuenta el área total del (todo-E)-isómero, así como, de los respectivos (Z)-isómeros formados.

Tabla 3: Cuantificación (en porcentaje, %) en la isomerización térmica de cada uno de los Isómeros de luteína a los tiempos 0, 15,30, 60, 120, 180, 240, 500 y 600 minutos. Los datos se encuentran expresados en función de sus medias \pm desviación estándar; n.d, no detectado.

Luteína	Minutos								
	0	15	30	60	120	180	240	500	600
Todo-E	88,5 \pm 2,02	88,2 \pm 0	86,4 \pm 0	86,1 \pm 0	83,2 \pm 0	80,9 \pm 0,44	76,0 \pm 1,3	65,1 \pm 0,13	66,1 \pm 0,21
Isómero 1	3,37 \pm 0,16	3,27 \pm 0	3,20 \pm 0	3,18 \pm 0	3,24 \pm 0	3,43 \pm 0,13	3,17 \pm 0,34	4,54 \pm 0,05	3,75 \pm 0,10
Isómero 2	2,21 \pm 1,1	2,60 \pm 0	2,67 \pm 0	2,87 \pm 0	3,01 \pm 0	3,08 \pm 0,02	3,78 \pm 0,90	3,98 \pm 0,29	3,27 \pm 0,10
Isómero 3	2,15 \pm 1,2	2,10 \pm 0	2,81 \pm 0	1,95 \pm 0	3,92 \pm 0	4,90 \pm 0,14	6,52 \pm 0,90	10,6 \pm 0,076	11,2 \pm 0,01
Isómero 4	3,80 \pm 0,14	3,80 \pm 0	4,87 \pm 0	3,93 \pm 0	6,63 \pm 0	7,71 \pm 0,18	10,5 \pm 0,24	13,2 \pm 0,13	13,7 \pm 0,01
Isómero 5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2,63 \pm 0,09	1,97 \pm 0,005

Tabla 4: Cuantificación (en porcentaje, %) en la isomerización térmica de cada uno de los Isómeros de zeaxantina a los tiempos 0, 15,30, 60, 120, 180, 240, 500 y 600 minutos. Los datos se encuentran expresados en función de sus medias \pm desviación estándar. n.d, no detectado.

Zeaxantina	Minutos								
	0	15	30	60	120	180	240	500	600
Todo-E	87,2 \pm 1,2	85,7 \pm 0,12	83,7 \pm 1,01	77,3 \pm 0,87	74,7 \pm 0,97	68,3 \pm 0,78	62,3 \pm 0,82	50,8 \pm 0,49	47,9 \pm 0,26
Isómero 1	3,03 \pm 0,29	3,46 \pm 0,32	3,62 \pm 0,64	3,76 \pm 0,77	3,44 \pm 0,69	3,46 \pm 0,31	3,52 \pm 0,22	3,38 \pm 0,53	3,40 \pm 0,67
Isómero 2	3,88 \pm 0,46	4,45 \pm 0,43	4,65 \pm 0,72	4,67 \pm 0,88	4,52 \pm 0,77	4,59 \pm 0,28	4,67 \pm 0,16	5,84 \pm 0,1	6,02 \pm 0,53
Isómero 3	4,59 \pm 0,54	4,31 \pm 0,5	5,85 \pm 0,27	8,67 \pm 0,48	11,6 \pm 1,15	16,4 \pm 0,55	20,6 \pm 0,20	23,2 \pm 0,76	24,1 \pm 0,12
Isómero 4	1,34 \pm 0,89	4,31 \pm 0,082	2,16 \pm 0,08	2,94 \pm 0,29	1,82 \pm 0,35	1,92 \pm 0,41	1,87 \pm 0,27	n.d	n.d
Isómero 5	n.d	n.d	n.d	2,65 \pm 0,59	3,89 \pm 0,09	5,26 \pm 0,06	7,01 \pm 0,02	16,8 \pm 0,67	18,6 \pm 1,0

Los resultados de la isomerización térmica en ambos compuestos indicaron que la formación de (Z)-isómeros aumenta con el tiempo, y así con la aplicación de calor (Figura 11), en contraste con lo que ocurre con el (todo-E)-isómero, que desciende a lo largo del tiempo (Figura 12). No obstante, tanto en la luteína como en la zeaxantina, se observa como a t=500 min se alcanza un equilibrio donde las proporciones de todos los (Z)- y (todo-E)-isómeros permanecen más o menos constantes hasta t=600 min. El isómero geométrico mayoritario en el equilibrio de ambos compuestos fue el (todo-E) (Tablas 3 y 4). Por otro lado, en las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas pertenecientes al conjunto estereoquímicos de ambos carotenoides en equilibrio termodinámico.

En el caso de la luteína, a t=500 min los (Z)-isómeros que se encontraron en proporciones mayores fueron: isómero 4 (13% aprox, que fue anotado como (13-Z)-luteína), isómero 3 (aproximadamente 11%, que fue anotado como (13'-Z)-luteína), isómero 1 (aproximadamente 5%, que fue anotado como (9-Z)-luteína), el isómero 2 (aproximadamente 4%) e Isómero 5 (aproximadamente 3%, que fue anotado como (9'-Z)-luteína). De acuerdo a los resultados obtenidos, Aman et al.⁸⁹ estudiaron que el calentamiento a 98 °C durante 60 minutos de un estándar de luteína eleva la cantidad de (13-Z)- y (13'-Z)-luteína, en un 18,3 y 16,8%, respectivamente, mientras que los (9-Z) y (9'-Z) resultaron indetectables, por tanto, estos datos apoyan a los resultados que se han obtenido.

En el experimento de isomerización de la zeaxantina, a t=500 min los (Z)-isómeros encontrados en mayores proporciones fueron: isómero 3 (aproximadamente 23%, que fue anotado como (13-Z)-zeaxantina), isómero 5 (aproximadamente 17%, que fue anotado como (9Z)-zeaxantina), isómero 2 (aproximadamente 6%, tentativamente identificado como (9Z, 15Z)-zeaxantina) e isómero 1 (aproximadamente 3%, tentativamente identificado como (9Z, 9'Z)-zeaxantina). En cuanto al isómero 4 de la zeaxantina, este no volvió a detectarse en los tiempos posteriores a t=240 min, por tanto, podría tratarse de un isómero transitorio con escasa estabilidad térmica. En consonancia con los resultados obtenidos, se ha identificado (13-Z)-zeaxantina como el mayor producto de isomerización al someter a este compuesto a un rango de temperaturas entre 35-95 °C⁹⁰, por tanto, estos datos apoyan a los hallazgos anteriormente descritos, donde el mayor producto de degradación fue precisamente este isómero.

