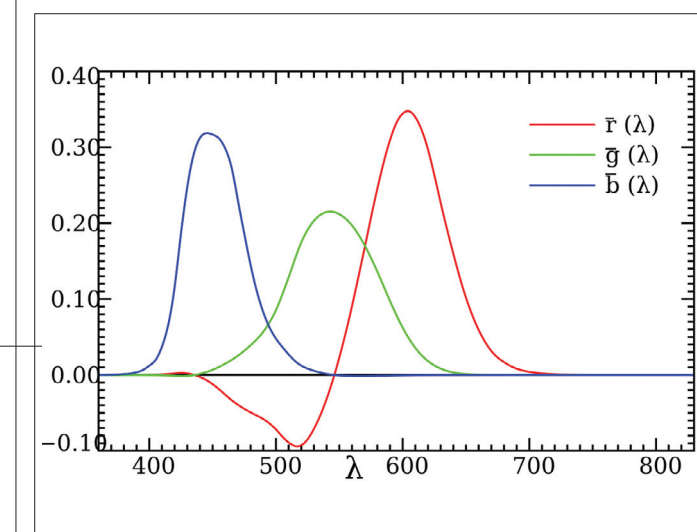


CAPÍTULO 6

APLICACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ESPECTROMETRÍA VISIBLE Y DE COLOR AL ANÁLISIS DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS

Antonio J. Meléndez-Martínez, Isabel M. Vicario y Francisco J. Heredia



INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos tiene un importante efecto psicológico en el consumidor, de ahí su relación bien establecida con la aceptación y el empleo extendido de colorantes en la industria alimentaria. La disponibilidad de métodos apropiados para evaluar este parámetro de calidad es, por consiguiente, una necesidad de esa industria. Aunque la evaluación visual se emplea en el control de calidad de alimentos y es de gran utilidad para algunos fines, los métodos instrumentales objetivos de medida del color ofrecen una serie de ventajas en el control de calidad en distintas fases de la producción, transformación y comercialización de los alimentos. Los carotenoides, son responsables del color de muchos alimentos y se usan como colorantes naturales, tanto individualmente (*e.g.* β -caroteno, licopeno, luteína) como en extractos (*e.g.* annatto, azafrán), si bien, como ya se ha comentado, su importancia va más allá de su papel como pigmentos. En este capítulo discutimos la aplicación de datos espectrométricos y de color en el análisis de carotenoides. Entre otros aspectos, se tratan la relación entre

su estructura química y el color —objetivamente medido— y la utilidad de parámetros de color y de las medidas de absorbancia y reflectancia en el visible para cuantificarlos.

COLOR: DEFINICIÓN Y ATRIBUTOS

Cuando observamos una fuente de luz visible o un objeto iluminado por ella, los bastones (sensibles al blanco y negro) y conos (que responden a los estímulos de rojo, verde y azul) dentro de la retina envían información al cerebro, a través del nervio óptico, que se interpreta en términos de color. El color es por lo tanto un fenómeno psicofísico y complejo, relacionado principalmente con la energía radiante espectral de una fuente de luz visible, la fisiología de la visión y la psicología del observador. La percepción del color de un objeto depende en cierta medida de su composición, aunque esto no significa que el color sea una propiedad inherente del objeto, que puede absorber parte de la luz visible que le llega y reflejar, transmitir o dispersar el resto. De hecho, el color percibido del objeto cambia si cambiamos las características espectrales de la fuente que lo ilumina (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994). Es importante considerar que el color es uno de los componentes de la apariencia de los alimentos más relacionados con la percepción de la calidad, aunque la apariencia es un concepto más amplio que abarca también otros atributos como brillo, forma y textura visual (Francis, 1995; Hutchings, 1994).

Según Francis (1995), el color puede definirse como “el impacto de las longitudes de onda de la luz del espectro visible de 390 a 760 nm en la retina humana”. Es decir, el color puede definirse como una respuesta mental al estímulo que produce una radiación luminosa visible en la retina, que es

transmitida al cerebro por el nervio óptico. Otra definición es la proporcionada por Wyszecki y Stiles (2000); según estos autores el color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir las diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, por las diferencias en la composición espectral de la energía radiante en la observación.

El estímulo colorimétrico se compone de tres sensaciones distintas, aunque a veces hay leves discrepancias con respecto a los términos utilizados para su definición. Estos atributos se denominan generalmente como matiz, luminosidad o brillo y saturación, croma o colorido (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994). Hunt (1998) define tres atributos de las sensaciones visuales, denominadas, brillo, tono y colorido: *a)* brillo es el atributo según el cual un área parece exhibir más o menos luz; *b)* el tono de un color es el atributo de la sensación visual según la cual el estímulo aparece similar a uno de los colores percibidos: rojo, verde, amarillo y azul o a ciertas proporciones de dos de ellos; se considera el atributo cualitativo del color y está relacionado con la longitud de onda dominante del espectro, y *c)* el colorido es el atributo según el cual un área parece exhibir más o menos de su tono.

Además, definió tres términos subjetivos y relativos de la siguiente manera: *a)* luminosidad: brillo de un área evaluado en relación con el brillo de un área similar iluminada que parece blanca o altamente transmisiva, *b)* croma: es el colorido de una zona juzgada en relación con la luminosidad de un área iluminada de forma similar que parece blanca o altamente transmisiva y *c)* saturación: el colorido de una zona juzgado en relación con su brillo.

¿POR QUÉ LOS CAROTENOIDES SON COLOREADOS?

Cuando los electrones de los átomos o de las moléculas absorben un cuanto de energía de la radiación electromagnética se producen transiciones energéticas de un estado de menor energía a otro de mayor energía. La absorción de la radiación ocurre cuando su energía (E) coincide con la diferencia de energía entre los dos estados energéticos. No obstante, no todas las transiciones electrónicas son posibles. La energía de la radiación puede expresarse según la siguiente fórmula:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad [1]$$

donde E es la cantidad de energía, h es la constante de Planck, ν la frecuencia de la radiación, c la velocidad de la luz y λ la longitud de onda.

En las moléculas los núcleos rotan y vibran, por lo que un electrón en su estado basal o excitado puede existir en varios niveles de energía vibracional. A su vez, para cada uno de ellos, son posibles varios niveles de energía rotacional. A diferencia de lo que ocurre con los átomos, en el caso de las moléculas la transición electrónica no tiene un requerimiento energético específico, ya que podría ocurrir por una variedad de cuantos de energía que coincidan con las diferencias de energía entre el estado basal y excitado para los distintos niveles de energía vibracional y rotacional. Por lo tanto, los espectros de absorción de las moléculas contienen bandas de absorción en lugar de líneas, ya que la absorción de la luz ocurre en un rango de longitudes de onda (Britton 1983; 1995).

En el caso de los carotenoides, la transición electrónica relevante se produce entre un orbital molecular pi enlazante (π)

y un orbital molecular pi antienlazante (π^*), tal que uno de los electrones π de la cadena poliénica es ascendido a un orbital π^* previamente desocupado. Debido al hecho de que los electrones π están altamente deslocalizados en el cromóforo de dobles enlaces conjugados (d.e.c.), el estado excitado es de poca energía en comparación con otras moléculas, así que la energía de la radiación visible (ca. 380-770 nm) es suficiente para producir las transiciones electrónicas (Britton, 1983; 1995).

Los carotenoides absorben fundamentalmente luz violeta y azulada (ca. 400-500 nm), por lo que típicamente exhiben tonalidades amarillentas, anaranjadas o rojizas. No obstante la gama de colores de estos isoprenoides puede ampliarse al azul, púrpura y verde mediante la formación de complejos con proteínas (Britton, 1992). Al menos son necesarios siete dobles enlaces conjugados (d.e.c) para que un carotenoide sea coloreado, así los carotenoides más saturados como fitoeno y fitoflueno (con 3 y 5 d.e.c., respectivamente, figura 4, del capítulo 1) son incoloros (Rodríguez-Amaya 2001).

LA IMPORTANCIA DEL COLOR EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El color de los productos alimentarios es de gran interés en la industria debido al efecto psicológico que ejerce sobre los consumidores (véase el capítulo 7). El papel del color en la aceptación de los alimentos va más allá de lo visual, ya que con frecuencia suele estar asociado con otras expectativas sensoriales (como aroma y gusto) (Fernández-Vázquez *et al.*, 2014), de ahí que a veces se hable de sinestesia cromática. También es importante considerar que, en la mayoría de los casos, el consumidor no está familiarizado con la naturaleza

física del color, y que mira el producto como si su color fuese constante y no dependiente de factores como el tipo de luz que lo ilumina. En otras palabras, se puede decir que aunque el color tiene gran importancia en la adquisición o el rechazo de un producto, estas asociaciones también pueden ser engañosas o infundadas en algunas ocasiones.

