



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES EN
SUERO MEDIANTE HPLC**

Autor: Ignacio Iniesta López-Casero

D.N.I.: 06285269J

Tutor: Elena Rodríguez Rodríguez

Convocatoria: Junio 2019

ÍNDICE:

1. Resumen.....	2
2. Introducción y Antecedentes.....	2
2.1. Estructura de los carotenoides.....	2
2.2. Propiedades de los carotenoides.....	3
2.3. Funciones de los carotenoides.....	4
2.4. Carotenoides en la dieta.....	5
2.5. Absorción y metabolismo de carotenoides.....	5
2.6. Principales carotenoides en suero.....	6
3. Objetivos.....	6
4. Metodología.....	7
5. Resultados y Discusión.....	7
5.1 Extracción de carotenoides en suero.....	7
5.2 Determinación analítica de HPLC en suero mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	7
5.3 Aspectos generales de la cromatografía líquida de alta resolución.....	8
5.4 Modalidades de cromatografía empleadas en la separación de carotenoides.....	9
Cromatografía en fase normal.....	9
Cromatografía en fase reversa.....	9
Columnas C ₁₈	10
Columnas C ₃₀	10
Comparación entre columnas C ₁₈ y C ₃₀	10
5.5. Detectores.....	11
5.6 Espectrometría de masas acoplada a HPLC.....	15
5.7 Espectrometría de masas frente a detector UV-Vis de diodos en línea.....	16
6. Conclusión.....	18
7. Bibliografía.....	18

1. Resumen

La importancia de los carotenoides se solía asociar a su papel como colorante y precursor de la vitamina A, sin embargo, son cada vez más los estudios que indican sus múltiples beneficios para la salud, como son la prevención del envejecimiento celular y de distintos tipos de cáncer.

Se estima que con la dieta, principalmente a partir del consumo de frutas y verduras, se ingieren en torno a 50 carotenoides. Sin embargo, en el plasma sanguíneo este número se reduce a alrededor de 20, de los cuales los principales son β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pueden separarse, identificarse y cuantificarse, de manera eficaz y fiable (al tener una elevada sensibilidad, resolución y reproducibilidad) los carotenoides anteriormente citados. En la mayor parte de los casos se utiliza para el análisis de HPLC la fase reversa con columna C_{30} y una fase móvil polar, normalmente una mezcla de agua o solución tampón con eluyentes polares como el metanol, el acetonitrilo o el tetrahidofurano.

Una de las características de los carotenoides es su capacidad de absorber luz Uv-Vis, siendo, por ello, los detectores Uv-Vis los más utilizados en esta técnica (y en concreto el detector diodo array-DAD). Además, cabe destacar que es muy frecuente usar la espectrometría de masas (con ionización APCI) acoplada a HPLC, para un mejor conocimiento de su estructura molecular.

2. Introducción

2.1 Estructura de los carotenoides

Los carotenoides son la clase más extendida de pigmentos isoprenoides, que son sintetizados por organismos fotosintéticos (incluyendo plantas), algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. Dado que los animales (excepto algunas especies de pulgones) son incapaces de sintetizar carotenoides, deben obtenerse de los alimentos (1,2).

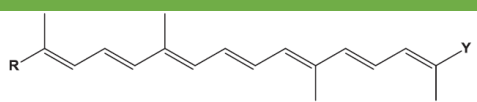
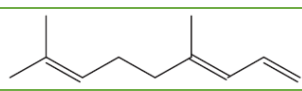
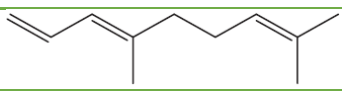
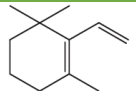
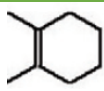
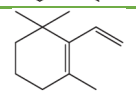
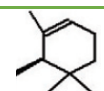
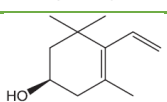
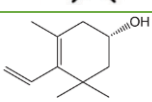
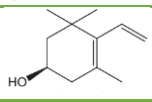
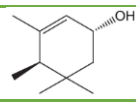
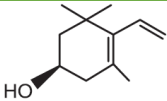
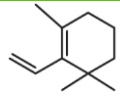
Los carotenoides son tetra terpenos de 40 átomos de carbono (C_{40}) constituidos por múltiples unidades de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Estos compuestos están divididos en dos clases principales:

Tabla 1: Principales tipos de carotenoides

Carotenoides de hidrocarburos		Ejemplos
Derivados oxigenados de carotenoides hidrocarbonados o xantofilas	Con átomo de O en forma de alcohol	Luteína, zeaxantina, criptoxantina
	Cetona	Cantaxantina
	Combinación de alcohol y cetona	Astaxantina
	Ésteres de alcohol	Fucoxantina

Estos compuestos pueden clasificarse también en carotenoides provitamina A (por ejemplo, β -caroteno, β -criptoxantina), y carotenoides no provitamina A, que no pueden ser convertidos en retinol (por ejemplo, luteína y licopeno) (1).

Tabla 2: Nombres, estructuras y pesos moleculares de los principales carotenoides en suero (5)

Estructura básica del carotenoide		
		
<u>Carotenoide</u>	R	Y
Licopeno		
β-Caroteno		
α-Caroteno		
Zeaxantina		
Luteína		
β-Criptoxantina		

2.2 Propiedades de los carotenoides

Solubilidad

La gran mayoría de los carotenoides son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, metanol, hexano y éter dietílico. La esterificación de xantófilas va a modificar sus características, de forma que la asociación con ácidos grasos aumentará su lipofilia. Por el contrario, si las xantófilas se encuentran asociadas con azúcares, aumentará su hidrofilia (2).

Absorción de luz

Debido a la presencia del cromóforo de dobles enlaces conjugados, los carotenoides (con pocas excepciones) absorben luz UV-visible. Esta es su característica estructural más importante, ya que además de permitirles absorber luz, les confiere reactividad y la posibilidad de transferir energía (2). Normalmente aparecen tres máximos de absorción (Figura 6) y las longitudes de onda a las que aparecen ($\lambda_{\text{máx}}$) dependen del número de dobles enlaces conjugados y del disolvente empleado para medir el espectro (Tabla 3).

La mayoría de los carotenoides absorben generalmente luz azul y violeta (aprox. 400-500 nm), de forma que exhiben coloraciones amarillentas, anaranjadas o rojizas. Otros carotenoides como fitoeno y fitoflueno son incoloros y no absorben en estas longitudes de onda, fitoeno absorbe entre 250nm y 300nm y fitoflueno entre 330nm y 370nm. Hay que tener en cuenta que el color depende de otros factores además de la estructura química, como por ejemplo, la concentración, la agregación de moléculas o la interacción con otras moléculas (3).

Tabla 3: Longitud de onda de absorción λ (nm) en sus tres picos y solvente utilizado en los carotenoides mayoritarios en sangre (6).