Por último, para la asignación de los distintos isómeros, se adoptaron una serie de reglas, ya que no hay estándares disponibles para HPLC que nos permita identificar los distintos (Z)-isómeros de luteína y zeaxantina. Por ello, de una forma intuitiva, se tuvo en cuenta que el máximo de absorción de los (Z)-isómeros se encuentra desplazado unos pocos nm en comparación con la configuración (todo-E), normalmente, 2-6 nm para los (mono-Z)-isómeros y 8-12 nm para los (di-Z)-isómeros. Por otro lado, es característica la aparición de un nuevo pico, denominado "pico cis" sobre 330-340 nm los (Z)-isómeros. La intensidad de este pico se incrementa si el doble enlace sujeto a la isomerización se encuentra localizado hacia el centro de la cadena de la molécula, de esta forma, la intensidad del "pico cis" varía de menor a mayor de esta forma: (todo-E) < (7-Z) < (9-Z) < (13-Z) < (15-Z). De igual forma, se ha visto que los (9Z, 9'Z)-isómeros tienen un "pico cis" de pequeña intensidad, mientras que, el "pico cis" de los (9Z, 13Z)-, (9Z, 13'Z)- y (9Z, 15Z)-isómeros es de mediana intensidad. También se tuvo en cuenta que en el caso del β-caroteno, (9-Z)- y (13-Z)-β-caroteno son más estables que los (7-Z)-

o (15-Z)-isómeros, por tanto, los anteriores aparecerían en proporciones mayores. Por todo lo anteriormente comentado, los (Z)-isómeros han sido identificados, junto a las reglas anteriormente citadas, a datos reportados en la bibliografía, respecto a su orden de elución y espectro de absorción de cada uno de ellos^{91,23,77}.

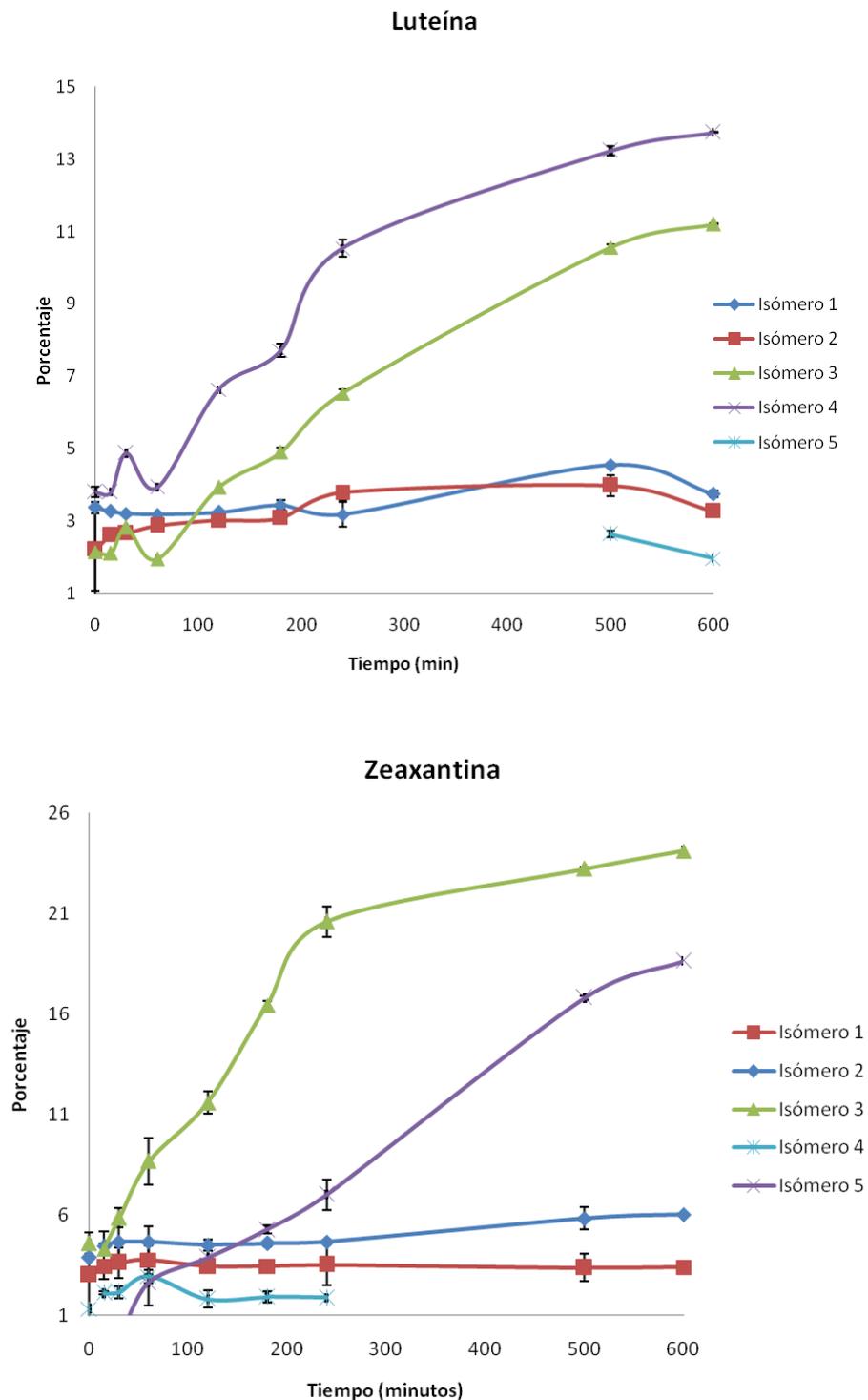


Figura 11: Evolución en porcentajes de los (Z)-isómeros de luteína y zeaxantina formados como consecuencia de la isomerización térmica.

Por otro lado, el (todo *E*)-isómero de ambos carotenoides experimenta un decrecimiento con respecto al tiempo, a diferencia de lo que ocurre con el aumento generalizado de los (*Z*)-isómeros de ambos compuestos (Figura 12). Por tanto, se podría decir que el calor produce un aumento de sus (*Z*)-isómeros y una disminución de sus (todo *E*)-isómeros (Tabla 3 y 4).