Según Clydesdale (1993) hay asociaciones alimentos-colores aceptables que se desarrollan a una edad temprana y nos llevan a rechazar ciertos alimentos que no presentan las características colorimétricas esperadas. En este sentido, el color a menudo se relaciona con la seguridad, grado de madurez, estado y grado de cocción y el efecto del procesado industrial o almacenamiento, entre otros factores. El hecho de que los alimentos tengan asociado un color característico está muy relacionado con la generalización del uso de colorantes en la industria, con el objetivo último de hacerlos más atractivos.

El color también es muy importante en relación con la aceptabilidad de los alimentos con base en factores culturales y publicitarios. Por ejemplo, un español rechazará naranjas con áreas verdes en la piel, ya que las considerará inmaduras, mientras que este es el aspecto que se espera de las naranjas maduras en países tropicales. Por otra parte, la publicidad puede llevar a los consumidores a comprar un producto con un color extraño.

ANÁLISIS VISUAL DEL COLOR

En principio, el color de los alimentos puede evaluarse visual u objetivamente mediante instrumentos apropiados y en condiciones adecuadas.

La evaluación visual puede realizarse mediante la comparación de las características colorimétricas de la muestra con las de los elementos contenidos en escalas o atlas de color (sistema DIN, sistema Munsell, sistema OSA-UCS, sistema Ostwald, etc.). Otro ejemplo de este tipo de análisis visual es la comparación del color de los zumos de naranja con los de colores de estándares de plástico desarrollados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2005). Estas colecciones pueden ser útiles en la industria alimentaria para diversos objetivos. Además, son portátiles y estables en cierta medida, aunque estudios recientes han revelado varios problemas en una escala de colores utilizados para el análisis visual de aceite de oliva (Melgosa *et al.*, 2000; Melgosa *et al.*, 2001, Moyano *et al.*, 1999). El análisis visual del color de los alimentos es una herramienta insustituible en la industria alimentaria y se trata en profundidad en el capítulo 7. No obstante, para la evaluación objetiva deben utilizarse métodos instrumentales.

ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL COLOR

La medida y definición objetiva del color es un propósito perseguido desde hace siglos por numerosos científicos como Newton, Young, Helmholtz, Grassmann, Maxwell, Adams, Munsell, Hunter y muchos otros.

Tradicionalmente se han utilizado tres tipos de aparatos para el análisis instrumental del color: colorímetros, espectrofotómetros y espectrorradiómetros.

Los colorímetros miden el color de fuentes de radiación primarias (que emiten luz propia) y secundarias (que reflejan o transmiten luz externa). Estos aparatos poseen filtros de color

que conducen a la obtención directa de los valores triestímulo X, Y, Z de forma óptica, no matemática (Artigas, 2002). El colorímetro reproduce la respuesta de sólo un observador patrón y un iluminante estándar preestablecidos, por lo que los valores obtenidos pueden ser distintos para cada instrumento.

Los espectrofotómetros, en cambio, miden la distribución espectral, de medidas relativas de transmitancia o reflectancia de un objeto a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones teóricas. Los valores triestímulo (X, Y, Z) obtenidos dependen del iluminante, la geometría de la medida y del observador (Hutchings, 1994). Tanto la transmitancia como la reflectancia son propiedades relativas, intrínsecas del objeto, que no se modifican con la iluminación recibida ni con el observador, hecho que sí ocurre con el color. En el espectrofotómetro la medida de la transmitancia es el cociente entre la respuesta del instrumento en presencia de muestra y cuando la muestra no está en el camino óptico.

Los espectrorradiómetros fueron diseñados para la medida radiométrica de la distribución espectral de una fuente de radiación primaria o secundaria (Wyszecki y Stiles, 2000). Al igual que en el caso de los espectrofotómetros, los valores triestímulo se obtienen matemáticamente. El espectrorradiómetro tiene los mismos componentes que el espectrofotómetro con la excepción de la fuente de luz que, en este caso, es externa al instrumento y, por lo tanto, variable. Aunque no es su uso específico, se utilizan también para la medida de la transmitancia o reflectancia de una muestra, modificando la posición relativa de la fuente de iluminación.

Aparte de estos instrumentos clásicos existen otros, como por ejemplo aparatos que llevan a cabo un análisis digital de imágenes. Esta técnica de análisis de imágenes se ha

usado para muchos fines, entre ellos para evaluar el color de tomates y productos derivados en relación con su contenido de licopeno (Stinco *et al.*, 2013).

Como resultado de las medidas instrumentales el color puede definirse numéricamente, para lo cual las características de los tres componentes que intervienen en el proceso (fuente de luz visible, objeto y observador) y otras condiciones (como ancho de banda y las geometrías de iluminación y observación, entre otros) deben tomarse en cuenta y definirse (Wyszecki y Stiles, 2000; Hutchings, 1994).

La colorimetría es la disciplina que se ocupa de la especificación numérica de un estímulo visual definido de tal forma que (Wyszecki y Stiles, 2000):

a) Estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con la visión normal de los colores. Es decir, existe una perfecta igualación de color (*colour matching*); b) estímulos que aparecen iguales tienen la misma especificación, y c) los números que especifican el estímulo son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de la energía radiante espectral del mismo.

Las leyes experimentales de igualación de color se resumen en el principio conocido como “generalización tricromática”. Este principio establece que bajo un amplio rango de condiciones de observación, muchos estímulos de color pueden igualarse por mezclas aditivas de tres estímulos primarios, cuyas energías radiantes han sido previamente ajustadas y fijadas (Wyszecki y Stiles, 2000). Las leyes aplicables a la generalización tricromática se pueden expresar geométricamente por medio de un espacio tridimensional

denominado espacio triestímulo. En este espacio, cada estímulo de color puede ser representado por medio de un vector que expresa las cantidades proporcionales de los estímulos primarios rojos, verdes y azules que lo originan (Wyszecki y Stiles, 2000).

La Comisión Internacional de Iluminación (CIE, por sus siglas en francés) ha propuesto progresivamente diferentes espacios de color (CIEXYZ, CIELUV, CIELAB), observadores (observador de referencia colorimétrica CIE 2° y CIE 10°) e iluminantes (A, B, C, D₆₅, D₇₅, D₅₅) y de las ecuaciones de color básico y el concepto original de espacio triestímulo (Wyszecki y Stiles, 2000). Como resultado, cada estímulo de color puede definirse numéricamente y representarse en un espacio de color.

Actualmente, el espacio de color más utilizado es CIELAB (CIE, 1978). Los parámetros de este espacio son los siguientes: a) L* es una estimación de la luminosidad relativa; según este parámetro cualquier color puede considerarse equivalente a un miembro de la escala de grises, entre el negro (L* = 0) y el blanco (L* = 100); b) a* toma valores positivos para los colores rojizos y valores negativos para los verdosos, y c) b* toma valores positivos para los colores amarillentos y valores negativos para los azulados.

Estos parámetros se relacionan matemáticamente con los valores triestímulo X, Y, Z.

A partir de los parámetros colorimétricos a* y b* se definen los parámetros psicométricos, croma (C*_{ab}) y tono (h_{ab}): C*_{ab} permite determinar para cada tono su grado de diferencia en comparación con un color gris de la misma luminosidad y se relaciona con el atributo cuantitativo de colorido. Tono (h_{ab}) es el atributo según el cual los colores han sido tradicionalmente

definidos como rojizos, verdosos, etc. Es considerado el atributo cualitativo de colorido.

