

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA**

**"Cambios en la composición de pigmentos en frutos de *Capsicum
annuum* durante la maduración y procesado para pimentón.
Variedades *Bola* y *Agridulce*."**

por

DAMASO HORNERO MENDEZ

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICA DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

T
574

"Cambios en la composición de pigmentos en frutos de *Capsicum annuum* durante la maduración y procesado para pimentón. Variedades *Bola* y *Agridulce*."

Memoria presentada por el Ldo. DAMASO HORNERO MENDEZ para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Diciembre, 1994



VºBº DIRECTOR

Fdo/ Dra. Dña M^a Isabel Mínguez Mosquera
Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Instituto de la Grasa.

VºBº DIRECTOR TUTOR

Fdo/ Dr. D. Juan Pereda Marín
Catedrático del Departamento de Ingeniería Química

Juan Pereda Marín, Catedrático del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Sevilla, y M^a Isabel Mínguez Mosquera, Investigador Científico del Instituto de la Grasa (CSIC).

CERTIFICAN: Que esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa de Sevilla.

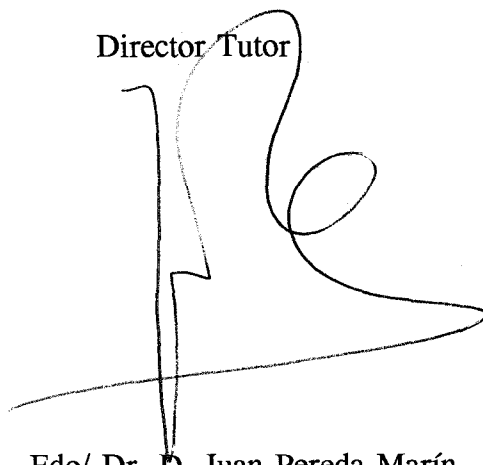
Y para que conste, firman la presente en Sevilla a 23 de Diciembre de 1994.

Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. I. Mínguez Mosquera', with a long horizontal line extending to the right.

Fdo/ Dra. Dña M^a Isabel Mínguez
Mosquera

Director Tutor

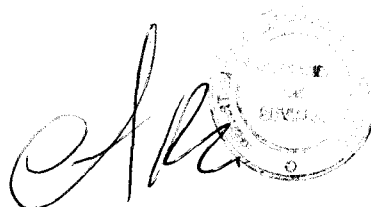
A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal line at the bottom.

Fdo/ Dr. D. Juan Pereda Marín

Antonio Roselló Segado, Director del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que el Ldo. en Ciencias Químicas Dámaso Hornero Méndez ha realizado en el Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa su Tesis Doctoral incluida en el plan de doctorado en Ingeniería Química, siendo su Tutor D. Juan Pereda Marín y su Director Dña M^a Isabel Mínguez Mosquera, habiéndose cumplido todos los requisitos legales vigentes.

Y para que conste firmo la presente en Sevilla a 23 de Diciembre de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Roselló Segado', is written over a circular official stamp. The stamp contains text, including 'UNIVERSIDAD DE SEVILLA' and 'DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA', though it is somewhat faded.

Fdo/ Dr. D. Antonio Roselló Segado

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Se ha presentado esta Tesis Doctoral
al número 108 número 43 del libro

con el número 23011/95
Sevilla, El jefe del Departamento de Tesis,

Alena Raffello

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Registrado en DPTO. INGENIERIA QUIMICA
de la FACULTAD DE QUIMICA
de esta Universidad desde el día 10/01/95
hasta el día 28 DE ENERO DE 1995

Sevilla 28 de ENERO de 1995

EL DIRECTOR DEL DPTO. INGENIERIA
QUIMICA



*A mis padres,
para ellos esta
memoria es más
que una Tesis.*

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Juan Pereda Marín, Catedrático del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, y Tutor de esta Tesis.

A la Dra. María Isabel Mínguez Mosquera, Investigador Científico del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), por haber hecho posible la realización de la presente Tesis Doctoral, no sólo con su dirección, sino también con su amistad y cariño.

Al Dr. Juan Garrido, por su constante apoyo, así como por su esfuerzo, a veces infructuoso, de querer contagiarme la serenidad que le caracteriza.

A mis compañeros de grupo, los doctores Beatriz Gandul y Manuel Jarén, que constantemente han tenido que soportar mis manías y neuras en el laboratorio.

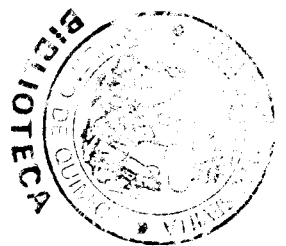
Así mismo deseo expresar mi más sincero agradecimiento a Mercedes Bodineau, Ayudante Diplomada de Investigación, por brindarme su cariño y apoyo en todo momento.

A Lourdes, simplemente, se lo agradezco todo.

A las industrias T. Pérez Trancón, S.A. de Cuacos de Yuste (Cáceres) y NETASA de Plasencia (Cáceres) por todas las facilidades prestadas en el suministro de las muestras de pimiento y pimentón.