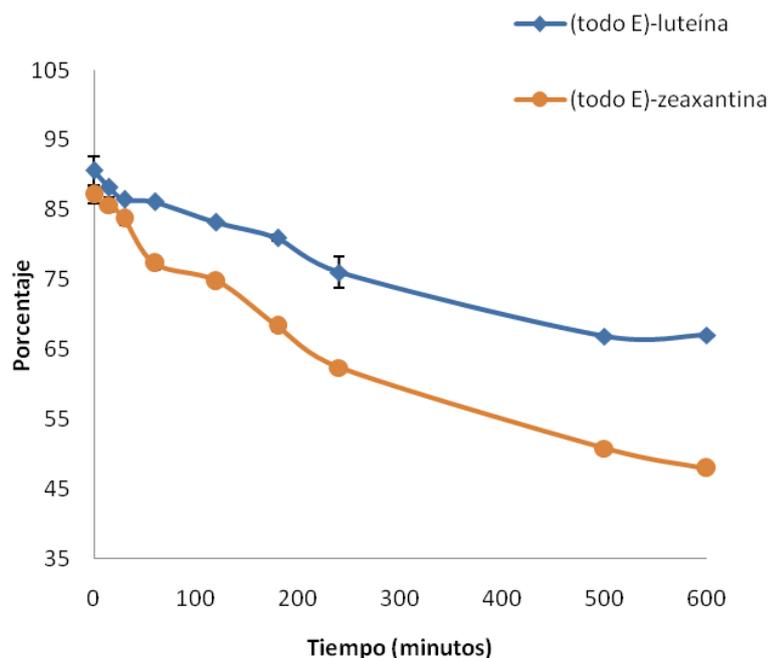


Figura 12: Comparación de la evolución en porcentajes del (todo *E*)-isómero de luteína y zeaxantina bajo la aplicación de calor.

Existen estudios que evaluaron cómo la esterilización y pasteurización aplicada a purés de tomate produce un aumento de (9-*Z*)- y (13-*Z*)-licopeno y una disminución de (todo *E*)-licopeno. De igual modo, también se ha visto cómo el procesamiento térmico de vegetales incrementa los (*Z*)-isómeros de luteína y zeaxantina en un 22 y 17%, respectivamente, disminuyendo de esta forma las concentraciones del (todo-*E*)-isómero de ambos compuestos²³. Aman et al.⁹¹ encontraron que la esterilización de maíz dulce reduce la luteína y zeaxantina total en un 26 y 29% respectivamente, mientras que los (*Z*)-isómeros de luteína y zeaxantina se incrementaron de 12% a 30% a 7% a 25%, respectivamente. En otro estudio, se ha visto que la esterilización a 130 °C y el blanqueamiento aplicado sobre zumos de zanahorias eleva los niveles de (*Z*)-isómeros⁹². Por otra parte, es importante tener en cuenta que la aplicación de calor es una forma típica de preparar los alimentos para su consumo, por ello, se ha estudiado la susceptibilidad de isomerización de los carotenoides presentes en cinco variedades de tomate sometidos a métodos de cocinado similares a los que se usan para prepararlo para su consumo. Los resultados mostraron que la luteína y el β -caroteno tenían una mayor tendencia a isomerizar con respecto a otros carotenoides como el γ -caroteno o el licopeno⁹³. En la misma línea que el estudio anterior, se ha estudiado el efecto de la fritura sobre diferentes vegetales y se observó que esta favorecía la isomerización de estos compuestos⁹⁴. Además, se ha estudiado el efecto del cocinado sobre el contenido en

carotenoides del salmón, concluyendo que los (*Z*)-isómeros, entre los que se encuentran (*9-Z*)-astaxantina, (*13-Z*)-astaxantina, (*13-Z*)-cantaxantina, (*13-Z*)-adonirubina, se incrementaban durante su cocinado, aparte de suponer una merma en la concentración total de carotenoides⁹⁵. A parte, se ha visto que el tipo de cocinado incide de forma diferente sobre la isomerización de los carotenoides, de hecho, los resultados mostraron que el cocinado con microondas afecta de forma menos acusada a la isomerización de estos⁹⁵.

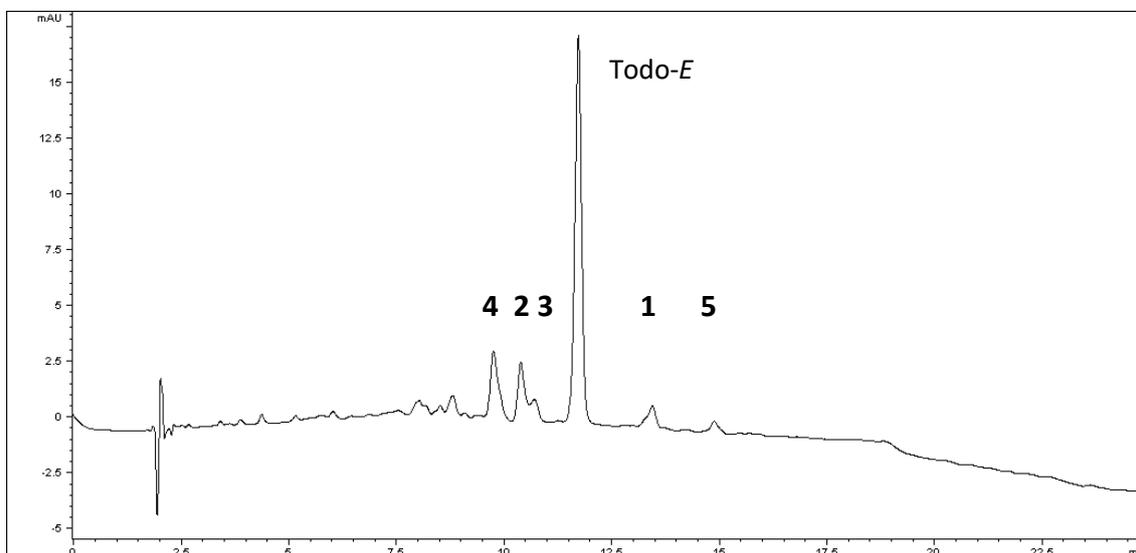


Figura 13: Cromatograma perteneciente al conjunto estereoquímico en equilibrio de la luteína en la isomerización térmica. Los picos se corresponden con (todo-*E*)-luteína, 1= (*9-Z*)-luteína (isómero 1), 2= isómero 2, 3= (*13'*-*Z*)-luteína (isómero 3), 4= (*13-Z*)-luteína (isómero 4), 5= (*9'-Z*)-luteína (isómero 5).