Matemáticamente, estos parámetros psicométricos se definen como sigue:

$$C_{ab}^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad [2]$$

$$h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad [3]$$

Estos parámetros definen un espacio de color uniforme en el que se puede representar cada estímulo visual. En la figura 2

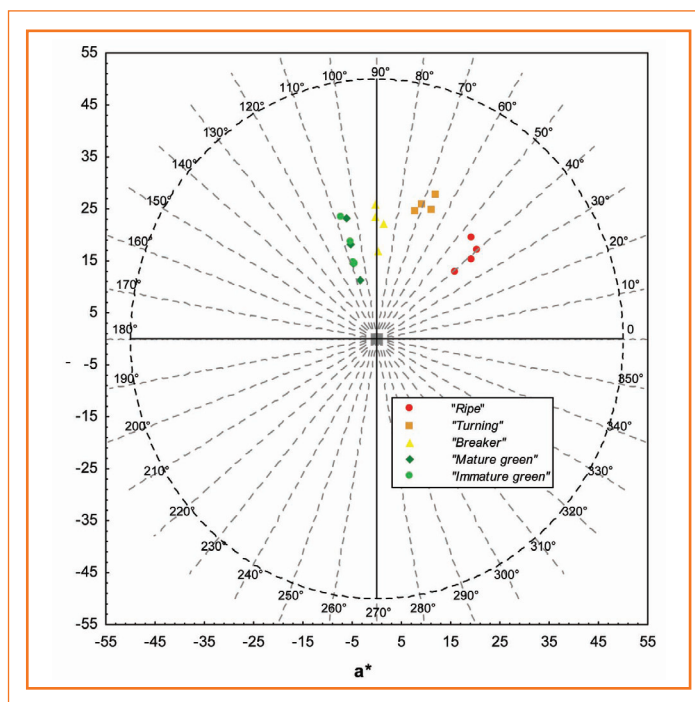


FIGURA 1. Distribución de muestras de tomate en distintos estados de desarrollo en el plano a* b*.

se presenta la distribución de diferentes muestras de tomate en distintos estados de desarrollo en el plano $a^* b^*$.

Las diferencias de color en el espacio CIELAB se han calculado tradicionalmente aplicando la siguiente fórmula:

$$\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [4]$$

De igual forma, las diferencias en los parámetros de color en este espacio se pueden calcular de la siguiente manera:

$$\Delta L^* = L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{estándar}} \quad [5]$$

$$\Delta a^* = a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{estándar}} \quad [6]$$

$$\Delta b^* = b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{estándar}} \quad [7]$$

$$\Delta C^* = C^*_{\text{muestra}} - C^*_{\text{estándar}} \quad [8]$$

Para entender las diferencias de color como la suma de sus componentes angulares (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}) y poder expresarlo aritméticamente como la suma de ellos, un nuevo parámetro relacionado con la diferencia de tono se define de la siguiente forma:

$$\Delta H^* = (\Delta E^{*2} - \Delta L^{*2} - \Delta C^{*2})^{1/2} \quad [9]$$

VENTAJAS DE LA EVALUACIÓN OBJETIVA DEL COLOR

La principal ventaja de la evaluación objetiva instrumental del color en relación con los métodos visuales es que se puede eliminar el inevitable componente subjetivo de estos últimos. De esta manera, se facilita la comunicación entre científicos, técnicos, productores, fabricantes, proveedores y compradores. Además, la medida instrumental de color ofrece una serie de ventajas que la hacen una herramienta apropiada para el control de calidad en la industria agroalimentaria, en el campo o en el mercado. Algunas de éstas son las siguientes:

- Simplicidad: aunque los conceptos físicos y matemáticos subyacentes a los conceptos básicos de colorimetría son complejos, el manejo de instrumentos para el análisis de color es sumamente sencillo. De hecho, cualquier persona se puede entrenar para su uso en un corto tiempo.
- Fácil interpretación de los resultados: aunque existen diferencias sutiles en el significado de los atributos de color (como los enumerados en la primera sección) la interpretación de los parámetros de color del espacio CIELAB es bastante sencilla.
- Asequibilidad: hay una gran variedad de instrumentos que se adaptan a cada necesidad y muchos de ellos son asequibles para casi cualquier departamento de control de calidad.
- Rapidez: las lecturas de color se pueden hacer en segundos.

- La mayoría de las mediciones de color no requieren la manipulación de la muestra en absoluto. En otras ocasiones es mínima (filtración, homogeneización).
- Portabilidad: existe una gran variedad de instrumentos portátiles.
- Posibilidad de automatización: algunos aparatos ofrecen la posibilidad de realizar las lecturas automáticamente a intervalos de tiempo definibles, lo cual puede usarse para llevar a cabo un control en línea del color de los alimentos.
- Versatilidad: la instrumentación de color puede adaptarse para llevar a cabo diferentes tipos de mediciones (transmisión, reflexión, dispersión, etc.).
- Volumen de información: en cuestión de segundos pueden obtenerse cientos de datos colorimétricos y espectrométricos. Es decir, se genera una gran cantidad de datos, de la cual se puede extraer información mediante tratamientos estadísticos apropiados.

POSIBLES APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE PIGMENTOS EN LOS ALIMENTOS

El color de los alimentos se debe fundamentalmente a los pigmentos que contienen. Por lo tanto es razonable pensar que tanto los datos de espectrometría visible como los parámetros de color obtenidos a partir de ellos pueden ser útiles para su determinación. Es lógico pensar que la cantidad de luz absorbida por un alimento se puede correlacionar con la cantidad de pigmentos que contiene. Asimismo, el tipo de luz

absorbida, que depende de las características de los cromóforos de los pigmentos, podría ser útil para su análisis cualitativo.

Las características y ventajas de las medidas instrumentales de color de los alimentos son muy interesantes no sólo para el control de calidad del color, sino también para la evaluación del contenido de pigmentos. Así, por ejemplo, el análisis por triplicado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de una muestra de zumo o jugo de naranja para determinar su contenido de carotenoides requiere no menos de dos horas, ya que los carotenoides deben ser extraídos, saponificados y analizados. Además tales operaciones implican un riesgo importante de degradación (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Por el contrario, por medio de medidas de color podríamos obtener una estimación quizá algo menos precisa pero de forma casi instantánea del contenido de carotenoides del zumo (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

En relación con todo esto parece razonable afirmar que la medida instrumental del color de los alimentos en combinación con métodos estadísticos apropiados podría ser útil para:

- El análisis cuantitativo y cualitativo de pigmentos. La evaluación rápida de los pigmentos a través de los parámetros de color tendría muchas aplicaciones en la industria alimentaria, en el campo y en el mercado. Además, puede ser útil en disciplinas como la ciencia de los alimentos, de las plantas o ciencias agrícolas, entre otras, donde a veces es necesario analizar grandes poblaciones de muestras.
- Evaluar etapas de desarrollo en función del contenido de pigmentos, ya que la degradación de la clorofila y el aumento en la biosíntesis de otros pigmentos es una

característica del proceso de maduración de los frutos.

- Evaluar los cambios cuantitativos y cualitativos de pigmentos como resultado del procesado o del almacenamiento, entre otros factores. Esto podría ser útil para optimizar dichos procesos o para determinar la vida útil de los productos.
- Clasificar los alimentos según su calidad con base en su contenido de pigmentos-color puesto que el color es un atributo clave de calidad y algunos pigmentos tienen importancia nutricional.
- Evaluar algunas propiedades de los alimentos relacionadas con los pigmentos que contienen, de forma más rápida y sencilla. Dos ejemplos serían la actividad

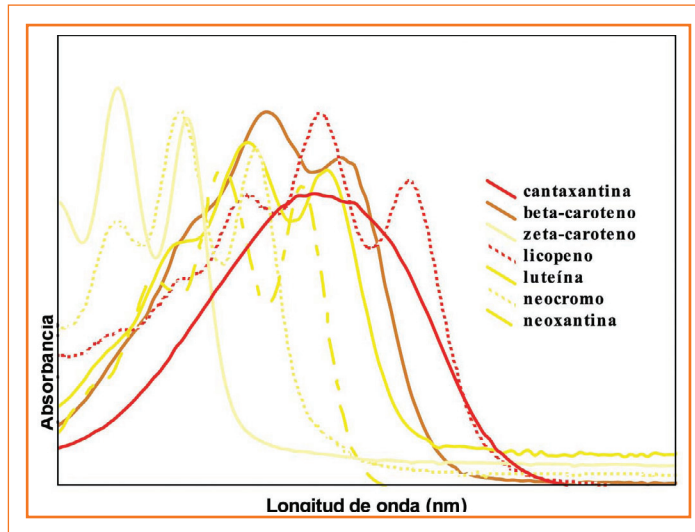


FIGURA 2. Detalle de los espectros visibles en acetona de cantaxantina, β -caroteno, ζ -caroteno, licopeno, luteína, neocromo y neoxantina.

teórica como vitamina A en alimentos que contengan carotenoides provitamínicos y la capacidad antioxidante *in vitro* de alimentos o formulaciones que contengan ciertos pigmentos. Con respecto a este último aspecto, hay que considerar que la actividad antioxidante *in vivo* de algunos pigmentos y sus posibles mecanismos de actuación son temas aún controvertidos. En este sentido la valoración de la capacidad antioxidante *in vitro* podría estar de alguna manera relacionada con la estabilidad de los productos o su valor como ingredientes funcionales, pero no es extrapolable a la actividad antioxidante *in vivo*.