	λ (nm) *	Solvente
Alfa-Caroteno	420, 445, 473	Hexano
Beta-Caroteno	420, 450, 472	Hexano
Beta-Criptoxantina	421, 452, 478	Hexano
Luteína	420, 447, 471	Etanol
Licopeno	446, 472, 503	Hexano
Zeaxantina	446, 472, 503	Hexano

**El pico máximo es el segundo valor de λ (nm) para cada carotenoide.*

2.3 Funciones de los carotenoides

Tradicionalmente, la importancia atribuida a ellos radicó en su papel como colorantes naturales y al hecho de que algunos de ellos pueden convertirse en vitamina A. Sin embargo, cabe destacar el interés de los carotenoides en nutrición y salud, independientemente de su papel como precursores de vitamina A (4). En este sentido, los carotenoides (o sus derivados) suscitan un gran interés en relación con su posible papel beneficioso al disminuir el riesgo de padecer enfermedades diversas como distintos tipos de cáncer, trastornos oculares, enfermedades cardiovasculares, de la piel u óseas. Los carotenoides juegan papeles muy significativos, como son (5):

- Protección contra cáncer de pulmón, cerebro y próstata (la mayoría de ellos), probablemente debido a sus potentes propiedades antioxidantes mediadas por la oxidación del anión radical superóxido. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones. En presencia de oxidantes se forman con facilidad radicales libres de vida corta. Los radicales libres como el oxígeno singlete $\cdot O_2$ e hidroxilo $\cdot OH$ son especies altamente reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, inactivar proteínas, o causar daño molecular de ADN o ARN (3).
- Modulación del sistema inmunitario, factores de crecimiento y vías de señalización intracelular
- Regulación de la diferenciación celular, ciclo celular y apoptosis
- Fotoprotección contra la radiación UV (por ello también son ampliamente utilizados en productos cosméticos)

- Precusores para el pigmento visual retinol (vitamina A)
- Luteína y la zeaxantina son los únicos carotenoides de la mácula, la zona ocular responsable de la visión aguda y detallada. Sus complementos disminuyen el riesgo de degeneración macular (5).

2.4 Carotenoides en la dieta

La mayoría de los carotenoides dietéticos se obtienen a partir de un número limitado de frutas y verduras, pero la contribución de los alimentos derivados de animales es también significativa. Las verduras de hoja verde oscuro, frutas de colores y microalgas unicelulares son las principales fuentes. Además, la yema de huevo, los productos lácteos (leche, mantequilla, etc.) y los mariscos contienen altos niveles de carotenoides como luteína, β -caroteno, zeaxantina, astaxantina, o cantaxantina.

A pesar de esto, nuestra dieta normal solo cubre una fracción de toda la diversidad de carotenoides. Se estima que nuestra ingesta diaria de alimentos apenas contiene unos 50 carotenoides que pueden ser absorbidos y utilizados en nuestro cuerpo. En el plasma sanguíneo humano, este número se reduce a alrededor de 20, de los cuales los principales son β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina. Los carotenoides fitoeno y fitoflueno también son carotenoides circulantes importantes (3,4).

Solo una fracción de los carotenoides ingeridos en nuestra dieta ha sido estudiada en profundidad, lo que significa que hay mucho margen para para conocer mejor las propiedades, acciones y aplicaciones prácticas de carotenoides dietéticos. (4).

2.5 Absorción y metabolismo de carotenoides

La biodisponibilidad se define como la fracción de un nutriente (en este caso, carotenoide) que se absorbe y está disponible para su uso en condiciones fisiológicas normales o para almacenamiento. La biodisponibilidad de carotenoides está determinada por una combinación de factores dietéticos y fisiológicos y varía según el tipo de carotenoide, la matriz alimentaria en la que se incorpora y los factores relacionados con el huésped (4).

Dentro de las características de los carotenoides, la liposolubilidad será la que condicione el proceso de liberación, transporte y asimilación desde el alimento, así como la eficacia de estas etapas. En el hombre, la eficiencia de este proceso no es muy alta, ya que sólo un 30% del total de los carotenoides ingeridos se absorben de forma efectiva (4).

Con respecto a la liberación y solubilización desde la matriz alimentaria, los carotenoides se solubilizan en micelas desde el alimento, es un proceso mecánico y enzimático en el que la masticación y la acción de las secreciones gástricas e intestinales permiten liberar los carotenoides e incorporarlos en estas pequeñas gotas de grasa. En esta etapa, el mayor grado de procesamiento del alimento y la cantidad de grasa ingerida con él aumentan la solubilización de estos tetraterpenos (si la matriz es rica en fibras, la disponibilidad final de carotenos se reduce en comparación con una matriz oleosa) (4,5). Tras ser incorporados a las micelas desde la matriz alimentaria, se produce la absorción del contenido de éstas por las células intestinales, para finalmente ser secretados al sistema linfático. Si el alimento está cocinado o previamente homogeneizado, se favorecerá la absorción (4).

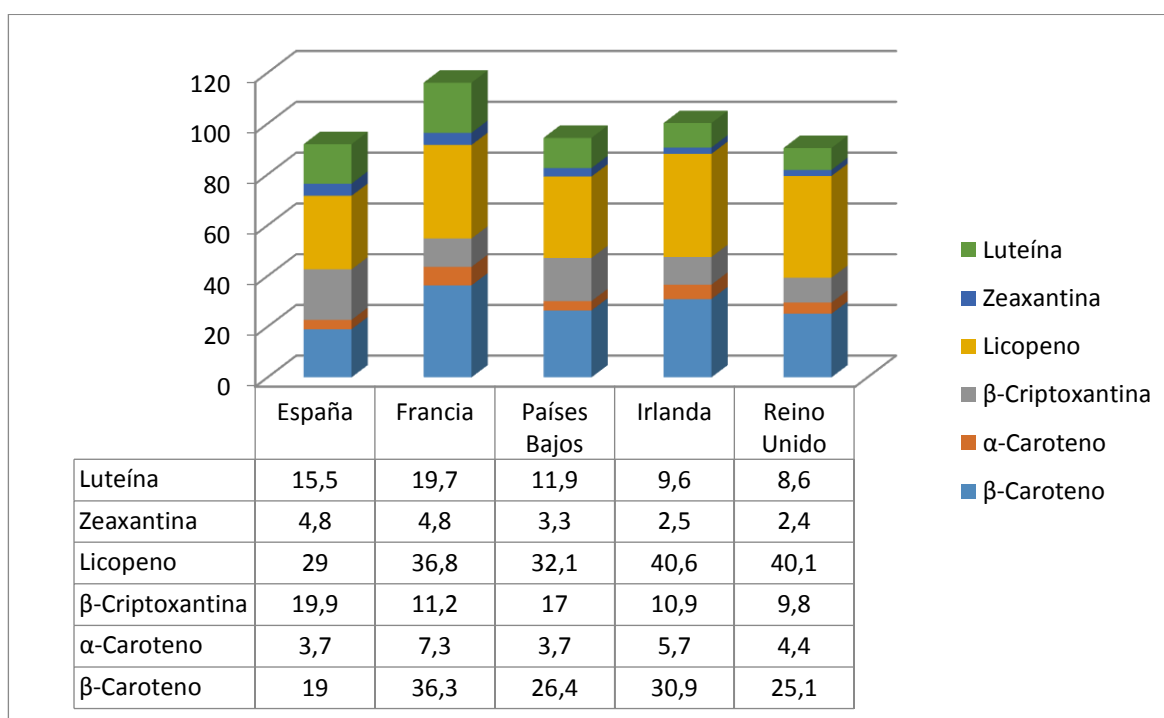
Atendiendo al tipo de carotenoide, los que están formados únicamente por un esqueleto hidrocarbonado tienen una biodisponibilidad relativa más baja que los que tienen oxígeno en su estructura, como son los casos de luteína y zeaxantina. Estos, al tener una polaridad más alta, pueden ser incorporados más fácilmente en las micelas lipídicas formadas en el tracto gastrointestinal (5).