Al Director de Instituto de la Grasa, y al Dr. Antonio Garrido Fernández, Jefe del Departamento de Biotecnología de Alimentos, por permitirme realizar en las instalaciones del Instituto el presente trabajo.

A todos aquellos que de una manera u otra han contribuido a la consecución de esta Tesis Doctoral y que por omisión involuntaria no han sido mencionados, gracias de corazón.



INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	7
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	11
I. CLOROFILAS.	11
1.- Presencia y distribución de clorofilas en plantas superiores.	11
2.- Estructura, localización y función.	11
3.- Biosíntesis de clorofilas.	16
4.- Propiedades químicas.	24
5.- Propiedades físicas.	26
6.- Uso como colorantes alimenticios.	27
7.- Enzima clorofilasa.	29
II. CAROTENOIDES.	33
1.- Presencia y distribución.	33
2.- Estructura, localización y función.	33
3.- Biosíntesis de carotenoides.	37
4.- Propiedades químicas.	44
5.- Propiedades físicas.	45
6.- Propiedades nutricionales y beneficiosas de los carotenoides.	47
7.- Transformación de carotenoides durante el almacenamiento y procesado de alimentos.	48
8.- Uso de los carotenoides como colorantes.	49
III. ANALISIS DE PIGMENTOS EN VEGETALES.	50
1.- Técnicas de extracción.	50
2.- Separación de pigmentos.	52
IV. PIGMENTOS CAROTENOIDES EN EL PIMIENTO.	55
EXPERIMENTAL	60

I. MATERIA PRIMA.	60
1.- Cambios en los pigmentos cloroplásticos y actividad clorofilasa durante la maduración de los frutos.	60
2.- Cambios en la composición carotenoide durante el proceso de elaboración de pimentón.	62
II. METODOLOGIA	63
IIa. CONTROL DE PIGMENTOS.	63
1.- Extracción de pigmentos.	63
2.- Saponificación del extracto de pigmentos.	64
3.- Separación y purificación de pigmentos por TLC.	65
4.- Identificación.	65
5.- Cuantificación.	70
IIb. ACTIVIDAD CLOROFILASA	75
1.- Preparación del precipitado proteínico.	75
2.- Extracción de la enzima del precipitado proteínico.	75
3.- Fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico.	76
4.- Preparación de los sustratos.	76
5.- Reacción enzimática.	76
III. APARATOS UTILIZADOS.	78
RESULTADOS Y DISCUSION	79
I. IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.	79
II. CONTROL DE CAROTENOIDES POR HPLC.	101
1.- Separación.	101
2.- Cuantificación.	104
III. CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA CLOROFILASA DE PIMIENTO.	114
1.- Aislamiento y purificación parcial de la enzima.	114

2.- Propiedades catalíticas.	117
3.- Implicación de grupos funcionales en la actividad enzimática.	128
4.- Optimización del procedimiento de medida de actividad clorofilasa.	132
IV. CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE PIGMENTOS DURANTE LA MADURACION DE LOS FRUTOS.	134
1.- PIGMENTOS CLOROFILICOS.	140
- Desaparición de clorofilas.	140
- Actividad clorofilasa.	144
2.- PIGMENTOS CAROTENOIDES.	146
- Síntesis de carotenoides.	146
- Influencia de la variedad y momento de la recolección en el contenido carotenoide.	154
- Valor de Provitamina A.	155
V. ESTERIFICACION DE XANTOFILAS DURANTE LA MADURACION EN EL PIMIENTO ROJO.	159
1.- Grado de esterificación	159
2.- Acidos grasos responsables de la esterificación de las xantofilas.	161
3.- Cambios en la esterificación durante la maduración de los frutos.	165
VI. EFECTO DEL PROCESADO DEL PIMENTON SOBRE LOS CAROTENOIDES DEL PIMIENTO.	169
1.- Pigmentos controlados en el fruto fresco maduro, seco y pimentón.	169
2.- Cambios en la composición carotenoide inicial de los frutos durante la transformación industrial de pimiento en pimentón.	170
3.- Estabilidad comparada de pigmentos.	180
4.- Incidencia del proceso de fabricación sobre el contenido en provitamina A.	182
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFIA	188

INTRODUCCION

Es por todos conocido que la valoración de cualquier tipo de alimento pasa por la visión que de él se obtiene, lo cual condiciona su aceptabilidad. En este sentido, el color es una cualidad que se capta de forma inmediata, ejerciendo su influencia incluso en otras percepciones como puedan ser olor y sabor. Es decir, el color, por si mismo, sugiere un valor intrínseco de calidad y además condiciona los otros sentidos. Por otra parte, informa de una manera bastante aproximada acerca del estado general del alimento. Estas interdependencias son conocidas por los industriales que, en buena lógica, intentan mantener u obtener un producto cuya apariencia sea, cuanto más apetecible, mejor.

Desde antiguo es práctica habitual la utilización de materias colorantes naturales que se adicionan en pequeña cantidad a los alimentos, consiguiendo así un realce del color natural o una coloración que aun no siendo la propia del producto, producirá en el consumidor una reacción de aceptación. Tanto es así, que alimentos que normalmente son tomados con una coloración añadida si se sirven sin la misma, ya no son agradables al consumidor.