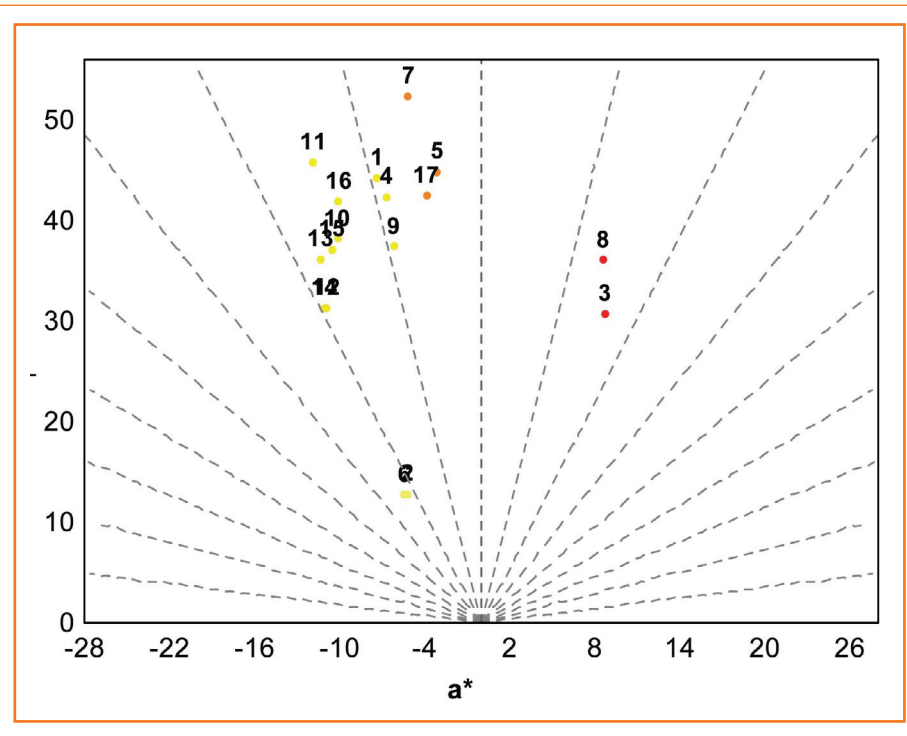
RELACIONES COLOR-CAROTENOIDES

Relaciones estructura-espectro visible de los carotenoides

La relación entre la estructura química de los carotenoides, la localización de sus máximos de absorción visible ($\lambda_{\text{máx}}$) y la forma de los espectros es bien conocida y ha sido tratada en detalle en el capítulo 1. El examen de las características espectroscópicas es muy útil para propósitos analíticos (Britton, 1995).

Relaciones estructura-color de carotenoides

Las relaciones entre las estructuras químicas de los carotenoides y sus espectros de absorción son bien conocidas, como ya se ha indicado. Sin embargo aún hay mucho por hacer en lo que se refiere al estudio del efecto que las modificaciones de los carotenoides tienen en el color de alimentos u otras matrices. Por ejemplo,



también puede ser útil para detectar estos cambios visuales. La evaluación instrumental de color de 16 carotenoides alimentarios en soluciones de acetona a la misma concentración ayudó a obtener interesantes observaciones en esta sentido (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). En la figura 2, se muestran los espectros de absorción visible de algunos de los carotenoides evaluados.

La representación de los datos en el plano a^*b^* (figura 3) mostró que los pigmentos cíclicos anaranjados y amarillentos analizados se agruparon claramente según el número d.e.c. en sus cromóforos en el segundo cuadrante (valores negativos a^* y valores positivos b^*).

Se observó una disminución del valor de a^* desde los carotenoides con 11 d.e.c. (β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina) a los de 10 d.e.c. (α -caroteno, luteína y anteraxantina) y 9 d.e.c. (violaxantina, neoxantina luteína epóxido y mutatoxantina). Los carotenoides con 8 d.e.c. (luteoxantina y neocromo) presentaron valores de a^* similares a aquellos con 9 d.e.c., aunque bajos valores de b^* , que indican cierta pérdida de color amarillo. Los pigmentos con 7 d.e.c. (auroxantina y ζ -caroteno) mostraron valores de a^* similares a aquellos con 10 d.e.c., pero valores de b^* mucho más bajos que en los restantes grupos.

Los dos carotenoides rojizos analizados, el acíclico licopeno (11 d.e.c.) y cantaxantina (contiene 13 d.e.c., cuatro de ellos endocíclicos) estaban claramente separados del resto en el primer cuadrante (valores positivos de a^* y b^*). Los valores de tono de los carotenoides de color rojizo fueron aproximadamente 75° , mientras que los correspondientes a los restantes pigmentos estudiados oscilaron entre aproximadamente 94° y 113° .

FIGURA 3. Representación de los valores de a^* y b^* de disoluciones de carotenoides en el plano a^*b^* . 1. Anteraxantina; 2. Auroxantina; 3. Cantaxantina; 4. α -Caroteno; 5. β -Caroteno; 6. ζ -Caroteno; 7. β -Criptoxantina; 8. Licopeno; 9. Luteína; 10. Luteína epóxido (1); 11. Luteína epóxido (2); 12. Luteoxantina; 13. Mutatoxantina; 14. Neocromo; 15. Neoxantina; 16. Violaxantina; 17. Zeaxantina.

durante el procesado y almacenamiento de los alimentos que contienen carotenoides pueden ocurrir cambios que afectan su cromóforo, como por ejemplo reordenamientos de carotenoides 5,6-epóxido a carotenoides 5,8-furanoides o rupturas oxidativas, entre otros. Esta información puede ser muy valiosa para hacer un seguimiento rápido de estos cambios por medio de medidas instrumentales de color. La traducción de la información espectrométrica (como por ejemplo desplazamientos hipsocrómicos y batocrómicos, efectos hipocrómicos o hiperocrómicos) en información de color (cambios en los valores de croma o tono, por ejemplo)

En cuanto a los valores de croma, todos los pigmentos estudiados presentaron valores entre 31-53 unidades CIELAB, excepto los carotenoides con 7 d.e.c., con valores notablemente inferiores (alrededor de 14 unidades CIELAB) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Sobre el efecto de la isomerización de 5,6-epóxidos a 5,8-furanoides en su color, se observó que como resultado de la reordenación de un grupo 5,6-epóxido en anteraxantina, neoxantina y violaxantina para dar mutatoxantina, neocromo y luteoxantina, respectivamente, se produjo una disminución en los valores de a^* , b^* , C_{ab}^* y aumentos en el h_{ab} . No obstante, la conversión del grupo restante 5,6-epóxido en luteoxantina para dar auroxantina produjo un incremento de en a^* y h_{ab} y marcadas disminuciones de C_{ab}^* y b^* (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Recientemente se ha estudiado el efecto de la epoxidación y la rotura oxidativa del β -caroteno en los parámetros de color, observándose que ambas reacciones conducen a importantes descensos en los valores de b^* y C_{ab}^* . Eso indica que estos parámetros pueden ser útiles para monitorear la oxidación mediante estos mecanismos de este carotenoide provitamina A (Gurak *et al.*, 2014).

Efectos de cambios químicos en el color de los carotenoides

Los efectos de distintos tratamientos y condiciones de almacenamiento sobre el contenido de carotenoides y el color de los alimentos han sido estudiados por varios autores. Por ejemplo, Cortés *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la pasteurización en diferentes condiciones y mediante pulsos

eléctricos de alta intensidad (PEAI) sobre el color y el perfil de carotenoides del zumo de naranja. Los tratamientos PEAJ provocaron menores disminuciones en el contenido de carotenoides que la pasteurización, y los cambios en el contenido de pigmentos estuvieron acompañados de disminuciones en a^* y aumentos en b^* . Además, indicaron que los tratamientos podrían conducir a cambios de color visualmente perceptibles por los consumidores.