2.6 Principales carotenoides en suero

El perfil de carotenoides séricos está determinado fundamentalmente por la dieta. Por lo tanto, cambia según la época del año y el país de procedencia. En el suero humano, se han identificado gracias a la técnica de HPLC, unos 20 carotenoides, muchos de ellos isómeros. Generalmente se cuantifican 6 que se encuentran mayoritariamente en todos los individuos de distintos países y son: α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno. Todos ellos tienen actividad como antioxidantes y solo los 3 primeros son precursores de la vitamina A (6).

En la figura 1 se muestran los valores de los principales carotenoides encontrados en suero en $\mu\text{g/dL}$ en un grupo de adultos europeos sanos usando HPLC. Las concentraciones altas se encontraron para licopeno y β -caroteno (7):

Figura 1: Concentraciones de carotenoides séricos ($\mu\text{g/dL}$) en sujetos sanos de 5 países de la Unión Europea (7)



3 Objetivo

Teniendo en cuenta las propiedades beneficiosas para la salud asociadas al consumo de carotenoides, es importante analizar la concentración de estos compuestos en suero para determinar el estado nutricional de la población, siendo la técnica de HPLC una de las más extendidas con este fin y la que se va a tratar en el presente trabajo.

4 Metodología

La realización de este trabajo se basó en una revisión bibliográfica, en su desarrollo se procedió a una búsqueda sobre los carotenoides y los métodos analíticos utilizados para su determinación, en concreto de la técnica de HPLC y los distintos tipos de detectores asociados a ella.

Para ello, se hicieron consultas en PubMed, CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo), ResearchGate y ScienceDirect. En la elección de los artículos bibliográficos para su consulta, se estableció el límite en 20 años, tipo de artículo científico, que fueran revisiones y ensayos clínicos y dando prioridad siempre a aquellos artículos en los que la extracción se realizara en suero. Con todo ello, las palabras clave empleadas en la búsqueda han sido: *carotenoids determination HPLC serum* para las que se obtuvieron 2921 artículos, *analysis methods carotenoids* para las que salen 518 resultados, *carotenoids extraction HPLC serum* para las cuales salen 328 resultados.

Finalmente, en la realización de esta revisión bibliográfica se han usado 19 artículos y una página web (<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com>).

5. Resultados y discusión

5.1 Extracción de carotenoides en suero

Se siguen los siguientes pasos en su extracción:

1. Se toma una muestra de sangre en ayunas (punción en vena antecubital), la sangre se recoge en tubos con anticoagulante (EDTA), se centrifuga, se separa el suero y se dispensa en eppendorfs.
2. Se guardan a -80 °C (ultracongelación) hasta su análisis (6,7).
3. Para la precipitación de proteínas, se le añade etanol y seguidamente se extrae con un solvente orgánico y se agita en vortex.
4. Se centrifuga y la capa orgánica se transfiere a otro tubo de ensayo.
5. El proceso de extracción se repite, se unen ambos extractos y se evapora el extracto a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
6. El residuo se resuspende en disolvente orgánico (depende del solvente de inyección que se use en el HPLC) y se procede a su determinación (6).

La mayoría de los estudios con muestras humanas han usado butilhidroxitolueno (BHT) para prevenir la oxidación de los carotenoides y la equinona como patrón interno. Además, se utiliza etanol para precipitar proteínas en suero y plasma, ya que estas proteínas pueden causar la obstrucción de los patrones en las columnas de HPLC e interfieren con la separación cromatográfica (6).

El disolvente más común empleado para la extracción de plasma de carotenoides es n-hexano o una mezcla de n-hexano y otros disolventes (por ejemplo, hexano/éter, hexano/etanol, hexano/diclorometano y hexano/cloroformo) (7).

5.2 Determinación analítica de HPLC en suero mediante cromatografía líquida de alta resolución

Antes de la aparición de la cromatografía líquida de alta resolución, la separación de los pigmentos carotenoides se realizaba por cromatografía en columna abierta (OCC) y por cromatografía en capa fina (TLC). Sin embargo, la alta variabilidad en su estructura química y su mala estabilidad dificultan su análisis. También la falta de patrones y las bajas concentraciones encontradas en muestras biológicas como suero y tejido humano dificultan el desarrollo de estos métodos analíticos (8,9).

En la actualidad la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método de elección para la separación, análisis y cuantificación de carotenoides al presentar muchas ventajas en comparación con otras técnicas cromatográficas, sobre todo en resolución, separación, tiempo necesario de análisis y cantidad requerida de muestra (9).

Se han utilizado una serie de técnicas basadas en cromatografía líquida para analizar carotenoides, la mayoría de ellos acoplados a un detector UV-Vis. Como consecuencia de la serie de dobles enlaces conjugados (cromóforo), la mayoría de los carotenoides se absorben en el rango de 400–500 nm (aunque algunos precursores de licopeno, tales como fitoeno y fitoflueno, absorben al máximo en la región UV). Por ello, la información espectral es una herramienta útil para distinguir e identificar diferentes especies de carotenoides (9).

Sin embargo, los espectros de carotenoides son muy similares, por ello se suele completar la identificación utilizando otros detectores de espectrometría de masas para proporcionar información de la estructura molecular, especialmente para carotenoides desconocidos de muestra complejas (4). Los instrumentos de espectrometría de masas se utilizan para superar interferencias espectrales en UV-Vis y, por tanto, para lograr una alta sensibilidad en mezclas complejas y obtener su estructura molecular (10).