Está claro que el color que poseen los alimentos sin tratar es el debido a los colorantes naturales que contienen: clorofilas, carotenoides, antocianinas, etc. En razón de los sistemas de procesado y/o conservación, dichos pigmentos se logran mantener en los alimentos en mayor o menor extensión, originándose diversas pérdidas o transformaciones. Esto conlleva, por supuesto, a modificaciones del color en el producto final obtenido.

La industria, hoy día, oferta preparados a partir de productos naturales en múltiples variantes, como mermeladas, concentrados y otros, en los cuales ya se ha perdido totalmente el aspecto aparente de la materia prima, por lo que parámetros de calidad tradicionales de tipo organoléptico, no son suficientes para calificar estos nuevos productos.

Entre las sustancias colorantes mas utilizadas en la industria alimentaria, destacan los productos derivados del pimiento rojo (*Capsicum annuum*, L.). Taxonómicamente pertenece a la familia Solanaceas del orden Tublifora, la cual incluye también plantas tan importantes desde el punto de vista económico como la patata (*Solanum tuberosum*, L.), el tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill.) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.). Dentro del género *Capsicum* la mayoría de los autores aceptan que existen dos especies *C. annuum* L. y *C. frutescens* L., diferenciadas en función del número y color de las flores, forma y tipo de los

frutos, duración vegetativa, etc. La especie *C. frutescens* incluye una sola variedad, mientras que la especie *C. annuum* incluye siete variedades, las cuales se distinguen principalmente en función de la forma y tamaño de sus frutos: var. *abbreviatum*, var. *acuminatum*, var. *cerasiforme*, var. *conoides*, var. *fasciculatum*, var. *grossum*, var. *longum*.

Se trata de una planta herbácea, con sistema radicular pivotante y profundo, provisto de gran número de raíces adventicias. Posee un tallo de crecimiento limitado y erecto, pudiendo alcanzar por término medio 0.5-1.0 metros. Las hojas son lampiñas, enteras y ovales, con ápice pronunciado y un peciolo largo o poco aparente.

Las flores tienen corola blanquecina, apareciendo una por nudo y de fecundación autógena. El fruto es una baya semicartilaginosa, sin jugo interno y deprimida, de color rojo o en ciertos casos amarilla en la madurez, siendo su inserción en la planta de tipo peduncular o enhiesta. La forma y tamaño es muy variable, así los hay redondos, alargados, curvos, etc, presentándose frutos de pocos gramos de peso hasta los 250 g. Las semillas son redondeadas, de color amarillo pálido, con un diámetro comprendido entre 3 y 5 mm, y de inserción central en la placenta. El número de semillas por fruto es variable pudiendo alcanzarse las 200 semillas por gramo.

Desde el punto de vista agrícola, se trata de un cultivo de clima cálido, exigiendo bastante calor para un desarrollo óptimo, necesitando temperaturas diurnas que rondan los 25°C, y con pocas oscilaciones entre el día y la noche. La semilla presente el óptimo de germinación en el rango de temperaturas de 20-30°C. De modo similar, la germinación del polen y por lo tanto la fecundación no se da por debajo de 12°C y por encima de 35°C. El tiempo que transcurre desde la formación del fruto hasta su maduración depende del cultivo, la variedad, y sobretodo del clima. Las exigencias en cuanto a humedad ambiental son del 50-70%. En cuanto a luminosidad, los requerimientos son grandes, sobretodo durante la época de floración y maduración de los frutos. El suelo ideal para su cultivo debe ser profundo, y nunca arcilloso, siendo el pH óptimo 6.5-7.0.

El origen geográfico del pimiento (*Capsicum annuum*, L.) puede situarse en Centro- y Sudamérica. Así lo demuestra la aparición de restos de cáscara de pimientos en cámaras funerarias de mas de 2000 años de antigüedad encontradas en el Perú. El pimiento fue introducido en España desde América en los tiempos colombinos, siendo muy posiblemente

los mismos conquistadores los portadores de las semillas. Por este hecho, si tenemos en cuenta que gran número de los llamados conquistadores fueron Extremeños, no resulta aventurado afirmar que fuera en Extremadura el lugar donde se cultivó por primera vez. Esta afirmación, puede apoyarse por la particularidad de que la variedad *Agridulce*, autóctona de La Vera es muy similar a las variedades autóctonas de América, alargados y picantes, siendo probable que esta variedad proceda de las traídas originariamente desde el Nuevo Mundo. La primera cita acerca del pimiento en España data de 1494, y se debe al médico Chanca, que acompañó a Colón en su segundo viaje. Desde la comarca de La Vera, fueron muy posiblemente los monjes Jerónimos del Monasterio de Yuste quienes los dispersaron por el resto de España. De este modo llega el cultivo del pimiento a Murcia, mas concretamente a La Ñora, donde existe otro monasterio de la misma orden.