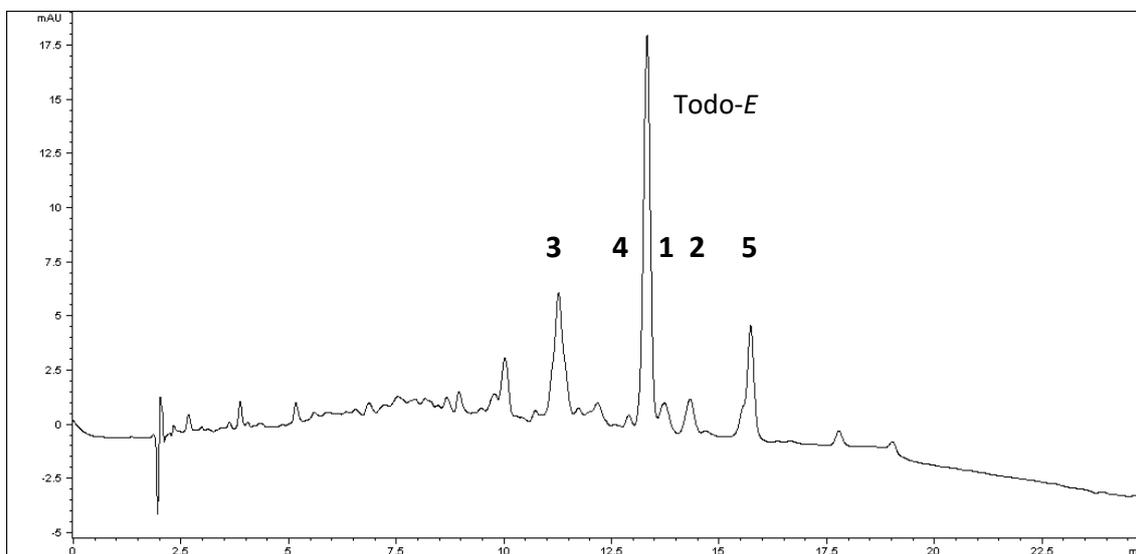


Figura 14: Cromatograma perteneciente al conjunto estereoquímico en equilibrio de la zeaxantina en la isomerización térmica. Los picos se corresponden con (todo-*E*)-zeaxantina, 1= (*9Z*, *9'Z*)-zeaxantina (isómero 1), 2= (*9Z*, *15Z*)-zeaxantina (isómero 2), 3= (*13-Z*)-zeaxantina (isómero 3), 4= isómero 4, 5= (*9-Z*)-zeaxantina (isómero 5).

A la luz de estos experimentos, también se ha observado una mayor estabilidad de la luteína con respecto a la zeaxantina bajo efectos del calor. Aunque hasta $t=15$ minutos ambos carotenoides descienden con igual comportamiento, tras este punto la luteína presenta una mayor resistencia a la degradación que la zeaxantina, manteniéndose la luteína siempre en proporciones superiores (Figura 12). De esta forma, la luteína finaliza la cinética en $t=600$ minutos con una diferencia superior de 18 puntos con respecto a la zeaxantina. Ya se ha descrito que la luteína tiene una buena estabilidad durante el cocinado, aunque este estudio tiene el hándicap de que solamente analiza la verdura cocinada y no analiza la composición del material fresco⁹⁶. No obstante, se ha visto en sistemas modelos que la luteína es más resistente a la degradación que otros carotenoides, como el licopeno o el β -caroteno, aunque estos datos no han podido ser extrapolados a otros alimentos debido a que las matrices alimentarias son complejas, como consecuencia de la enorme cantidad de compuestos presentes⁹⁷, por tanto, resultaría interesante realizar más estudios sobre la estabilidad térmica de la luteína, pero centrándose en el alimento en sí. Por otra parte, teniendo en cuenta todos los datos recogidos, bajo las condiciones experimentales descritas, se podría afirmar que la luteína es menos susceptible a la formación de isómeros que la zeaxantina. Sin embargo, en un trabajo realizado por Updike et al.²³ encontraron que el procesamiento térmico del brócoli cocinado al microondas, maíz enlatado, col rizada enlatada y espinacas enlatadas aumenta más los (Z)-isómeros de luteína, con respecto a los de zeaxantina, con una diferencia de hasta un 5%²³.

También, se llevó a cabo la reacción de isomerización catalizada por yodo, para ello, la muestra de zeaxantina fue sometida a una fuente de iluminación y se fueron tomando alícuotas a los diferentes tiempos, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La habilidad del yodo para favorecer el equilibrio de estos compuestos se conoce desde el siglo XIX y su mecanismo de actuación engloba a tres pasos que implican la unión del átomo de yodo, una rotación interna del enlace y un desprendimiento del átomo de yodo⁹⁸. En la Figura 15, se muestra la evolución de cada uno de los (Z)-isómeros y del (todo-E)-isómero en la reacción de isomerización catalizada por yodo. De la misma forma que en el caso anterior, para observar los cambios en sus porcentajes, se cuantificó el área correspondiente a su pico cromatográfico y se realizó el porcentaje teniendo en cuenta el área total del (todo-E)-isómero, así como, de sus respectivos (Z)-isómeros formados.

Los resultados de la isomerización catalizada por yodo, mostraron que la formación de (Z)-isómeros de la zeaxantina aumenta con el tiempo, a diferencia de lo que ocurre con el (todo-E)-isómero (Tabla 5). Es llamativo observar cómo a partir de $t=60$ min, las proporciones de los (Z)-isómeros así como la proporción del (todo-E)-isómero se mantienen más o menos constantes hasta $t=240$ min, es decir, parece que a partir de $t=60$ min se establece un equilibrio termodinámico, donde el isómero geométrico mayoritario fue el (todo-E). En la Figura 16 se muestra el cromatograma perteneciente al conjunto estereoquímicos de la zeaxantina en equilibrio termodinámico.