También se puede utilizar la técnica de UPLC (cromatografía líquida de ultra-resolución), aquí las columnas cromatográficas tienen tamaños de partículas inferiores a 2 μm y se aplican presiones mucho mayores. Con ello, se pueden conseguir análisis más rápidos, picos más estrechos y mayor sensibilidad (10,11).

5.3 Aspectos generales de la cromatografía líquida de alta resolución

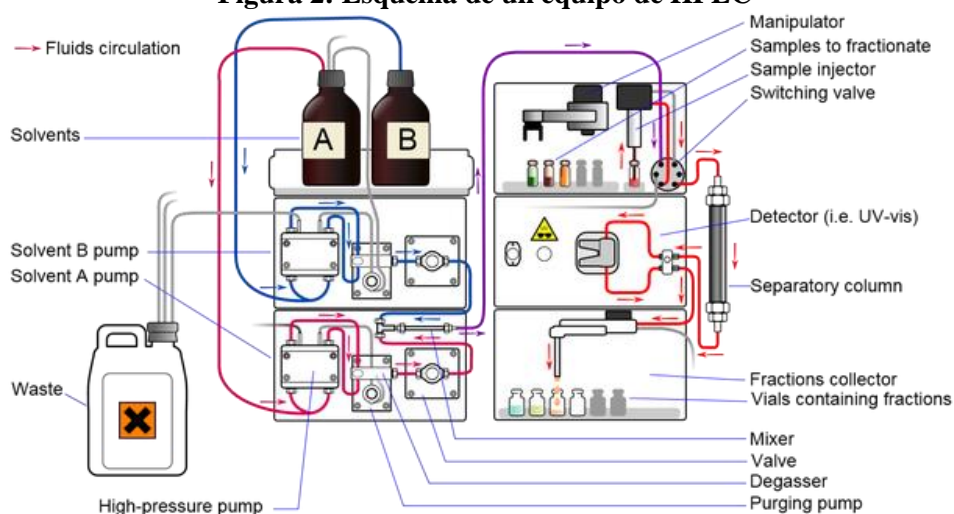
La técnica de HPLC se basa en la separación de los analitos en función de la interacción de los mismos entre una fase líquida móvil y una fase estacionaria (10). En este tipo de cromatografía, el líquido que compone la fase móvil se bombea mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Así, un equipo de HPLC consiste en bomba, inyector, precolumna, columna, detector (que puede ser de varios tipos) y sistema de registro. El conjunto está controlado habitualmente por un software de gestión del sistema cromatográfico, adquisición de datos y posterior análisis de los mismos.

En las fases móviles, la viscosidad y la polaridad de los solventes empleados son los factores más importantes a considerar, debiendo ser ambos factores bajos. La fase móvil debe ser compatible con el método de detección y los carotenoides deben ser solubles en ella. Como ya se ha mencionado, los carotenoides suelen ser moléculas muy hidrófobas y solubles en disolventes orgánicos como acetona, éter dietílico o cloroformo (12,13).

Las bombas contienen los solventes, estos pueden estar en distintas proporciones y su mezcla es esencial para la extracción. Los solventes pueden utilizarse de forma isocrática (el solvente

conserva la misma composición durante todo el tiempo de análisis) o en gradiente (la composición del solvente varía durante el análisis) (12).

Figura 2: Esquema de un equipo de HPLC



5.4 Modalidades de cromatografía empleadas en la separación de carotenoides

Cromatografía en fase normal:

Se basa en la interacción de los analitos con grupos funcionales polares de la superficie de la fase estacionaria, alcanza su potencia máxima cuando se utilizan eluyentes no polares como fase móvil. La cromatografía en fase normal es una herramienta de separación muy potente por la amplia gama de eluyentes disponibles que se pueden utilizar para ajustar con precisión la selectividad de una separación (13).

Con respecto a la fase estacionaria, en este tipo de cromatografía es de naturaleza polar, siendo los materiales para el relleno de la columna sílice y nitrilo. La presencia de grupos polares es el factor determinante en las interacciones entre los carotenoides y la sílice. Los carotenos tienen baja afinidad por la sílice, eluyendo al comienzo de la cromatografía y obteniendo una resolución baja.

La fase móvil es no polar o de baja polaridad, siendo el hexano el disolvente más usado y no estando el uso de agua recomendado (12).

Cromatografía en fase reversa:

Es la técnica de separación por cromatografía líquida más utilizada actualmente en el laboratorio. En ella se combinan una fase móvil polar, normalmente una mezcla de agua o solución tampón con eluyentes polares como el metanol, el acetonitrilo o el tetrahidofurano, y una fase estacionaria no polar como hidrocarburos de cadena larga unidos a un soporte de sílice o híbrido (13).

Esta es la separación más usada en HPLC, principalmente por tener una fase hidrofóbica aplicable a un amplio rango de moléculas, por retener mejor los analitos orgánicos y por tener

más opciones para el cromatógrafo, al permitir controlar también tipo de disolvente orgánico, concentración y pH (12). Otra de las ventajas de la fase reversa es la posibilidad de usar agua en la composición de la fase móvil. Dentro de esta modalidad de fase reversa, y para el análisis de carotenoides, se utilizan columnas C_{18} y C_{30} .

Columnas C_{18}

La cromatografía en columna de fase reversa C_{18} se utiliza en la separación de carotenoides por su carácter hidrófobo. En esta columna los grupos silanol de sílice están unidos a cadenas de alquilo de 18 carbonos, de ahí su denominación. Dependiendo de la disposición de las cadenas de alquilo en la sílice encontramos dos tipos de columnas: columnas monoméricas (donde las cadenas de alquilo son paralelas entre sí) y poliméricas (en las que el polímero orgánico cubre la estructura de sílice de manera entrelazada) (12).

Las de conformación monomérica tienen mayor reproducibilidad, mientras que las poliméricas tienen mayor selectividad, sobre todo en la separación de xantofilas.

Columnas C_{30}

La introducción de estas columnas supuso un gran avance en la capacidad de resolución cromatográfica para la separación de carotenoides.

- Ventajas: este tipo de fase estacionaria tiene una mayor selectividad para la separación de carotenoides y sus isómeros geométricos en comparación con las columnas C_{18} . Esto se debe principalmente al tamaño de los grupos enlazados con la fase de sílice, que aumenta la hidrofobicidad de la de la fase estacionaria y permite a su vez una mayor interacción con los carotenoides.
- La desventaja con respecto a la columna C_{18} es el tiempo de análisis, que es más largo y puede extenderse hasta los 100 minutos (12). También muestran limitaciones a la hora de analizar de manera cuantitativa los picos de carotenoides y sus áreas (para esto pueden usarse de manera complementaria las columnas C_{18}) (13).