Respecto a la utilización de los frutos del pimiento se pueden distinguir dos tipos cultivos. Por un lado variedades cuya finalidad es producir frutos que por su consistencia carnosa son utilizados para su consumo directo. Mientras que el otro tipo de cultivo engloba a variedades destinadas exclusivamente a la producción de pimentón. En este caso se trata de variedades cuyos frutos tienen una pulpa poco gruesa, y una coloración roja muy intensa.

En la actualidad, la comarca de La Vera en Cáceres y la región de Murcia continúan destacando como las zonas principales de producción de pimiento pimentonero y pimentón, generando esta industria gran cantidad de mano de obra en ambas regiones. La producción anual de pimiento pimentonero ronda las 30000 toneladas, de las que al menos la tercera parte se dedican a la exportación.

El proceso de producción de pimentón consiste básicamente en dos operaciones: deshidratación o secado de los frutos maduros y posterior molturación de los mismos. Para desecar el pimiento y obtener la cascara seca, incluidas las semillas o binzas, se pueden utilizar diversos métodos tales como:

- Secado natural al sol
- Secado al sol bajo cubierta de plástico
- Secado por combustión de leña o al humo
- Secado mediante aire caliente

El secado al sol es el procedimiento típico de la Región de Murcia dada la climatología favorable durante la época del año en que se realiza. Para ello se utilizan grandes extensiones de cemento sobre las que se depositan los pimientos el mismo día de su recolección formando capas de unos 10 centímetros de espesor. Normalmente este proceso tiene una duración de 10 días. Seguidamente y mediante máquina se procede a partir las cascara para volver a colocarlas al sol durante 2 días más a fin de secarlas del todo. La cáscara así obtenida puede posteriormente someterse a un proceso mediante el cual se le retiran las semillas y el pedúnculo.

El secado al humo es exclusivo y característico de La Vera (Cáceres), realizándose en los denominados "secaderos". Clásicamente, los secaderos consisten en una pequeña construcción de piedra, a modo de casa, con tejado de tejas árabes, que permiten una correcta ventilación, y en cuyo interior hay dos plantas, ambas separadas por una plataforma de tablas mas o menos separadas para permitir el flujo de calor. En la planta superior, y sobre las tablas se depositan los pimientos formando una capa de 70-80 cms. En la planta inferior es donde se realiza la combustión de la leña, normalmente de encina, la cual proporciona el calor, siendo normal temperaturas en el interior del secadero que rondan los 40-60°C. Para que el proceso de secado sea lo mas homogéneo posible, la capa de pimientos se remueve (rodean) cada día.

El tiempo de secado varía entre ocho y doce días, e incluso más dependiendo de la humedad del fruto y de su grado de madurez. Durante este tiempo, los pimientos inmaduros experimentan una sobremaduración, con lo que se mejora el contenido pigmentario, aunque esto es solo externo puesto que las placentas de estos frutos mantienen su color blanquecino. Por esta razón, los pimientos de principio de campaña, de mejor calidad, se someten a un secado mas corto que los de final de campaña, al objeto de mejorar su calidad. Normalmente para obtener 1 Kg de cáscara, hacen falta de 6-7 Kg de pimiento fresco.

Tanto la cáscara como el pimentón obtenido por este procedimiento presentan un aroma y sabor muy apreciado en la industria alimentaria, confiriendo un flavor característico al alimento. A esto hay que añadir el carácter beneficioso de las sustancias polifenólicas producidas en el ahumado las cuales al presentar un carácter fungicida y antimicrobiano, preservan durante mas tiempo el producto.

El secado por aire caliente es el resultado de la tendencia, cada vez mayor, a utilizar procedimientos que aceleren el proceso de secado sometiendo a los frutos a corrientes de aire caliente, siendo el pimiento un fruto apto para este tipo de tratamiento al resistir bastante bien altas temperaturas, siempre por debajo de 65-75°C. Sin embargo, al contrario que con el sistema de secado al humo, los pimientos deben cosecharse en el estado de total madurez puesto que al tratarse de un procesado rápido no podrán sobremadurar.

Las condiciones de secado han de ser controladas muy cuidadosamente, no sobrepasando el límite antes señalado, a fin de no provocar alteraciones de las características organolépticas y degradación de los pigmentos. Puesto que el efecto del calor sobre un producto húmedo y un producto seco es totalmente diferente es necesario controlar muy rígidamente la temperatura del aire a la entrada y salida del secadero, así como su humedad relativa, y por supuesto el tiempo de residencia de los pimientos. Entre los diversos sistemas que emplean corriente de aire caliente para secar, se pueden citar:

- Secadero de corriente vertical
- Secadero de bandas
- Secadero de bandejas
- Secadero de corriente de aire horizontal
 - * Sistema en contracorriente
 - * Sistema en contracorriente-paralelo
- Secadero por atomización de pasta de pimiento

Una vez deshidratados los frutos, la cáscara seca que se obtiene debe ser molida para lo cual se suelen utilizar de forma generalizada los molinos de martillo, siendo una práctica habitual la adición de semillas para homogeneizar el producto y estandarizar la producción en cuanto a color.