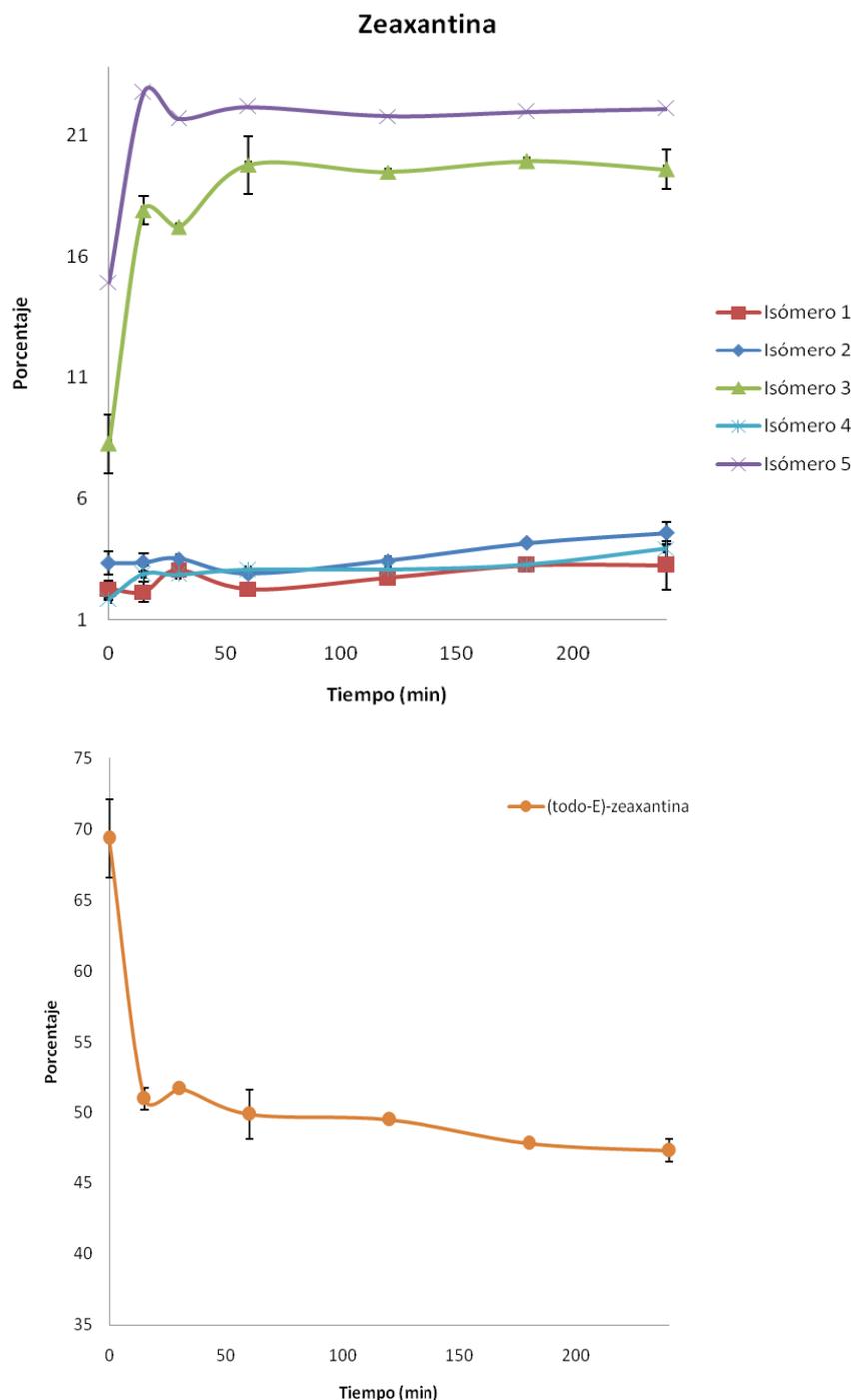


Figura 15: Evolución en porcentajes de los (Z)-isómeros y del (todo-E)-isómero de zeaxantina formados como consecuencia de la isomerización catalizada por yodo.

A $t=60$ min, los (Z)-isómeros que se encontraron en proporciones mayores fueron: isómero 5 (22% aprox, (9-Z)-zeaxantina), isómero 3 (aproximadamente 20%, (13-Z)-zeaxantina), isómero 4 (aproximadamente 3%), el isómero 2 (aproximadamente 3%, (9Z, 15Z)-zeaxantina) e Isómero 1 (aproximadamente 2%, (9Z, 9'Z)-zeaxantina). En este caso, el (Z)-isómero predominante en el equilibrio fue el isómero 5 (9-Z-zeaxantina), mientras que, en la isomerización térmica el predominante fue el isómero 3 (13-Z-zeaxantina), por tanto, a la luz de estos resultados, se podría afirmar que (13-Z)-zeaxantina tendría una mayor estabilidad

térmica que (9-Z)-zeaxantina. En contraste con los resultados obtenidos, en otro estudio, sometieron a este compuesto durante 50 minutos a luces con distinta longitudes de onda y observaron el isómero predominante fue el (13-Z), seguido por el (9-Z)-isómero⁹⁰. Sin embargo, hay que resaltar que sus experimentos no los llevaron a cabo con yodo. Aunque sí de acuerdo a los resultados obtenidos, se ha visto en una investigación realizada sobre el almacenamiento de zumo de zanahorias, que la formación de (9-Z)-isómeros está favorecida cuando el zumo se almacena en condiciones luminosas, a diferencia de lo que ocurre cuando se almacena en oscuridad, donde se encuentra favorecido el (13-Z)-isómero⁹⁹.

Por otro lado, como ocurría con la isomerización térmica, se produce una disminución progresiva de (todo-E)-zeaxantina hasta que es alcanzado el equilibrio (Figura 13). Ya ha sido estudiada la estabilidad de los carotenoides contenidos en zumo de tomate bajo distintas condiciones de almacenamiento, observándose que la luz potencia la degradación e isomerización de luteína, β -caroteno y licopeno¹⁰⁰. Por último, se ha comprobado en cloroplastos aislados de espinacas el efecto de la luz sobre la isomerización de β -caroteno y luteína, esta isomerización es mucho más leve que la provocada por el calor⁸⁹.

Tabla 5: Cuantificación (en porcentaje, %) de cada uno de los Isómeros de zeaxantina a los tiempos 0, 15,30, 60, 120, 180 y 240 minutos en la reacción de isomerización catalizada por yodo. Los datos se encuentran expresados en función de sus medias \pm desviación estándar.

Zeaxantina	Minutos						
	0	15	30	60	120	180	240
Todo-E	69,34 $\pm 2,7$	50,94 $\pm 0,76$	51,64 ± 0	49,83 $\pm 1,7$	49,46 ± 0	47,79 ± 0	47,29 $\pm 0,82$
Isómero 1	2,28 $\pm 0,35$	2,15 $\pm 0,41$	3,07 ± 0	2,27 $\pm 0,06$	2,74 ± 0	3,25 ± 0	3,24 $\pm 0,98$
Isómero 2	3,35 $\pm 0,46$	3,37 $\pm 0,39$	3,53 ± 0	2,90 $\pm 0,035$	3,45 ± 0	4,17 ± 0	4,58 $\pm 0,46$
Isómero 3	8,25 $\pm 1,2$	17,90 $\pm 0,59$	17,22 ± 0	19,77 $\pm 1,2$	19,50 ± 0	19,93 ± 0	19,59 $\pm 0,82$
Isómero 4	1,85 $\pm 0,036$	2,89 $\pm 0,33$	2,87 ± 0	3,05 $\pm 0,05$	3,09 ± 0	3,27 ± 0	3,93 $\pm 0,77$
Isómero 5	14,93 $\pm 0,70$	22,75 $\pm 0,53$	21,68 $\pm 0,43$	22,17 $\pm 0,43$	21,78 ± 0	21,96 ± 0	22,09 $\pm 0,92$

Por otra parte, este estudio podría tener importantes implicaciones sobre la calidad de los alimentos, ya que tanto la pérdida de carotenoides, como su isomerización, pueden producir tanto decoloraciones como pérdidas del sabor típico de los alimentos. Aunque en el caso de la isomerización de los carotenoides, el color no se ve muy afectado, ya que sólo hay un ligero desplazamiento espectral¹⁰¹. En cuanto al sabor, la pérdida de carotenoides genera productos volátiles que pueden ser deseables, como es el caso del té negro, formados principalmente por β -caroteno, luteína y zeaxantina, ya que forman parte del aroma típico del producto¹⁰² o pueden ser no deseables, como en el caso de la zanahoria deshidratada¹⁰³. No obstante, hay que tener en cuenta que los carotenoides al considerarse antioxidantes naturales pueden contribuir al aumento de la vida útil de los alimentos, por tanto, resultaría aconsejable que los procesadores de alimentos tomen las medidas necesarias para minimizar la degradación de estos pigmentos.