Chen, Peng y Chen (1995) evaluaron los cambios en el perfil de carotenoides y el color de zumos de zanahoria sometidos a diferentes condiciones de procesado y observaron isomerizaciones Z/E que, en algunos casos, estuvieron acompañadas de cambios en el tono de naranja a amarillo.

Más recientemente, en un zumo modelo de manzana de acajú (*Anacardium occidentale*) sometido a diferentes tratamientos térmicos se observaron importantes cambios de color provocados fundamentalmente por isomerizaciones (Z/E y de grupos 5,6 epóxidos a 5,8-furanoides) y oxidaciones en los carotenoides (Zepka y Mercadante, 2009; Zepka *et al.*, 2009).

Las isomerizaciones de carotenoides 5,6-epóxido a 5,8-furanoides (figura 4) están causadas por condiciones ácidas y se ven favorecidas en algunos alimentos, como los zumos de cítricos, una vez que se pierde la compartimentación celular. En este sentido, se han observado cambios de color, algunos de los cuales son visualmente perceptibles, como consecuencia de la progresiva isomerización de anteraxantina y violaxantina a sus isómeros 5,8-furanoides (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2009; Melendez-Martínez *et al.*, 2010).

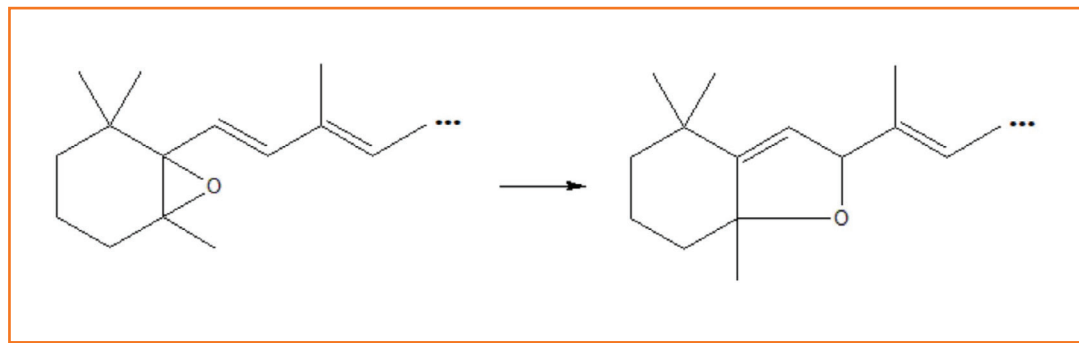


FIGURA 4. Isomerización del grupo 5,6-epóxido (izquierda) a 5,8-furanoide (derecha).

Estimación del contenido de carotenoides a partir de medidas de absorbancia-reflectancia y de color

Existe una gran variedad de estudios sobre el color y el contenido de carotenoides de diversos alimentos como los frutos cítricos (Lee y Castle, 2001; Shim y Kim, 2002; Cortés *et al.*, 2006, Beltrán González *et al.*, 2008; Van Wyk, Huysamer y Barry, 2009), zanahorias (Bao y Chang, 1994; Chen, Peng y Chen, 1995), tomates (Heredia *et al.*, 2009; Meléndez-Martínez *et al.*, 2010) y otros (Pérez-López *et al.*, 2007; Gómez-Ladrón de Guevara *et al.*, 1996; Cano *et al.*, 1996). No obstante, en algunos casos las relaciones entre ambos no han sido estudiadas en profundidad.

Determinación de carotenoides a partir de medidas de absorbancia

La absorción visible intensa de los carotenoides también es la base para su análisis cuantitativo, aspecto que se trata en el capítulo 1.

La exactitud en la cuantificación de carotenoides depende de la exactitud de los coeficientes de absorción. Para su determinación se recomienda pesar entre 1 y 2 mg del pigmento puro (con una exactitud de ± 0.001 mg.) y disolverlos completamente en un disolvente apropiado (Britton, 1995), algo que no es tan simple como podría parecer, sobre todo si los carotenoides

están cristalizados, por lo que el contenido de carotenoides a menudo se subestima (Britton, 1992). De todo esto, se puede deducir fácilmente que el análisis cuantitativo de los carotenoides implica cierto grado de inexactitud. En este sentido, también es importante tener en cuenta que los coeficientes de absorción de los isómeros *Z* son notablemente más bajos que los correspondientes a sus homólogos (todo-*E*). No obstante, pocos se han determinado experimentalmente hasta la fecha (Britton, Liaaen-Jensen y Pfander, 2004), así que la cuantificación de estos isómeros mediante el uso de los coeficientes correspondientes a los isómeros todo-*E*, implica un mayor nivel de imprecisión.

Por otra parte, cuando no se ha determinado experimentalmente el coeficiente de absorción específico ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de un carotenoide o se pretende evaluar la concentración de un extracto de carotenoides, se suele emplear un valor arbitrario de 2500 (Britton y Young, 1993). Sin embargo, este procedimiento lleva a una subestimación notable de estos pigmentos en el caso del zumo de naranja (Meléndez-Martínez, 2005) y probablemente de otros muchos productos.

Además de la metodología clásica a la que nos hemos referido en este apartado y en el capítulo 1, se han propuesto otras para algunas aplicaciones. Así, cabe mencionar la descrita por Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera (2001), quienes desarrollaron un método espectrofotométrico útil y rápido para la estimación de las fracciones de carotenoides rojizos y amarillentos en productos del pimiento rojo, mediante la aplicación de la ley Lambert-Beer para mezclas complejas, y considerando las lecturas a dos longitudes de onda (472 y 508 nm).

Más recientemente, se ha propuesto una metodología para estimar el contenido de carotenoides de zumo de naranja considerando los valores de reflectancia a cinco longitudes de onda seleccionadas (420, 455, 515, 545 y 610 nm o 420, 445, 510, 545 y 605, según las condiciones de medida) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010). Además de considerar varias λ , la novedad principal de esta metodología es que la valoración del contenido de carotenoides se hace considerando valores de reflectancia medidos directamente en el producto, no en el extracto de carotenoides. Para este fin, se aplicó el método del vector característico (Lebart *et al.* 1985) a fin de obtener 5 longitudes de onda a partir de las cuales se podrían reconstruir los espectros visibles de los zumos con una buena exactitud para evaluar su color (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010).

Correlación entre contenido de carotenoides y parámetros de color en diferentes alimentos

La cuantificación de carotenoides a partir de un extracto por medidas espectrofotométricas ha sido un método habitual durante muchos años. Dos desventajas de este procedimiento son la poca exactitud de los coeficientes de extinción empleados y que se utiliza la información espectrométrica de

un único punto, aunque el espectro de absorción visible de la mayoría de los carotenoides presenta bandas de absorción en un intervalo de unos 40 nm.

Sin embargo, los valores triestímulos de CIE X, Y, Z (a partir de los cuales se obtienen los parámetros de color de otros espacios, como ya se ha mencionado) se calculan considerando el espectro visible completo de una muestra, entre otros datos. Por lo tanto, es razonable pensar que los parámetros de color de un alimento pueden utilizarse para evaluar su contenido de pigmentos, ya que éstos son los principales responsables del espectro visible.

La utilidad de las coordenadas de color para estimar el contenido de licopeno en diferentes productos del tomate está bien documentada. D'Souza, Singha e Ingle (1992) concluyeron que tanto a^* como L^* se correlacionaban bien con los niveles de pigmentos, aunque las mejores correlaciones se obtuvieron considerando el parámetro $(a^* / b^*)^2$. En un interesante estudio Arias *et al.* (2000) llegaron a la conclusión de que el contenido de licopeno del tomate podría estimarse con base en los parámetros a^* , a^* / b^* y $(a^* / b^*)^2$. En otro estudio se concluyó que los valores de tono de diferentes tomates medidos en homogeneizados eran mejores indicadores de su contenido de licopeno que los medidos en la región ecuatorial (Thompson *et al.*, 2000). Más recientemente se ha estimado el contenido de licopeno de zumos y frutos de tomate a partir de los parámetros de color obtenidos con dos diferentes instrumentos, aplicando estadística multivariante y considerando diferentes modelos lineales (Fernández-Ruiz *et al.*, 2010). Asimismo se ha estimado el contenido de licopeno en tomates y derivados usando análisis digital de imágenes, como se comentó (Stinco *et al.*, 2013).