La mayoría de los métodos de columnas C_{30} usan como fase móvil alguna combinación de metil-terc-butil éter (MTBE), metanol y una pequeña cantidad de agua y emplean un gradiente para la separación óptima de diferentes especies de carotenoides y sus isómeros. Otras usan una combinación de acetonitrilo, metanol, alcohol isopropílico, acetato de etilo, diclorometano o THF, y combinaciones de los mismos (14).

La separación cromatográfica en las columnas C_{30} depende mucho de la temperatura, ya que modifica la organización de los grupos presentes en la superficie de sílice. A bajas temperaturas, las cadenas de alquilo están dispuestas en trans, dando mayor selectividad. Si la temperatura aumenta, aparece también la conformación cis y se pierde selectividad (13).

Comparación entre columnas C_{18} y C_{30}

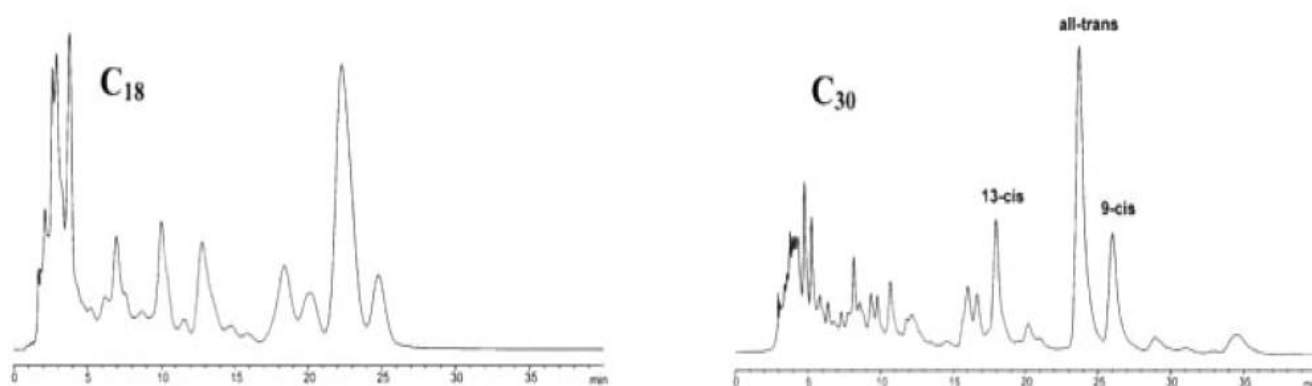
A pesar de que el tiempo empleado en las columnas C_{30} es superior al empleado en las C_{18} , la fase estacionaria en columna C_{30} muestra una gran selectividad de formas y capacidad superior para separar no solo diferentes especies de carotenoides, sino también isómeros (Figura 3).

Como ejemplo de diferencia entre ellas, el orden de elución del licopeno varía mucho entre las columnas C_{18} y C_{30} . En una columna C_{18} , el licopeno eluye antes que α -caroteno y β -caroteno. Sin embargo, en una columna C_{30} , el licopeno se retiene y eluye en último lugar, lo cual permite una separación muy eficaz de isómeros. También se puede utilizar una columna C_{30} para distinguir entre la trans-luteína total y trans-zeaxantina y sus isómeros cis, isómeros cis de β -caroteno, e isómeros de licopeno y cis-licopeno. Además, las columnas C_{30} también pueden permitir la separación de isómeros inducidos por procesamiento térmico e in vivo (14). Si la fase móvil es la misma, el orden de elución de los seis principales carotenoides en suero en ambas columnas es: 1. Luteína, 2. Zeaxantina, 3. β -Criptoxantina, 4. α -Caroteno, 5. β -Caroteno y 6. Licopeno.

Por otro lado, las columnas C_{18} monoméricas se han mostrado eficaces para la separación de luteína y zeaxantina, además en este caso la fase más eficaz es la fase normal. Incluso se ha podido observar la separación de isómeros de estos dos carotenoides en ella, pero no así para los demás isómeros geométricos de carotenoides en suero, para los cuáles sólo se consiguieron separaciones parciales (12). Dependiendo de las dificultades en el reacondicionamiento de la columna se trabajará con fase móvil en gradiente (si no hay muchas) o en modo isocrático si se encuentran más problemas (14).

En la separación de patrones, se encontraron datos de un estudio comparativo (13) entre las fases estacionarias de las columnas C_{18} y C_{30} , en él se demostraba la mayor eficacia para separar patrones de luteína y zeaxantina por parte de las C_{30} .

Figura 3: Separación por HPLC de isómeros de β -caroteno a 21,8 °C utilizando una columna C_{18} como fase estacionaria y acetona/agua (83:17, v/v), flujo 1 mL/min y detección a 450 nm; y una columna C_{30} como fase estacionaria y acetona/agua (93:7, v/v), flujo 1 mL/min (7).



5.5 Tipos de detectores empleados

Los detectores transforman la señal analítica en señal eléctrica, se han diseñado y perfeccionado con el fin de incorporar celdas de flujo que permitan medir las bajas concentraciones de analito. Según la propiedad a estudiar, encontramos distintos tipos (12):

- Basados en la propiedad de la fase móvil: detector de índice de refracción, detectores electroquímicos y detectores de dispersión de luz
- Basados en una propiedad del soluto: detector de absorbancia en UV, detector de absorbancia en IR y detector de fluorescencia (7).

A continuación, describiremos los más importantes y usados en HPLC

Detector de índice de refracción

Miden una propiedad de la disolución, en concreto la variación en su índice de refracción como consecuencia de la presencia de un soluto. Sobre la cubeta se irradia un haz de luz que se desvía cuando la muestra aparece en el líquido eluido de la columna. Son detectores universales y no dependen del caudal de fase móvil. Sin embargo, no pueden usarse en elución con gradiente, sus medidas se ven afectadas por los cambios de temperatura (14).

Detectores electroquímicos

No se usa tanto como el anterior, su funcionamiento se basa en las propiedades de oxidación y reducción de analitos en un potencial fijo. Estos detectores son muy útiles en el análisis de compuestos orgánicos como tocoferoles o carotenoides en bajas concentraciones porque permite eliminar compuestos no deseados a través de la oxidación selectiva de interferentes antes de la detección del compuesto seleccionando el potencial químico adecuado (15).

Detectores de dispersión de luz

La dispersión se produce por la interacción de la radiación electromagnética con la materia. El eluato (sustancia que migra a través de la fase estacionaria) que abandona la columna se nebuliza mediante un flujo de nitrógeno o de aire y se vaporiza la fase móvil, quedando únicamente unas finas gotitas de soluto sin evaporar. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz de láser y la dispersión producida es detectada por un fotodiodo de silicio (16).