Por último, es importante tener en cuenta que el isómero predominante de las xantofilas presentes en la retina es el (todo-*E*), habiendo una pequeña proporción casi inexistente de los (*Z*)-isómeros, por tanto, se sugiere que la configuración *E*, que coincide con la especie mayoritaria del equilibrio termodinámico, es la más apta para estar implicada sobre la salud de la retina¹⁰⁴. No obstante, teniendo en cuenta los datos que indican la distinta biodisponibilidad de las formas *Z* y *E* del licopeno y β -caroteno en humanos^{24,25}, sería interesante continuar con el estudio de los (*Z*)-isómeros de luteína y zeaxantina, ya que nada se sabe acerca de la bioactividad de estos compuestos.

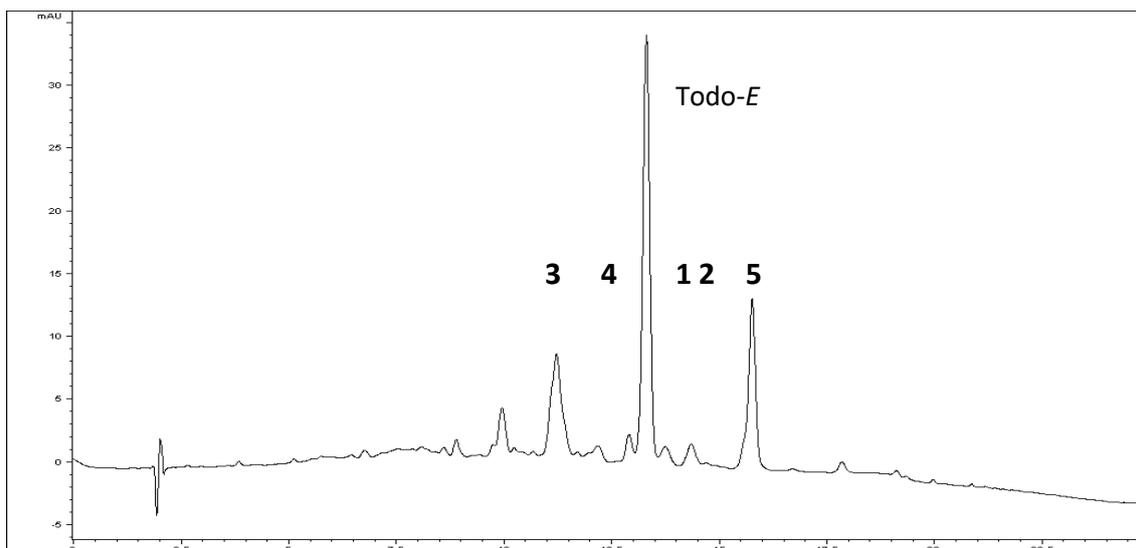


Figura 16: Cromatograma perteneciente al conjunto estereoquímico en equilibrio de la zeaxantina en la isomerización catalizada con yodo. Los picos se corresponden con (todo-*E*)-zeaxantina, 1= (9*Z*, 9'*Z*)-zeaxantina (isómero 1), 2= (9*Z*, 15*Z*)-zeaxantina (isómero 2), 3= (13-*Z*)-zeaxantina (isómero 3), 4= isómero 4, 5= (9-*Z*)-zeaxantina (isómero 5).

Conclusiones

- Se ha desarrollado una metodología útil para obtener cantidades considerables de luteína y zeaxantina a partir de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y de bayas de Goji (*Lycium Chinense*), respectivamente.
- El calor desencadena la isomerización de luteína y zeaxantina, produciéndose, así, un aumento de los (Z)-isómeros y una merma de los (todo-E)-isómeros. A t=500 min se alcanza un equilibrio, donde el isómero mayoritario en ambos casos fue el (todo-E). En cambio, (13-Z)-isómero fue el (Z)-isómero predominante en ambos compuestos.
- La luteína presenta una mayor estabilidad térmica con respecto a la zeaxantina, y por tanto, presenta una menor susceptibilidad en formar (Z)-isómeros ante el efecto del calor.
- La luz, junto al efecto catalizador del yodo, provoca la isomerización de la zeaxantina, produciéndose una disminución del (todo-E)-isómero, a favor de un aumento de los (Z)-isómeros. A t=60 min se alcanza un equilibrio donde el isómero mayoritario fue el (todo-E), aunque el (Z)-isómero mayoritario fue (9-Z)-zeaxantina.
- Hay una serie de isómeros de estos compuestos que se encuentran favorecidos termodinámicamente, por tanto, los resultados obtenidos podrían ser útiles para predecir la composición en isómeros de luteína y zeaxantina de diversas matrices, como alimentos, tejidos humanos y fluidos biológicos.

Propuestas

Este estudio se encuadra en el contexto de que en las últimas décadas, ha cambiado la tendencia de los consumidores en relación con los alimentos. Actualmente, los consumidores entienden los alimentos como un producto que va a repercutir directamente en su salud, por ello, los alimentos de hoy en día no sólo deben aportar los nutrientes necesarios, satisfacer organolépticamente y saciar al hambre, sino que también deben servir para mejorar el bienestar de los consumidores, repercutiendo de esta forma, sobre su calidad de vida. Sobre este contexto, resultaría conveniente seguir avanzando en el conocimiento de los isómeros de luteína y zeaxantina, ya que como se ha comentado anteriormente, hay resultados que han demostrado la distinta biodisponibilidad de (Z)-isómeros del licopeno y β -caroteno sobre sus (todo-E)-isómeros. Actualmente, nada se sabe acerca de la bioactividad de los (Z)-isómeros de luteína y zeaxantina, por tanto, resultaría interesante utilizar estos isómeros geométricos para realizar estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* con el fin de evaluar su posible bioactividad. De hecho, el siguiente paso a dar tras este estudio, sería realizar un estudio *in silico* para obtener más información sobre la estabilidad termodinámica relativa a los isómeros geométricos encontrados.

Por último, en el caso de que los (Z)-isómeros de estudio tengan alguna bioactividad, se podría valorar su incorporación a un alimento destinado a un mundo donde cada vez más, el consumidor se preocupa de su salud. Por tanto, el desarrollo de nuevos productos funcionales basados en estos carotenoides podría considerarse como una oportunidad de mercado y diversificación para muchas empresas agroalimentarias.