La calidad de la materia prima, así como el control adecuado del proceso condicionan, al igual que en otros tipos de transformaciones industriales, la calidad del producto final. Sin embargo, en este caso no solo se afecta la calidad sino algo que es tanto o incluso más importante, la estabilidad del producto. Esto se debe a la naturaleza antioxidante de los pigmentos carotenoides, por lo que se afectan en mayor o menor medida por las condiciones

del sistema de procesado, manifestando una especie de "memoria" que se traduce en una mayor o menor duración de las características óptimas del producto.

En la actualidad, los esfuerzos en este campo de la Tecnología de Alimentos deben dirigirse en varios frentes: un mejor conocimiento de la materia prima, así como en la medida de lo posible una mejora genética de la misma; establecer las condiciones de procesado que afecten en menor medida la estabilidad carotenoide del pimentón, así como desarrollar métodos de almacenamiento que eviten la depreciación del color como atributo de calidad cotizado en esta especia.

OBJETIVOS

La legislación más reciente tiende a restringir el uso de colorantes alimenticios de origen sintético, potenciándose cada vez más el uso de materias colorantes de origen natural. En este sentido los productos derivados del pimiento rojo, concretamente pimentón y oleorresina, vienen siendo ampliamente utilizados desde antiguo en la industria alimentaria como colorantes debido a su alto contenido en pigmentos carotenoides.

Las variedades más utilizadas para la producción de pimentón difieren de una zona a otra, así en Murcia se cultiva preferentemente la variedad *Bola* junto con la *Belrrubí* y otras, mientras que en la comarca de La Vera se cultivan tanto la variedad *Bola* como la *Agridulce*, ésta última autóctona de esta zona y que confiere al pimentón un cierto grado de picante.

La tendencia actual desde el punto de vista agrícola está principalmente focalizada en la mejora genética y selección de variedades que presenten un mayor contenido carotenoide, aunque también se centra en la obtención de variedades más resistentes a procesos de podredumbre, ataques de virus, etc. Así mismo, la reciente introducción de maquinaria agrícola para la recogida mecánica de los frutos está obligando a seleccionar variedades con maduración de los frutos lo más agrupada posible, a fin de obtener mejores rendimientos en una sola recolección.

Por otro lado, el sector industrial implicado en la producción y comercialización de este tipo de productos, pimentón y oleorresina, se enfrentan en la actualidad con el grave problema de la baja estabilidad del color en el producto final obtenido. Hasta la fecha, la calidad y valoración del pimentón radica exclusivamente en su capacidad colorante, la cual es función del contenido carotenoide y de la labilidad de estos pigmentos, que por su propia naturaleza son fácilmente oxidados.

En consecuencia, la presente Tesis Doctoral aborda como objetivo general la caracterización a nivel de pigmentos cloroplásticos de las dos variedades de pimiento pimentonero más utilizadas, *Bola* y *Agridulce* (Figuras 1 y 2), efectuándose el estudio en cosechas cultivadas y procesadas en la comarca de La Vera. Superado este punto, se hace especial incidencia en esclarecer el efecto que sobre los mismos produce el procesado para pimentón. Los resultados encontrados permitirán en un futuro realizar posibles actuaciones

en cuanto a su mejora, tanto desde el punto de vista genético, agrícola y del procesado industrial.

Los principales objetivos que se plantean se pueden resumir como sigue:

- 1.- Caracterización de pigmentos cloroplásticos en las variedades *Bola* y *Agridulce*.
Diferencias varietales.
- 2.- Influencia del proceso de maduración sobre el contenido carotenoide del fruto maduro. Diferencias varietales.
- 3.- Incidencia del procesado de los frutos para pimentón sobre el contenido carotenoide inicial. Estabilidad de pigmentos. Diferencias varietales.