Detector de absorción infrarroja

Las celdas empleadas en estos detectores son similares a las empleadas en los detectores de absorción UV-Vis, excepto por las ventanas ópticas, que en este caso son de cloruro de sodio o de fluoruro de calcio. Se emplea en aquellos analitos que absorben radiación infrarroja, cuya longitud de onda supera los 700 nm, por lo que se debe prestar atención al disolvente utilizado, ya que muchos de ellos también absorben radiaciones (12,14).

Detector de fluorescencia

Se basan en la capacidad de algunos solutos de emitir fluorescencia, o de aquellos que no lo son pero pueden hacerlo tras un tratamiento adecuado, los más sencillos emplean una fuente de excitación de mercurio y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente. Los instrumentos más sofisticados consisten en una fuente de radiación de xenón y emplean un monocromador de red para aislar la radiación (15, 16).

UV-Vis

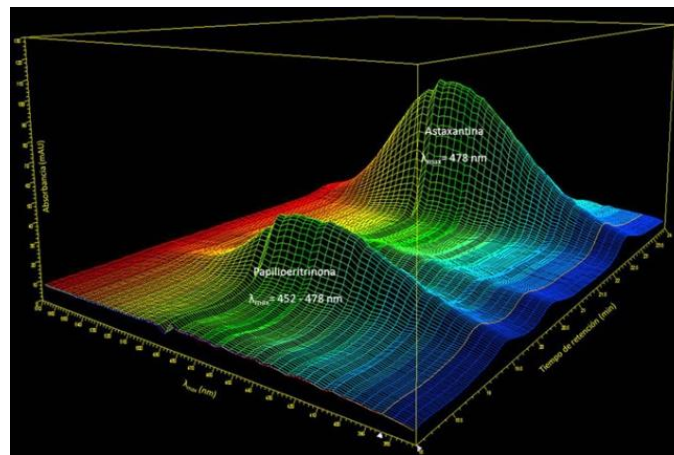
Como ya se ha descrito anteriormente, los carotenoides tienen como estructura básica un esqueleto tetraterpeno con 40 átomos de carbono que consta de ocho unidades de isopreno enlazadas. Su característica estructural principal es el sistema de dobles enlaces conjugados, donde los electrones están deslocalizados (cromóforo). Este cromóforo es el responsable de la capacidad de los carotenoides para absorber luz en la región visible, para cuya detección hay varios detectores de UV-Vis que se muestran eficaces (14). Basándose en dicha propiedad, los detectores UV-Vis se posicionan como los más usados en el análisis de HPLC para

carotenoides. Los detectores UV-Vis son muy sensibles, tienen buena estabilidad frente a cambios de temperatura y admiten eluciones de diferentes compuestos.

Dentro de estos detectores existen tres tipos (14):

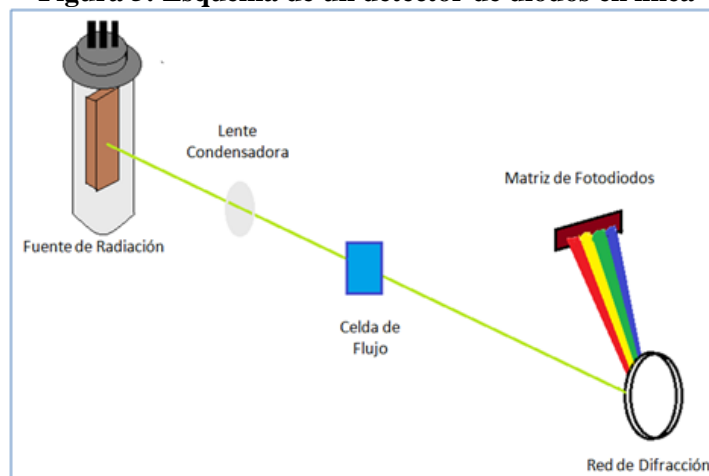
- Los fotómetros de filtro, que son los más sencillos, emplean una lámpara de mercurio como fuente y una serie de filtros para aislar la línea de 254 nm con la que se mide la absorbancia.
- Los espectrómetros de barrido, que permiten realizar el análisis seleccionando una o varias longitudes de onda.
- El detector de diodos en línea o diodo array (DAD), es el más popular, puede recoger datos de forma continua durante todo el análisis, facilitando con ello la determinación de la pureza y la identificación de compuestos desconocidos y proporcionando un cromatograma tridimensional (Figura 4).

Figura 4: Cromatograma tridimensional realizado por detector de diodos en línea



En estos detectores, la radiación pasa a través de la muestra en la celda de flujo, se dispersa por una rejilla y penetra en la matriz de diodos. Cada diodo mide un rango estrecho de longitudes de onda del espectro, midiendo así una amplia banda de datos espectroscópicos simultáneamente (Figura 5).

Figura 5: Esquema de un detector de diodos en línea

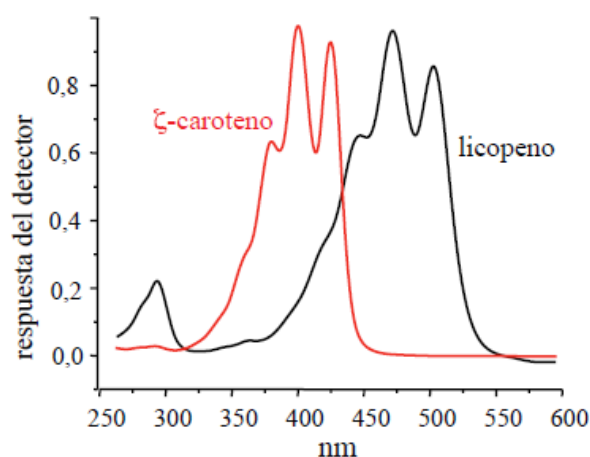


Identificación y cuantificación de carotenoides en detectores UV-Vis

El espectro electromagnético de un compuesto es la distribución característica de la radiación electromagnética emitida o absorbida por ese compuesto particular (15). Los compuestos con dobles enlaces conjugados absorben a 217 nm, y a medida que aumenta el número de dobles enlaces conjugados la energía disminuye y por tanto la longitud de onda aumenta, llegando hasta la región visible (400 nm a 760 nm).

Un espectro UV-visible de buena calidad se puede obtener fácilmente con un espectrofotómetro con 1 a 2 mg de un carotenoide aislado o con algunos nanogramos en un sistema HPLC-DAD (1). El espectro UV-visible de un carotenoide puede ofrecer información muy útil sobre el cromóforo, grupos funcionales y anillos presentes. El cromóforo de los carotenoides les permite absorber luz, les confiere reactividad y la posibilidad de transferir energía, en esta absorción suelen aparecer tres máximos de absorción (Figura 6).

Figura 6: Espectros de absorción UV-Vis de ζ -caroteno y licopeno obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE donde se aprecian los tres picos de cada carotenoide (1).