El color de los aceites de oliva se debe tanto a clorofilas (principalmente feofitina a) y carotenoides (sobre todo β -caroteno y luteína) (Moyano *et al.*, 2010) y se ha comprobado que los niveles de estos pigmentos presentan una alta correlación ($r > 0.8$) con los parámetros del espacio CIELAB en varios aceites de oliva de diferentes variedades y etapas de maduración. Por ejemplo, se encontraron altas correlaciones ($r > 0.8$) entre la clorofila y el contenido total de pigmentos de las muestras y el parámetro a^* . Asimismo, se encontró buena correlación entre la fracción de carotenoides y los parámetros de color b^* y C_{ab}^* ($r > 0.95$). Además, también se encontraron valores de $r > 0.8$ entre los pigmentos (considerados en conjunto o por separado) y dos índices color, C_{ab}^* / L^* y b^* / L^* (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991). Más recientemente, en un estudio en el que se analizaron 1700 muestras de ocho variedades de aceitunas españolas en diferentes etapas de maduración se observó que las mejores correlaciones se encontraban entre este índice y C_{ab}^* y b^* (Moyano *et al.*, 2008, 2008a), lo que concuerda con los resultados publicados por Mínguez-Mosquera *et al.* (1991). Una conclusión importante de los dos estudios de Moyano *et al.*, (2008, 2008a) es que, teniendo en cuenta la información de color completa y la aplicación de métodos estadísticos multivalentes apropiados es posible obtener ecuaciones que permitan predecir el contenido de pigmentos a partir de los parámetros de color.

El color del zumo de naranja ha sido objeto de un gran número de estudios, sobre todo en Estados Unidos (Meléndez-Martínez *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios enfocados a estudiar la relación de este atributo con los carotenoides, considerados individualmente o en conjunto, han aparecido en los últimos 15 años. En este sentido, Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia (2003) encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido

de los principales carotenoides del zumo de naranja y los parámetros de color b^* , C_{ab}^* y h_{ab} . Además, mediante métodos de estadística multivariante obtuvieron ecuaciones que permitieron determinar los contenidos de carotenoides individuales a partir de información colorimétrica. Para ello, se consideraban los conjuntos de parámetros L^* , a^* , b^* y L^* , C_{ab}^* y h_{ab} para tomar en consideración la información colorimétrica completa. En un estudio posterior Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia (2007) concluyeron que los parámetros mejor correlacionados con el contenido total de carotenoides de zumo de naranja ultracongelado eran b^* y C_{ab}^* . Los resultados de estos dos estudios son útiles para ilustrar con un caso práctico la importancia de las relaciones entre el contenido del pigmento y los parámetros de color. Así, del primer estudio (Meléndez-Martínez *et al.*, 2003) se puede inferir que los niveles de carotenoides del zumo de naranja considerados individualmente se correlacionan bien con los atributos cuantitativos (C_{ab}^*) y cualitativos (h_{ab}) del color. El tono está estrechamente relacionado con el tipo de radiación visible absorbida por el pigmento que, a su vez, está determinado principalmente por su cromóforo. Sin embargo, cuando los carotenoides del zumo se consideran en conjunto, el atributo cuantitativo de color sigue siendo un buen predictor del contenido de carotenoides, mientras que el tono no lo es, cuando, como en este caso, se consideran juntos pigmentos con cromóforos de diversa estructura. En lo referente a la utilidad de los parámetros de color para estimar el contenido total de carotenoides en zumos Zulueta, Esteve y Frígola (2007) analizaron 17 zumos comerciales y bebidas a base de leche y encontraron buenas correlaciones de ese parámetro con a^* y b^* ($r > 0.75$).

Se han realizado otros estudios sobre la correlación entre el color y el contenido de carotenoides en batatas (Takahata,

Noda y Nagata, 1993; Ameny y Wilson, 1997), productos de zanahoria (Chen y Tang, 1998), albaricoques (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008), mangos (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2008, Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005) y cereales (Humphries, Graham y Mares, 2004). En lo referente a los estudios sobre batatas, Takahata, Noda y Nagata (1993) encontraron que el contenido de β -caroteno de variedades con la pulpa naranja estaba bien correlacionado con L^* , a^* y b^* . Asimismo propusieron la estimación de los niveles de β -caroteno a partir de los valores de a^* como una herramienta útil para el control de calidad en la producción. Contrariamente, Ameny y Wilson (1997) encontraron que el valor Hunter b correlacionaba mucho mejor que a^* con el contenido de β -caroteno de diversos productos de batata. Puesto que el carotenoide provitamínico β -caroteno es el principal carotenoide de las batatas (Huang, Tanudjaja y Lum, 1999, Van Jaarsveld *et al.*, 2006; Kidmose *et al.*, 2007), se puede pensar que es posible obtener una buena estimación de la hipotética actividad vitamínica A de estos productos a partir de medidas de color. Sin embargo, este aspecto se tratará más adelante.

El valor de b de Hunter también se ha correlacionado con los cambios en carotenoides en residuos de pulpa de zanahoria almacenada en diferentes condiciones (Chen y Tang, 1998). Los niveles de carotenoides coloreados individuales y totales también se correlacionan bien con los parámetros de color (sobre todo a^* y h_{ab}) en albaricoque (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que el tono y los valores de a^* en mangos son parámetros útiles para obtener información rápida sobre su contenido de carotenoides (Ornelas-Paz, Yahia y Gardea, 2008; Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005). Por otro lado, en un estudio en el que se analizaron diversos tipos de pan y de variedades de trigo durum y triticale, se obtuvieron altas correlaciones entre b^* y los niveles de

carotenoides en muchas muestras, proponiéndose ecuaciones para estimar el contenido de estos pigmentos a partir de dicha coordenada de color (Humphries, Graham y Mares, 2004). Los resultados de este estudio son útiles para seleccionar de una manera más rápida y eficiente variedades con altos niveles de carotenoides para su cultivo.

Aunque muchos de los estudios en los que se investiga la relación entre el contenido de carotenoides y el color de los alimentos se han realizado en alimentos vegetales, los hay también en los que se han evaluado alimentos de origen animal. Por ejemplo, se ha empleado un índice de color para estimar el contenido en carotenoides de leche de vaca (Calderón *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2007a). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre alimentos de origen animal se han realizado en pescados. Estos estudios son especialmente numerosos en el caso de peces de la familia de los salmónidos, en los que el color rojo del músculo es considerado un importante atributo de calidad. Como se podía esperar, el color de los filetes (principalmente debido a cetocarotenoides rojizos como astaxantina y cantaxantina, figura 5) se correlaciona bien con a^* (Skrede y Storebakken, 1986; Skrede, Storebakken y Nås, 1990; Ando *et al.* 1992). Además, también se ha propuesto la calibración multivariante de datos de espectrometría visible como un procedimiento apropiado para estimar niveles de carotenoides en trucha arcoiris (Ronsholdt y McLean, 2001). Otro importante hallazgo de estos autores es que la aplicación de la teoría de Kubelka-Munk puede ser útil para eliminar la información espectral de origen físico, es decir, no debida a los pigmentos.

En un exhaustivo estudio en el que se analizaron los datos de 376 muestras de peces alimentados con astaxantina se encontraron relaciones no lineales entre los parámetros de