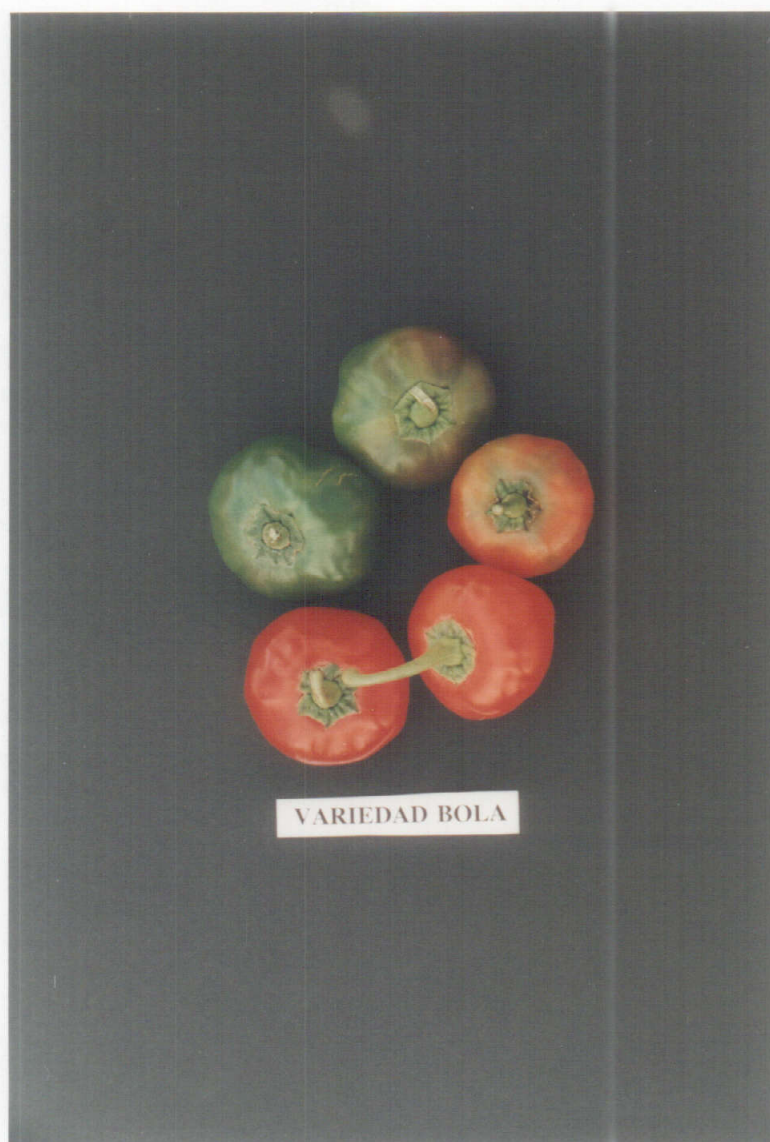


Figura 1: Pimientos de la variedad *Bola*.



Figura 2: Pimientos de la variedad *Agridulce*.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I. CLOROFILAS.

1.- Presencia y distribución de clorofilas en plantas superiores.

De todos los pigmentos presentes en la naturaleza, son los clorofílicos los más ampliamente distribuidos a la vez que más importantes, siendo clorofila *a* y *b* las más abundantes y por tanto mejor conocidas. Clorofila *a* se encuentra en todos los organismos fotoautótrofos, excepto en algunos grupos de bacterias fotosintéticos. Clorofila *b* está presente en todas las plantas superiores, así como en algas clorofíceas y euglenofíceas, y siempre acompañando a clorofila *a* como pigmento accesorio en el proceso fotosintético. El color de clorofila *a* es verde azulado, mientras que clorofila *b* presenta una tonalidad verde amarillenta.

En las plantas superiores el contenido en clorofilas referido a peso seco de vegetal suele oscilar del 0.6 al 1.2% (Willstätter, 1928). La razón entre clorofilas *a* y *b* varía normalmente entre 3 y 1, dependiendo el valor de multitud de factores, tanto genéticos (especie, variedad, etc.) como ambientales (luminosidad, estrés hídrico, nutrición mineral, etc.). Así por ejemplo, las plantas expuestas al sol tienden a tener relaciones *a/b* mayores que las plantas de sombra. La razón molar de clorofila *a* a *b* ha sido determinada en 24 especies, variando su valor de 2.56 a 3.45 (Lichtenthaler, 1968).

2.- Estructura, localización y función.

En 1864, Stokes aisló por vez primera la fracción de pigmentos clorofílicos y carotenoides a partir de extractos de plantas utilizando extracción y reparto con disolventes orgánicos, siendo aún hoy en día esta técnica bastante utilizada para la extracción de pigmentos (Humphrey, 1980). Posteriormente en 1906, el botánico Tswett consiguió separar clorofilas y carotenoides por adsorción selectiva sobre polvo de tiza, iniciando con ello la aplicación de una nueva y potente técnica analítica de separación, la cromatografía. Ese mismo año, Richard Willstätter logró aislar por vez primera clorofila *a* en estado puro, iniciando con ello los primeros estudios en profundidad para dilucidar la estructura de la clorofila. Desde entonces han sido muchos los investigadores interesados en su estudio, siendo uno de los mayores logros obtenidos la síntesis total de la clorofila, conseguida en 1960 de

forma independiente por dos grupos de investigación, uno dirigido por Martin Strell en el Instituto de Química Orgánica de la Escuela Técnica Superior de Munich, y el otro por Woodward en la Universidad de Harvard. Estos trabajos constituyen el último eslabón de la dilatada serie de investigaciones iniciadas por Willstätter en 1906, y proseguidas durante más de 50 años por los químicos más eminentes.

Los dos grupos de investigación mencionados sintetizaron clorofila *a* por caminos diferentes, aportando en ambos casos técnicas valiosas para el avance en la síntesis de moléculas orgánicas complejas. El grupo alemán parte ya de un producto intermedio de estructura porfirínica obtenido en el curso de investigaciones anteriores, y a través de ocho fases se logra la síntesis de la clorofila, siguiendo en gran parte las ideas de Fisher. Presenta la ventaja de que el producto final se obtiene bastante puro, y por consiguiente, su aislamiento es más fácil. En cambio, la síntesis elaborada por el grupo americano es mucho más compleja, ya que comprende treinta pasos, debido a que parte de compuestos de estructura más sencilla, concretamente pirroles sustituidos. La separación de isómeros en algunas de las fases presentó grandes dificultades. Posteriormente la estructura propuesta ha sido comprobada mediante estudios de degradación parcial (Vernon y Seely, 1966).