Las características del espectro UV-Vis de carotenoides dependen de varios factores (14):

- Disolvente: el aumento del índice de refracción del disolvente produce un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y el aumento de polaridad del disolvente produce disminución de la estructura espectral.
- Número de dobles enlaces conjugados: a medida que aumenta, las longitudes de onda máxima aumentan.
- Isomería Z/E: para isómeros Z se produce un desplazamiento hacia longitudes de onda menores.
- Grupo terminal cíclico: provoca un impedimento estérico y se desplazan hacia longitudes de onda menores (1, 15).

Para la cuantificación de los carotenoides en estos detectores, es necesario usar estándares de referencia (16). Existen los materiales de referencia certificados (CRM), que son muestras que contienen una concentración certificada de una o varias sustancias. Estos materiales son proporcionados por organismos reconocidos y se utilizan para determinar la exactitud de un procedimiento de análisis cuantitativo durante su validación. El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) es el único organismo que tiene CRM para la cuantificación de carotenoides, en concreto, posee una muestra de suero humano que contiene mezcla de vitaminas liposolubles y que proporciona valores para un gran número de carotenoides (también para los principales luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno y licopeno) (14).

La exactitud de los resultados depende de la pureza de los patrones y del grado de exactitud con que sus concentraciones son conocidas. Solo los patrones de β -caroteno y el α -caroteno están comercialmente disponibles. Los patrones para los otros carotenoides deben ser obtenidos de fuentes naturales, aislados y purificados por TLC (cromatografía en capa fina) y HPLC. Además, los patrones sufren degradación después de haber abierto el recipiente sellado. Las soluciones patrón deben ser usadas recién preparadas, tener su concentración verificada por medida espectrofotométrica y su pureza por TLC o HPLC. Por lo tanto, el mayor problema de HPLC es la dificultad para obtener y preservar los patrones puros de carotenoides, especialmente para la calibración externa donde es necesario inyectar frecuentemente los patrones. Además, el alto costo del instrumento, columnas, solventes y los servicios de mantenimiento constituyen las principales desventajas de esta técnica (15).

5.6 Espectrometría de masas acoplada a HPLC

Existe una gran tendencia a utilizar los espectrómetros de masas (MS) acoplados al HPLC, ya que nos confirman la masa, composición y las características estructurales de estos pigmentos. En esta técnica la cantidad requerida de analito para el análisis es inferior que en el HPLC (14).

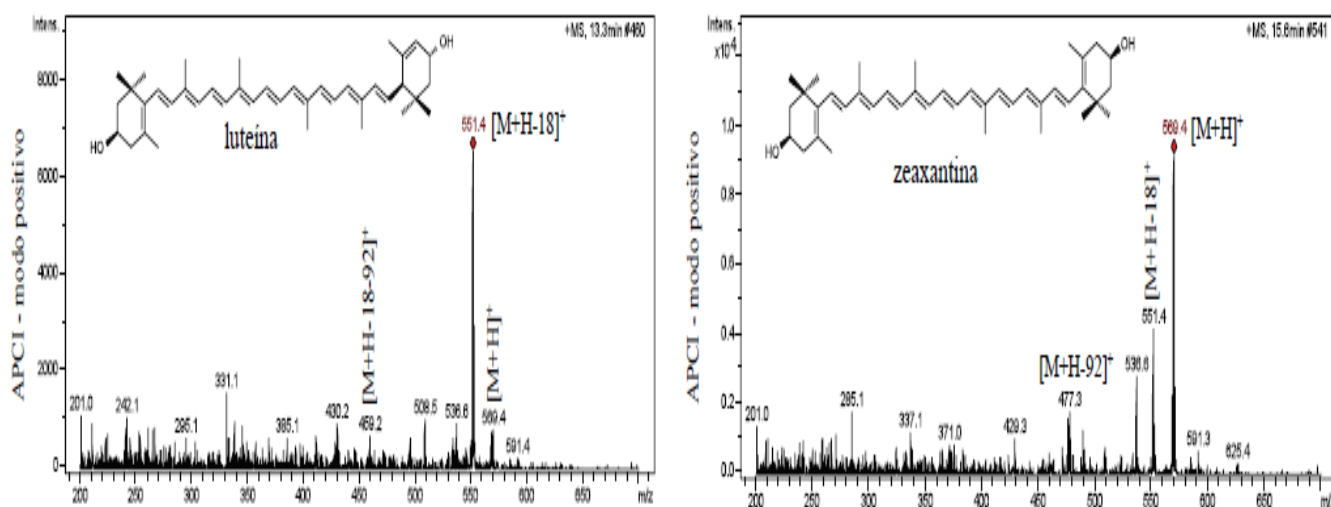
La detección mediante espectrometría de masas requiere la ionización de los analitos en la fuente de ionización, que después se separan en función de su masa en el analizador de masas para finalmente detectarse por niveles de abundancia. En esta unión entre cromatografía líquida y espectrometría de masas, surgen distintas modalidades técnicas:

- Ionización química a presión atmosférica o APCI, se trata de la más utilizada en la actualidad, es la más adecuada ya que es muy útil en estudios de carotenoides liposolubles y nos permite una buena ionización para compuestos no polares (1).

- ASAP (sonda de análisis) y MALDI-TOF (desorción/ionización por láser) se pueden utilizar para el análisis directo de muestras, sin necesidad de preparación de muestras ni cromatografía (15).
- El bombardeo con átomos rápidos o FAB, también conocido como espectrometría de masas de iones secundarios líquidos, es similar a MALDI-TOF pero utilizado para compuestos con alta polaridad y baja volatilidad, que son térmica y energéticamente lábiles.
- Las interfaces de ionización a presión atmosférica o API también se utilizan en el análisis de carotenoides, básicamente debido a su simplicidad y al acoplamiento directo en línea de las técnicas de separación al espectrómetro de masas. Las interfaces API han reemplazado la ionización FAB para la mayoría de las aplicaciones de espectrometría de masas (16).

La información espectral es una herramienta imprescindible para distinguir e identificar diferentes especies de carotenoides, por ejemplo, luteína y zeaxantina tienen el mismo peso molecular, pero mediante la espectrometría de masas APCI puede detectarse una intensidad de pico en la zeaxantina que no se aprecia en la luteína (Figura 7)

Figura 7: Estructuras químicas y espectros de masas de luteína y zeaxantina en APCI (17)



5.7 Espectrometría de masas frente a detector UV-Vis de diodos en línea

Tras la recopilación de las técnicas empleadas para el análisis de carotenoides, la espectrometría de masas APCI y el detector de diodos en línea (DAD) de UV-Vis se posicionan como las dos principales y las más usadas en la actualidad.