Bibliografía

1. Fraser, P. D. & Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* **43**, 228–265 (2004).
2. Krinsky, N. I. Carotenoids Volume 4: Natural Functions. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 617–635 (2008).
3. Hernandez, Manuel; Sastre, A. in *Tratado de Nutrición*. 601–624 (1999).
4. Rao, A. V. & Rao, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* **55**, 207–216 (2007).
5. Yamaguchi, M. β -Cryptoxanthin and Bone Metabolism: The Preventive Role in Osteoporosis. *J. Heal. Sci.* **54**, 356–369 (2008).
6. Krinsky, N. I. & Johnson, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 459–516 (2005).
7. Hughes, D. A. Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* **17**, 823–827 (2001).
8. Palozza, P. Carotenoids and modulation of cancer: Molecular targets. *Curr. Pharmacogenomics* **2**, 35–45 (2004).
9. Mein, J. R., Dolnikowski, G. G., Ernst, H., Russell, R. M. & Wang, X. D. Enzymatic formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin by ferret carotene-9', 10'-monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **506**, 109–121 (2011).
10. Vilchez, C. *et al.* Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs* **9**, 319–333 (2011).
11. Beatty, S. *et al.* Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 439–446 (2001).
12. Krinsky, N. I., Landrum, J. T. & Bone, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* **23**, 171–201 (2003).
13. Landrum, J. T. & Bone, R. a. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 28–40 (2001).
14. Trumbo, P. R. & Ellwood, K. C. Lutein and zeaxanthin intakes and risk of age-related macular degeneration and cataracts: an evaluation using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for health claims. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 971–4 (2006).
15. Gong, X. & Rubin, L. P. Role of macular xanthophylls in prevention of common neovascular retinopathies: Retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* **572**, 40–48 (2015).
16. Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**, 1551–1558 (1995).
17. Woodall, A. A., Lee, S. W. M., Weesie, R. J., Jackson, M. J. & Britton, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1336**, 33–42 (1997).
18. Gabrielska, J. & Gruszecki, W. I. Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: A H-1-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* **1285**, 167–174 (1996).
19. Sujak, a *et al.* Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: the structural aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 301–307 (1999).
20. Gruszecki, W. I. & Strzałka, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. in *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1740**, 108–115 (2005).
21. Dugave, C. & Demange, L. Cis-trans isomerization of organic molecules and

- biomolecules: Implications and applications. *Chemical Reviews* **103**, 2475–2532 (2003).
22. Weedon BCL, M. G. in *Carotenoids, vol. 1A, Isolation and analysis* 27–70 (1995).
 23. Updike, A. A. & Schwartz, S. J. Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6184–6190 (2003).
 24. Johnson, E. J., Krinsky, N. I. & Russell, R. M. Serum response of all-trans and 9-cis isomers of beta-carotene in humans. *J. Am. Coll. Nutr.* **15**, 620–624 (1996).
 25. Unlu, N. Z. *et al.* Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *Br. J. Nutr.* **98**, 140–146 (2007).
 26. Bohm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G. & Schwartz, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 221–226 (2002).
 27. Schieber, A. & Carle, R. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. in *Trends in Food Science and Technology* **16**, 416–422 (2005).
 28. Melendez-Martinez, A. J., Paulino, M., Stinco, C. M., Mapelli-Brahm, P. & Wang, X.-D. Study of the time-course of cis/trans (Z/E) isomerization of lycopene, phytoene, and phytofluene from tomato. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12399–12406 (2014).
 29. Moran, N. a & Jarvik, T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* **328**, 624–627 (2010).
 30. Perry, A., Rasmussen, H. & Johnson, E. J. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J. Food Compos. Anal.* **22**, 9–15 (2009).
 31. Bermudez, O. I., Ribaya-mercado, J. D., Talegawkar, S. A. & Tucker, K. L. Hispanic and Non-Hispanic White Elders from Massachusetts Have Different Patterns of Carotenoid Intake and Plasma Concentrations 1. 1496–1502 (2005).
 32. Humphries, J. M. & Khachik, F. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1322–1327 (2003).
 33. Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T. & Amaya-Farfan, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 445–463 (2008).
 34. Murillo, E., Meléndez-Martínez, A. J. & Portugal, F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chem.* **122**, 167–172 (2010).
 35. Johnson, E. J., Neuringer, M., Russell, R. M., Schalch, W. & Snodderly, D. M. Nutritional manipulation of primate retinas, III: Effects of lutein or zeaxanthin supplementation on adipose tissue and retina of xanthophyll-free monkeys. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 692–702 (2005).
 36. Maoka, T., Arai, A., Shimizu, M. & Matsuno, T. The first isolation of enantiomeric and Meso-zeaxanthin in nature. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* **83**, 121–124 (1986).
 37. Nebeling, L. C., Forman, M. R., Graubard, B. I. & Snyder, R. A. Changes in carotenoid intake in the United States: The 1987 and 1992 National Health Interview Surveys. *J. Am. Diet. Assoc.* **97**, 991–996 (1997).
 38. Saini, R. K., Nile, S. H. & Park, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* **76**, 735–750 (2015).
 39. Castenmiller, J. J. M. & West, C. E. Bioavailability and Bioconversion of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 19–38 (1998).
 40. Van Het Hof, K. H. *et al.* Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 261–268 (1999).

41. Rich, G. T. *et al.* Solubilization of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: I. Modeling the gastric lumen. *Lipids* **38**, 933–945 (2003).
42. Courraud, J., Berger, J., Cristol, J. P. & Avallone, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chem.* **136**, 871–877 (2013).
43. Brown, M. J. *et al.* Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 396–403 (2004).
44. Judy, D. R.-M. Influence of dietary fat on (beta) -carotene absorption and bioconversion into Vitamin A. *Nutr. Rev.* **60**, 104 (2002).
45. Gleize, B. *et al.* Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. *Br. J. Nutr.* **110**, 1–10 (2013).
46. Handelman, G. J., Nightingale, Z. D., Lichtenstein, A. H., Schaefer, E. J. & Blumberg, J. B. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 247–251 (1999).
47. Chung, H.-Y., Rasmussen, H. M. & Johnson, E. J. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J. Nutr.* **134**, 1887–1893 (2004).
48. Aschoff, J. K. *et al.* In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) osbeck]. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 578–587 (2015).
49. Kostic, D., White, W. S. & Olson, J. A. Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 604–610 (1995).
50. Yeum, K.-J. & Russell, R. M. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 483–504 (2002).
51. Russell, R. M. Factors in Aging that Effect the Bioavailability of Nutrients. *J Nutr* **131**, 1359–1361 (2001).
52. Reboul, E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: Focus on transport proteins. *Nutrients* **5**, 3563–3581 (2013).
53. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
54. Bouayed, J. & Bohn, T. Dietary Derived Antioxidants: Implications on Health. *Nutr. Well-Being Heal.* 1–22 (2010).
55. Foote, C. S., Chang, Y. C. & Denny, R. W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5216–5218 (1970).
56. Bernstein, P. S. *et al.* Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research* **50**, 34–66 (2016).
57. Stahl, W. & Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 345–351 (2003).
58. Di Mascio, P., Kaiser, S. & Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 532–538 (1989).
59. Krinsky, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 617–635 (1989).
60. Sies, H. & Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1315S–1321S (1995).
61. Cai, J., Nelson, K. C., Wu, M., Sternberg, P. & Jones, D. P. Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research* **19**, 205–221 (2000).
62. Bone, R. A., Landrum, J. T., Hime, G. W., Cains, A. & Zamor, J. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 2033–2040 (1993).