Las clorofilas pertenecen al grupo de porfirinas, caracterizadas por presentar una estructura básica compuesta por un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales está reducido por lo que posee una estructura de di-hidroporfirina que coordina a un ión Mg^{2+} formando un complejo esencialmente planar y muy estable. Adicionalmente las clorofilas contienen un anillo isocíclico. La diferencia entre clorofila *a* y clorofila *b*, estriba en que la primera tiene un grupo metilo en el C-7 mientras que la segunda posee un grupo formilo (Figura 3). El carácter hidrofóbico de estos compuestos se debe a la presencia del fitol, un alcohol isoprenoide monoinsaturado C_{20} que esterifica a un resto de ácido propiónico del anillo tetrapirrólico en el C-17.

Los pigmentos clorofílicos se encuentran localizados, junto con los carotenoides, en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, orgánulos en los cuales se lleva a cabo el proceso vital de la fotosíntesis en las células vegetales. Las moléculas de clorofilas están íntimamente asociadas tanto a lípidos de membrana, debido a la lipofilia que le confiere la cadena lateral de fitol, como a proteínas que interaccionan con el anillo porfirínico, parte hidrófila de la molécula (Figura 4). Dentro del cloroplasto, las clorofilas se hallan asociadas a proteínas y

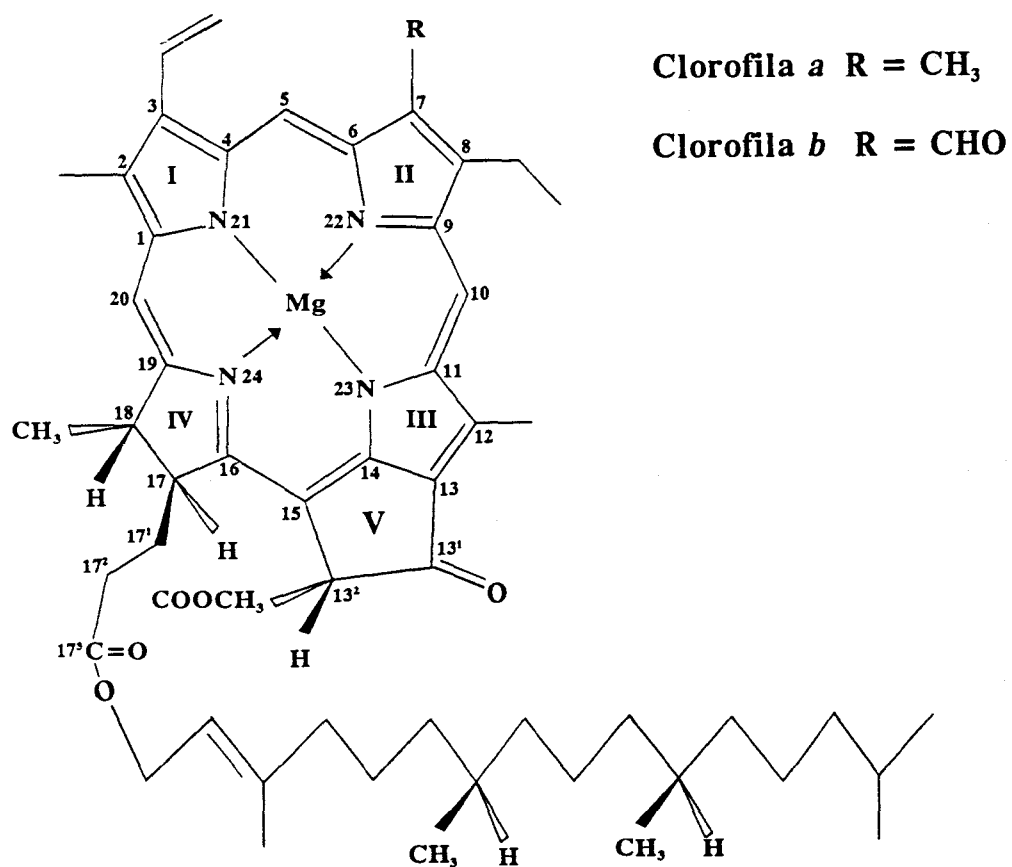


Figura 3: Estructura de clorofila.