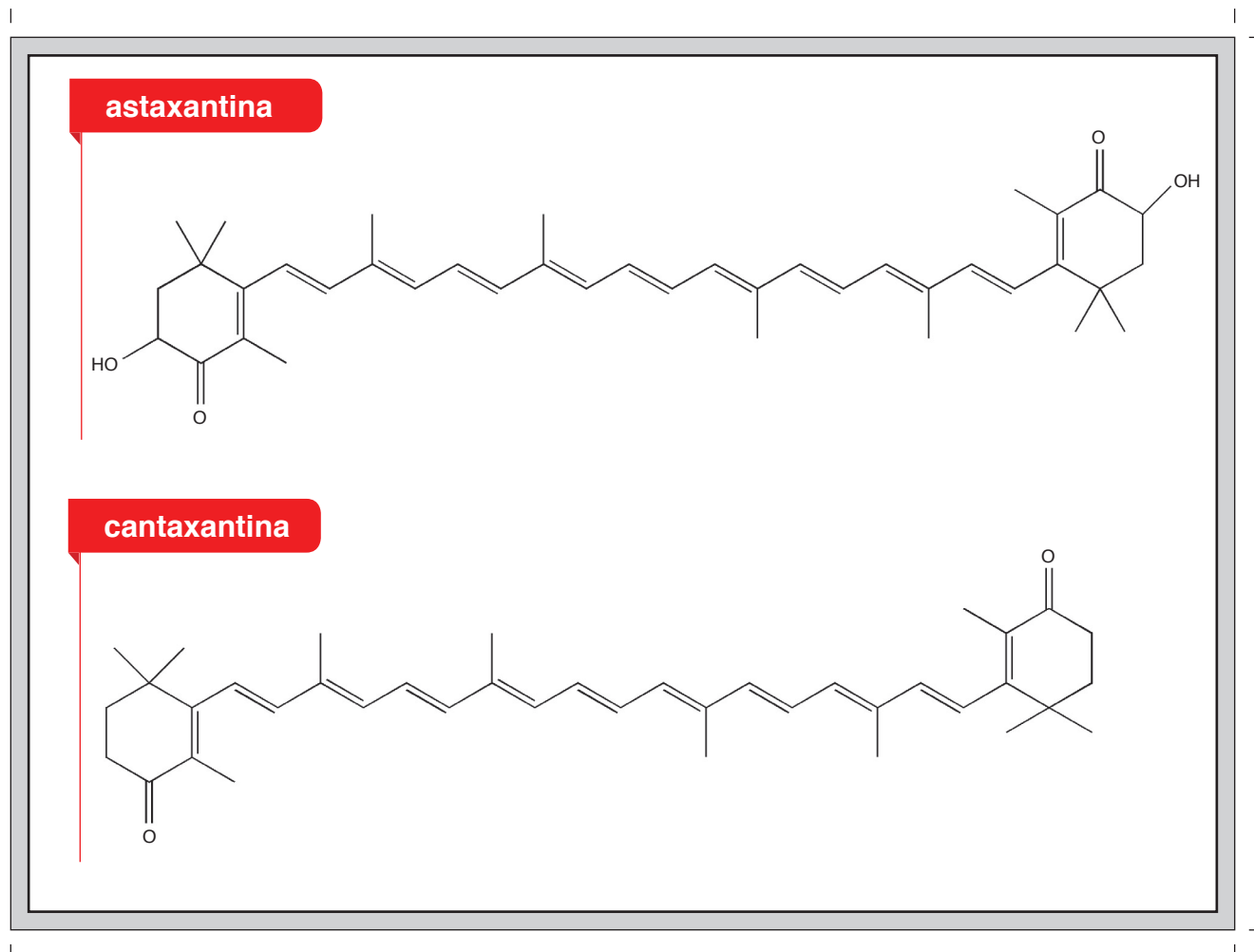


FIGURA 5. Estructuras químicas de cantaxantina y astaxantina.

color y los niveles de carotenoides (Hatlen, Jobling y Bjerkeng, 1998). Los autores observaron que el color de los peces puede verse afectado por factores como las condiciones de cría, el origen genético y el estado reproductivo. Por otra parte, en una interesante discusión proponen como hipótesis que las diferencias en el color de los filetes podrían estar relacionadas

tanto con sus propiedades químicas como físicas y concluyen, entre otras cosas, que otros componentes del músculo distintos de los lípidos (especialmente agua y proteínas) deben tenerse en cuenta, junto con el contenido de carotenoides, para explicar las diferencias de color en el conjunto de muestras estudiadas.

Utilidad de los parámetros de color para estimar la potencial actividad de los carotenoides

De los estudios mencionados, se concluye que es posible determinar los niveles de carotenoides y pigmentos, en general, a partir de los datos de espectrometría visible y de color. Dado que algunos carotenoides (unos 60 de los 700 descritos hasta ahora) presentan actividad como vitamina A y se ha demostrado que muchos tienen actividad antioxidante *in vitro*, es razonable pensar que las medidas de color en alimentos que contienen carotenoides podrían utilizarse también para evaluar de forma rápida tanto la hipotética actividad vitamínica como la capacidad antioxidante.

Sin embargo, en este punto es conveniente hacer hincapié en el hecho de que, obviamente, estos valores (ya sean equivalentes de actividad de retinol, unidades internacionales, capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, etc.) no son extrapolables a condiciones *in vivo*. En este sentido, es importante considerar que la actividad biológica depende de muchos factores, como la biodisponibilidad y la bioconversión, que a su vez dependen de muchos factores (matriz del alimento, interacciones, estado nutricional y de salud, envejecimiento, variabilidad interindividual, etc.) (Faulks y Southon, 2005; Yeum y Russell, 2002). En lo referente a la

actividad antioxidante de estos compuestos, hay que advertir que los mecanismos subyacentes no están totalmente dilucidados. Por su naturaleza lipofílica los carotenoides se encuentran en ambientes lípidicos, como las membranas celulares, donde pueden interactuar con diversos electrófilos según su estructura química y su orientación (Woodall, Britton y Jackson, 1997; Woodall *et al.*, 1997). Asimismo, estudios recientes apuntan a que la actividad antioxidante *in vivo* de los carotenoides o sus metabolitos también puede deberse a la inducción de procesos mediados por enzimas s (Ben Dor *et al.*, 2005; Lian y Wang, 2008).

La utilidad de la información de color para hacer una estimación de la hipotética actividad como vitamina A de diversos alimentos, como zumos de naranja (Meléndez-Martínez, Vicario y Heredia, 2003, Meléndez-Martínez *et al.*, 2007), cereales (Humphries, Graham y Mares, 2004), mangos (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2005) y albaricoques (Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008) ha sido propuesta por varios autores. Por otro lado, en un estudio preliminar en el que se evaluó la capacidad antioxidante de extractos lipofílicos de tomate frente al catión radical ABTS, se ha constatado que los valores TEAC están correlacionados con las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y L^* , C^*_{ab} , h_{ab} ($R = 0.839$ y 0.838 , respectivamente) (Stinco *et al.*, 2010).

REFERENCIAS

- Ameny, M.E. y Wilson, P.W. 1997. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 301-306.
- Ando, S., Yamauchi, H., Hatano, M. y Heard., W.R. 1992. *Aquaculture* 103: 359-365.
- Arias, R., Lee, T.C., Logendra, L. y Janes, H. 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1697-1702.
- Artigas, J.M. 2002. En P. Capilla, Artigas, J.M. y Pujol, J. (eds.). *Fundamentos de colorimetría*. Valencia: Universidad de Valencia, 119-131.
- Bao, B. y Chang, K.C. 1994. *Journal of Food Science* 59: 1155-1158.
- Beltrán González, F., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. y Carbonell-Barrachina, A.A. 2008. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1731-1738.
- Ben Dor, A., Steiner, M., Gheber, L., anilenko, M.D, Dubi, N., Linnewiel, K., Zick, A., Sharoni, Y. y Levy, J. 2005. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 177-186.
- Berzelius, J.J. 1837. *Ann der Pharm* 21: 257-262.
- Britton, G. 1983. *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Britton, G. 1991. En P.M. Dey y Harborne, J.B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press.
- Britton, G. 1992. En G.A.F. Hendry y Houghton, J.D. (eds.). *Natural Food Colorants*. Glasgow y Londres: Blackie.
- Britton, G. 1995. En G. Britton, Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (eds.). *Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. y Young, A. 1993. En A. Young y Britton, G. (eds.). *Carotenoids in Photosynthesis*. Londres: Chapman and Hall.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2004. *Handbook of Carotenoids*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2008. *Carotenoids. Vol. 4: Natural functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 2009. *Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and Health*. Basilea: Birkhäuser.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. y Noziere, P. 2007. *Journal of Dairy Science* 90: 2335-2346.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Pradel, P., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. y Noziere, P. 2007a. *Journal of Dairy Science* 90: 5651-5664.
- Calvo, C., Salvador, A. y Fiszman, S.M. 2001. *European Food Research and Technology* 213: 99-103.
- Cano, M P., De Ancos, B., Lobo, M.G. y Monreal, M. 1996.