63. Bone, R. A. *et al.* Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp. Eye Res.* **64**, 211–8 (1997).
64. Klaver, C. C., Wolfs, R. C., Vingerling, J. R., Hofman, a & de Jong, P. T. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol* **116**, 653–8 (1998).
65. SanGiovanni, J. P. *et al.* The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **125**, 1225–1232 (2007).
66. SM, M., Volland, R., Tinker, L. & al, et. ASsociations between age-related nuclear cataract and lutein and zeaxanthin in the diet and serum in the carotenoids in the age-related eye disease study (carelds), an ancillary study of the women's health initiative. *Arch. Ophthalmol.* **126**, 354–364 (2008).
67. Morganti, P. *et al.* Role of topical and nutritional supplement to modify the oxidative stress. *Int. J. Cosmet. Sci.* **24**, 331–339 (2002).
68. Heinen, M. M. *et al.* Intake of antioxidant nutrients and the risk of skin cancer. *Eur. J. Cancer* **43**, 2707–2716 (2007).
69. Palombo, P. *et al.* Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: A double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol. Physiol.* **20**, 199–210 (2007).
70. Gammon, M. A., Riccioni, G. & D’Orazio, N. Carotenoids: Potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr. Res.* **59**, (2015).
71. Hozawa, A. *et al.* Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *J. Hypertens.* **27**, 237–42 (2009).
72. Street, D. a, Comstock, G. W., Salkeld, R. M., Schuep, W. & Klag, M. J. Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation* **90**, 1154–1161 (1994).
73. Craft, N. E., Haitema, T. B., Garnett, K. M., Fitch, K. A. & Dorey, C. K. Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain. *J.Nutr.Health Ageing* **8**, 156–162 (2004).
74. Johnson, E. J. Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutr. Rev.* **72**, 605–612 (2014).
75. Renzi, L. M., Iannaccone, A., Johnson, E. & Kritchevsky, S. The relation between serum xanthophylls, fatty acids, macular pigment and cognitive function in the Health ABC Study. *FASEB J.* **22**, 877.5-877.5 (2008).
76. Vishwanathan, R., Schalch, W. & Johnson, E. J. Macular pigment carotenoids in the retina and occipital cortex are related in humans. *Nutr. Neurosci.* **0**, 1–7 (2015).
77. Li, D., Xiao, Y., Zhang, Z. & Liu, C. Analysis of (all-E)-lutein and its (Z)-isomers during illumination in a model system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 33–39 (2014).
78. Sivel, M., Kracmar, S., Fiser, M., Klejdus, B. & Kuban, V. Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. *Czech J. Food Sci.* **32**, 521–525 (2014).
79. Peng, Y. *et al.* Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in Lycium fruits (*Fructus Lycii*). *Plant Foods Hum. Nutr.* **60**, 161–164 (2005).
80. Mouly, P. P., Gaydou, E. M. & Corsetti, J. Determination of the geographical origin of valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. *J. Chromatogr. A* **844**, 149–159 (1999).
81. Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. & Heredia, F. J. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6362–6367 (2005).
82. Rodriguez, D. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. Life Sciences* (2001).
83. Rodriguez-Amaya, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and

- antioxidant activity of food carotenoids-A review. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**, 726–740 (2010).
84. Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallick, B., Dhar, P. & Ghosh, S. Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8259–8264 (2010).
 85. Li, W., Gao, Y., Zhao, J. & Qi, W. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8478–8484 (2007).
 86. Zhao, L. Q., Qiu, Z. Q., Narasimhamoorthy, B. & Greaves, J. A. Development of a rapid, high-throughput method for quantification of zeaxanthin in Chinese wolfberry using HPLC-DAD. *Ind. Crops Prod.* **47**, 51–57 (2013).
 87. Karioti, A., Bergonzi, M. C., Vincieri, F. F. & Bilia, A. R. Validated method for the analysis of Goji berry, a rich source of Zeaxanthin dipalmitate. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12529–12535 (2014).
 88. Calvo, M. M. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 671–696 (2005).
 89. Aman, R., Schieber, A. & Carle, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of beta-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9512–9518 (2005).
 90. Milanowska, J. & Gruszecki, W. I. Heat-induced and light-induced isomerization of the xanthophyll pigment zeaxanthin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **80**, 178–186 (2005).
 91. Aman, R. *et al.* Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chem.* **92**, 753–763 (2005).
 92. Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A. & Carle, R. Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chem.* **83**, 609–617 (2003).
 93. Nguyen, M., Francis, D. & Schwartz, S. Thermal isomerisation susceptibility of carotenoids in different tomato varieties. in *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 910–917 (2001).
 94. Kidmose, U., Yang, R.-Y., Thilsted, S. H., Christensen, L. P. & Brandt, K. Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 562–571 (2006).
 95. Osawa, A. *et al.* Changes of Carotenoids in Atlantic Salmon by Heat Cooking and the Singlet Oxygen Quenching Activities of the Artificially Produced Carotenoids. *Food Process. Technol.* **5**, (2014).
 96. De Sá, M. C. & Rodriguez-Amaya, D. B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *Food Chem.* **83**, 595–600 (2003).
 97. Henry, L. K., Catignani, G. L. & Schwartz, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 823–829 (1998).
 98. Hepperle, S. S., Li, Q. & East, A. L. L. Mechanism of cis/trans equilibration of alkenes via iodine catalysis. *J. Phys. Chem. A* **109**, 10975–10981 (2005).
 99. Chen, H. E., Peng, H. Y. & Chen, B. H. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. *Food Chem.* **57**, 497–503 (1996).
 100. Lin, C. H. & Chen, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem.* **90**, 837–846 (2005).
 101. Rodriguez-Amaya, D. B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch. Latinoam. Nutr.* **49**, (1999).
 102. Ravichandran, R. Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on tea quality and aroma. *Food Chem.* **78**, 23–28 (2002).

103. Falconer, M. E., Fishwick, M. J., Land, D. G. & Sayer, E. R. Carotene oxidation and off-flavour development in dehydrated carrot. *J. Sci. Food Agric.* **15**, 897–901 (1964).
104. Johnson, E. J., Neuringer, M., Russell, R. M., Schalch, W. & Snodderly, D. M. Nutritional Manipulation of Primate Retinas, III: Effects of Lutein or Zeaxanthin Supplementation on Adipose Tissue and Retina of Xanthophyll-Free Monkeys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 692–702 (2005).