Es de gran importancia la utilización del espectro de masas para la obtención de la masa molecular y los patrones de fragmentación característicos de su estructura, pero resulta imprescindible la utilización del detector de diodos en línea para obtener un espectro fiable y con la adecuada sensibilidad. Hay que tener en cuenta que para los carotenoides comunes, los espectros UV-Vis solo proporcionan información sobre el cromóforo del carotenoide y es importante el análisis de su composición y características estructurales (16). Mediante la

espectrometría de masas se consigue superar interferencias espectrales que puede haber en UV-Vis y se consigue también una mayor sensibilidad en mezclas más complejas (17).

En la tabla 4 se incluye una revisión de diferentes trabajos en los que se han usado diferentes métodos para determinar carotenoides en suero o plasma humano (1).

Tabla 4: Ejemplos de metodologías para la separación por HPLC de carotenoides en muestras de suero y plasma

Características de la columna	Condiciones cromatográficas	Matriz	Carotenoides determinados	Método de detección	Nº de referencia
Fase reversa HPLC C₁₈ Microsorb 250x4,6 mm 5 µm Precolumna: Spheri-5-C₁₈ 30x4,6 mm, 5 µm	Fase reversa Modo de elución: Gradiente Eluyente: acetonitrilo/metanol / Diclorometano/hexano 85:10:2,5,2.5 de 0 a 10 min Flujo 0,7 mL/min	Suero humano y leche materna	E-caroteno, 3-hidroxi-caroten-3-ona, 6'R-luteína, 3'R zeaxantina.	DAD-MS	(14)
Fase reversa HPLC C₁₈ Nucleosil 150x4,6 mm, 3 µm Precolumna: C₁₈, Vydac 250x4,6 mm 5 µm y C₁₈, Hypersil 20x4,6 mm, 5 µm	Modo de elución: isocrático. Eluyente: acetonitrilo/metanol (50 mM acetato de amonio)/ agua/diclorometano 70:15:5:10 Flujo 2 mL/min	Plasma humano	Astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, equinona, trans-licopeno.	DAD	(18)
Fase reversa HPLC C₃₀ 150x4,6 mm, 3 µm	Modo de elución: Gradiente Eluyente: Metanol con 0,1% de acetato de amonio y metil tert-butil éter (MTBE)	Plasma humano	Luteína, zeaxantina, licopeno, β-criptoxantina, β-caroteno, α-caroteno, fitoeno, fitoflueno y 36 isómeros diferentes de carotenoides	DAD	(19)

Fase reversa HPLC C₃₀	Modo de elución: Suero Gradiente Eluyente: Metanol/acetonitrilo /agua 84:14:4 y diclotometano	Suero	30 carotenoides, identificación difícil	Espectrometría de masas, APCI (15)
UPLC C₃₀ 150x4,96 mm, 5 µm	Eluyente: MTBE/metanol/0,1 % de ácido fórmico acuoso 78:20:2	Plasma humano	Apo-licopenos	Espectrometría de masas, APCI (11)

6. Conclusión

La técnica de HPLC se muestra eficaz para el análisis de carotenoides principalmente por su sensibilidad, resolución, separación, tiempo necesario de análisis, cantidad requerida de muestra, reproducibilidad, su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su gran aplicabilidad a las muestras en suero.

Las mejores condiciones cromatográficas se obtienen con la fase reversa y la mayoría de los métodos utiliza HPLC de fase reversa con columna C₃₀, principalmente por ser más fácil de usar, por tener una fase hidrofóbica aplicable a un amplio rango de moléculas, por permitir controlar también tipo de disolvente orgánico y por separar isómeros. Este punto es importante porque la separación de isómeros nos abre nuevas puertas de análisis hacia el estudio de los isómeros más beneficiosos o más activos. Las fases móviles más comunes son las combinaciones de disolventes polares como acetonitrilo, metanol, diclorometano, tetrahidrofurano, cloroformo y acetato de etilo. Por otro lado, el mayor problema de HPLC es la dificultad para obtener y preservar los patrones puros de carotenoides.

El detector de UV-Vis acoplado a HPLC, y en concreto el de fotodiodos en línea o diodo array (DAD) ha demostrado ser el más eficaz y sensible en esta determinación, debido a su capacidad para analizar isómeros y a su capacidad de recoger datos de forma continua durante todo el análisis. Suele emplearse en el rango de 400-500nm. También es de gran utilidad la espectrometría de masas (MS) acoplada a HPLC a la hora de identificar a los carotenoides del suero, que se emplea para completar información sobre la estructura molecular y para superar interferencias espectrales que pueda haber en UV-Vis.

7. Bibliografía

1. A.J. Meléndez. Carotenoides en agroalimentación y salud. México, D.F., México: Editorial Terracota; (2017).
2. Burgos Sierra, J. T., & Calderón Rivera, F. R. (2009). Determinación del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de San Salvador (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).

3. Lai, J. F., & Franke, A. A. (2013). Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*
4. Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., & Schwartz, S. J. (2012). Analysis Methods of Carotenoids. In *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals* (pp. 105–148)
5. Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D. Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93.
6. Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018, February 1). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd.
7. O'Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., & Southon, S. (2001). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85(4), 499-507
8. Granado-Lorencio, F., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., & Hernández-Álvarez, E. (2017, September 1). Biomarkers of carotenoid bioavailability. *Food Research International*. Elsevier Ltd.
9. Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.
10. Tan, J., Neo, J., Setiawati, T., & Zhang, C. (2017). Determination of Carotenoids in Human Serum and Breast Milk Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with a Diode Array Detector (HPLC-DAD). *Separations*, 4(2), 19.
11. Rajendran, V., Pu, Y. S., & Chen, B. H. (2005). An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum. *Journal of Chromatography B*, 824(1-2), 99-106.
12. Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2006). Vantagens e desvantagens das colunas C18 e C30 para a separação de carotenóides por CLAE. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(4), 539-546.
13. Karppi, J., Nurmi, T., Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., & Nyssönen, K. (2008). Simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *Journal of Chromatography B*, 867(2), 226-232.
14. Melendez-Martinez, A. J., Stinco, C. M., Liu, C., & Wang, X. D. (2013). A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical

isomers of carotenoids for nutritional studies. *Food chemistry*, 138(2-3), 1341-1350.

15. Gueguen, S., Herbeth, B., Siest, G., & Leroy, P. (2002). An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of μ -tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *Journal of chromatographic science*, 40(2), 69-76.
16. Ferreiro-Vera, C., Mata-Granados, J. M., Gómez, J. Q., & de Castro, M. L. (2011). On-line coupling of automatic solid-phase extraction and HPLC for determination of carotenoids in serum. *Talanta*, 85(4), 1842-1847.
17. De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5062-5072.
18. Yemelyanov, A. Y., Katz, N. B., & Bernstein, P. S. (2001). Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. *Experimental eye research*, 72(4), 381-392.
19. Tyssandier, V., Lyan, B., & Borel, P. (2001). Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1533(3), 285-292.
20. WEB:”<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/11/detectores-empleados-en-hplc/>”