REFERENCIAS

- Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 351-358.
- Chen, B.H., Peng, H.Y., y Chen, H.E. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1912-1918.
 - Chen, B.H. y Tang, Y.C. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2312-2318.
 - CIE. 1978. *Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, Psychometric Color Terms*. CIE Publication núm. 15 (E-1.3.1), suplemento 2. Viena: CIE.
 - Clydesdale, F.M. 1993. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 83-101.
 - Cortés, C., Esteve, M.J., Rodrigo, D., Torregrosa, F. y Frígola, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1932-1939.
 - Cortés, C., Torregrosa, F., Esteve, M.J. y Frígola, A. 2006a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6247-6254.
 - D'Souza, M.C., Singha, S. y Ingle, M. 1992. *Hortscience* 27: 465-466.
 - Davies, B.H. 1976. En Goodwin, T.W. (ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Londres y Nueva York: Academic Press.
 - Davis, W.B. 1949. *Analytical Chemistry* 21: 1500-1503.
 - De Ritter, E. y Purcell, A.E. 1981. En Baverfend, J.C. (ed.). *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Nueva York: Academic Press.
 - Faulks, R.M. y Southon, S. 2005. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 95-100.
 - Fernández-Ruiz, V., Torrecilla, J.S., Cámara, M., Sánchez Mata, M.C. y Shoemaker, C. 2010. *Talanta* 83: 9-13.
 - Fernández-Vázquez, R., Hewson, L., Fisk, I., Hernanz-Vila, M.D., Heredia, F.J., Vicario, I.M., Hort, J. 2014. *Flavour* 3: 1-8.
 - Francis, F.J. 1995. *Food Quality and Preference* 6: 149-155.
 - Gómez-Ladrón de Guevara, R., Pardo-González, J.E., Varón-Castellanos, R. y Navarro-Albaladejo, F. 1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2049-2052.
 - Gurak, P., Mercadante, A.Z., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J. 2014. *Food Chemistry* 147: 160-169.
 - Hatlen, B., Jobling, M. y Bjerkgeng, B. 1998. *Aquaculture Research* 29: 191-202.
 - Heredia, A., Peinado, I., Barrera, C. y Grau, A.A. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 285-294.
 - Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M.I. 2001.

REFERENCIAS

- Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3584-3588.
- Huang, A.S., Tanudjaja, L. y Lum, D. 1999. *Journal of Food Composition and Analysis* 12: 147-151.
 - Huggart, R.L. y Wenzel, F.W. 1954. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 67: 216.
 - Humphries, J.M., Graham, R.D. y Mares, D.J. 2004. *Journal of Cereal Science* 40: 151-159.
 - Hunt, R.W.G. 1998. *Measuring Colour*. West Sussex: Fountain Press.
 - Hutchings, J.B. 1994. *Food Colour and Appearance*. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
 - Kidmose, U., Christensen, L.P., Agili, S.M. y Thilsted, S.H. 2007. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 399-406.
 - Krinsky, N.I. 2001. *Nutrition* 17: 815-817.
 - Krinsky, N.I. y Yeum, K.J. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305: 754-760.
 - Krinsky, N., Mayne, S.T. y Sies, H. 2004. *Carotenoids in Health and Disease*. Nueva York: Marcel Dekker.
 - Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. 2005. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.
 - Lebart, L.A., Morineau, A. y Fenelon, J.P. 1985. *Tratamiento estadístico*. Barcelona: Marcombo.
 - Lee, H.S. y Coates, G.A. 1999. *Journal of Food Science* 64: 663-666.
 - Lee, H.S. y Castle, W.S. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 877-882.
 - Lee, H.S. y Coates, G.A. 2003. *LWT. Food Science and Technology* 36: 153-156.
 - Lian, F.Z. y Wang, X.D. 2008. *International Journal of Cancer* 123: 1262-1268.
 - MacDougall, D.B. 2002. *Colour in Food, Improving Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing.
 - Meléndez-Martínez, A.J. 2005. "Estudio de los carotenoides y del color de zumos de naranja. Tesis doctoral". Universidad de Sevilla.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7266-7270.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2005. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 894-901.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Food Chemistry* 101: 1145-1150.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007.

REFERENCIAS

- Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1347-1355.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2808-2815.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 638-649.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2009. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 295-302.
 - Meléndez-Martínez, A.J., Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I., Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *Food Chemistry* 126: 1862-1869.
 - Melendez-Martinez, A.J., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *Food Research International* 43: 1289-1296
 - Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2010. *Phytochemistry* 71: 1104-1114.
 - Melendez-Martinez, A., Escudero-Gilete, M., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. 2010. *European Food Research and Technology* 230: 527-532.
 - Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., Moyano, M.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2000. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 1093-1099.
 - Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., Heredia, F.J., Alba, J. y Moyano, M.J. 2001. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 265-270.
 - Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A.H. y Garrido-Fernández, J. 1991. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 332-336.
 - Mínguez-Mosquera, M.I. 1997. *Clorofilas y carotenoides en tecnología de los alimentos*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
 - Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2008. *Food Research International* 41: 505-512.
 - Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. y Heredia, F.J. 2008a. *Food Research International* 41: 513-521.
 - Moyano, M.J., Melgosa, M., Alba, J., Hita, E. y Heredia, F.J. 1999. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76: 687-692.
 - Moyano, M.J., Heredia, F.J. y Meléndez-Martínez, A.J. 2010. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 278-291.
 - Nagy, S., Chen, C.S. y Shaw, P.E. 1993. *Fruit Juice Processing Technology*. Auburndale, Agscience.
 - Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M. y Gardea, A.A. 2008. *Postharvest Biology and Technology* 50: 145-152.
 - Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., Núñez-Delicado,

REFERENCIAS

- E., Amor, F.M. y Carbonell-Barrachina, A. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8158-8164.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.
 - Ronsholdt, B. y McLean, E. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 345-357.
 - Roth, H.A., Radle, L., Gifford, S.R. y Clydesdale, F.M. 1988. *Journal of Food Science* 53: 1116-1162.
 - Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F.A. y Gil, M.I. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6368-6374.
 - Ruiz, D., Reich, M., Bureau, S., Renard, C.M.G.C. y Audergon, J.M. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4916-4922.
 - Schiedt, K. y Liaaen-Jensen, S. 1995. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basilea: Birkhäuser.
 - Shim, S.M. y Kim, G.H. 2002. *Food Science and Technology Research* 8: 244-246.
 - Skrede, G. y Storebakken, T. 1986. *Journal of Food Science* 51: 804-808.
 - Skrede, G., Storebakken, T. y Nås, T. 1990. *Journal of Food Science* 55: 1574-1578.
 - Stinco, C.M., Vicario, I.M., Heredia, F.J. y Meléndez-Martínez, A.J. 2010. Budapest: 6th *International Congress on Pigments in Food*: 326-328.
 - Stinco, C., Rodríguez-Pulido, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Gordillo, B., Vicario, I., Meléndez-Martínez, A.J. 2013. *Food Research International* 50: 111-120.
 - Takahata, Y., Noda, T. y Nagata, T. 1993. *Japanese Journal of Breeding* 43: 421-427.
 - Thompson, K.A., Marshall, M.R., Sims, C.A., Wei, C.I., Sargent, S.A. y Scott, J.W. 2000. *Journal of Food Science* 65: 791-795.
 - Tswett, M. 1906. *Ber Deutsch Botan Ges* 24: 384-393.
 - Van Jaarsveld, P.J., Wet Marais, D., Harmse, E., Nestel, P. y Rodríguez-Amaya, D.B. 2006. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 321-329.
 - Van Wyk, A.A., Huysamer, M. y Barry, G.H. 2009. *Postharvest Biology and Technology* 53: 109-116.
 - Vásquez-Caicedo, A.L., Shruamsiri, P., Carle, R. y Neidhart, S. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4827-4835.
 - Wackenroder, H.W. F. 1831. *Geigers Magazin der Pharmazie* 33: 144-172.
 - Wenzel, F.W. y Huggart, R.L. 1962. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 75: 331-336.

REFERENCIAS

- Woodall, A.A., Britton, G. y Jackson, M.J. 1997. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336: 575-586.
- Woodall, A.A., Lee, S.W.M., Weesie, R.J., Jackson, M.J. y Britton, G. 1997. *Biochimica et Bio physica Acta* 1336: 33-42.
- Wyszecki, G. y Stiles, W.S. 2000. *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Yeum, K.J. y Russell, R.M. 2002. *Annual Review of Nutrition* 22: 483-504.
- Zepka, L.Q., Borsarelli, C.D., Azevedo Pereira da Silva, M.A. y Mercadante, A.Z. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7841-7845.
- Zepka, L.Q. y Mercadante, A.Z. 2009. *Food Chemistry* 117: 28-34.
- Zulueta, A., Esteve, M.J. y Frígola, A. 2007. *Journal of Food Science* 72: 457-463.