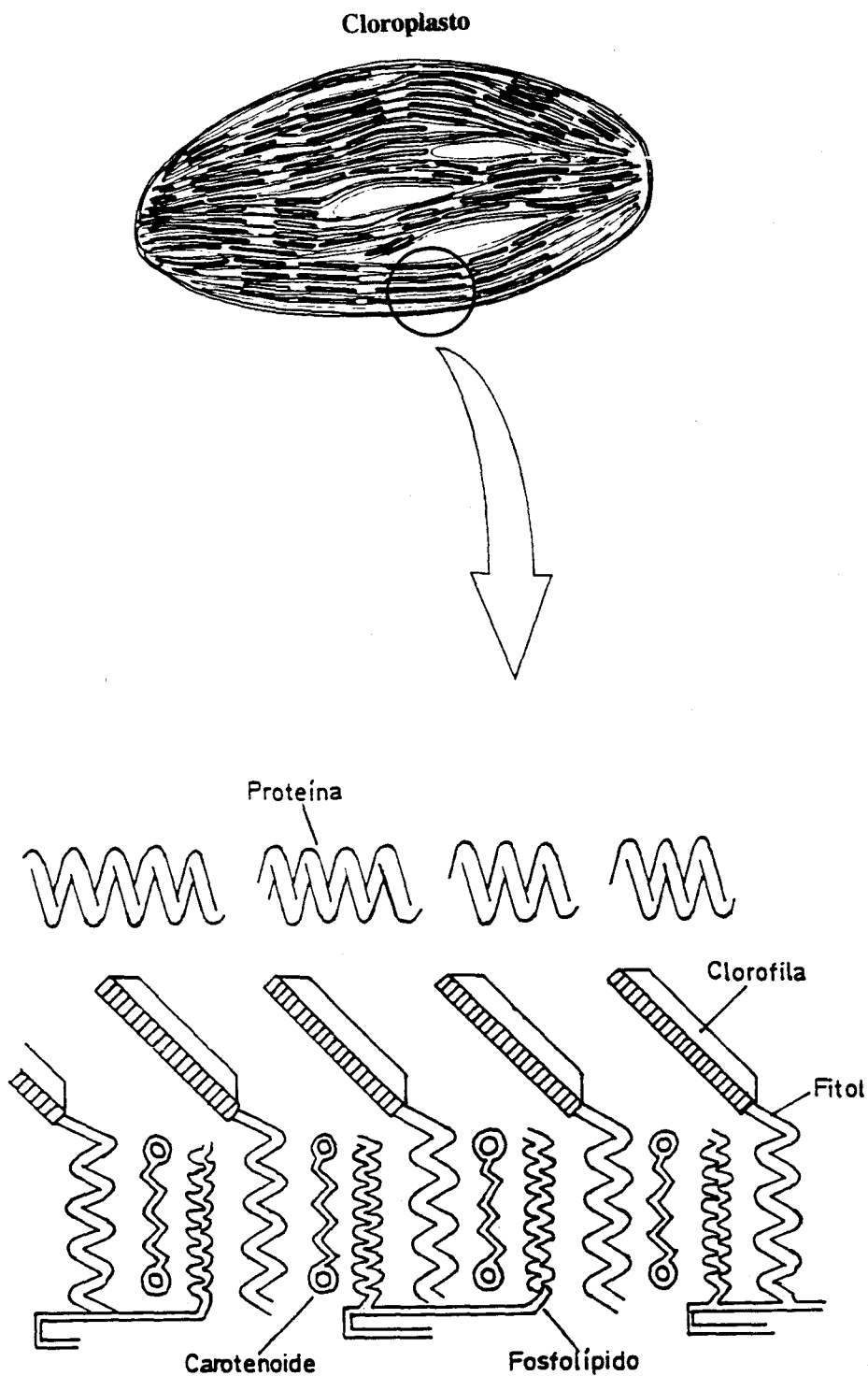


Figura 4: Esquema de la disposición de la molécula de clorofila en el cloroplasto.

lípidos en estructuras supramoleculares llamados *fotosistemas*, inmersos en la membrana tilacoidal. En plantas superiores siempre hay dos fotosistemas, PSI y PSII, siendo el PSII responsable de la fotólisis del agua y el PSI de la reducción del NADP⁺ (Hooper, 1984).

Parece ser que la interacción clorofila-proteína en los cloroplastos no es de tipo covalente, lo cual se apoya en el hecho de ser compuestos fácilmente extractables con disolventes orgánicos. En este sentido, varios autores han conseguido información adicional a partir del aislamiento y estudio de complejos de bacterioclorofilas con proteínas (Fenna y Matthews, 1975; Jackson, 1976; Lichtenthaler, 1987). El resultado de esta interacción clorofila-proteína posibilita la captura de energía radiante dentro de todo el rango del visible puesto que como consecuencia de la unión a proteínas, se modifica el máximo de absorción de la clorofila *a*, lo que es igual, su energía de excitación. Por este motivo, *in vivo* se han encontrado hasta seis formas de agrupaciones clorofila *a*-proteína con máximos de absorción característicos (Cla661, Cla669, Cla677, Cla684, Cla691 y Cla700-720). En el caso de clorofila *b*, sólo se han encontrado dos tipos de agrupaciones (Clb640 y Clb650). Mediante estas modificaciones del espectro de absorción se posibilita la captación de energía lumínica dentro de un rango más amplio. Cabe resaltar que clorofila *b* sólo se encuentra en el fotosistema II (PSII), exclusivo de organismos con fotosíntesis oxigénica más desarrollados evolutivamente, lo que es indicador de una posible adaptación (Hooper, 1984).

Resulta difícil concebir el origen o la existencia de la vida sin la presencia de los pigmentos fotosintéticos, capaces de absorber energía radiante y transformarla en energía química. Estos compuestos químicos, responsables de dicha conversión, se encuentran en los cloroplastos de las plantas y por mediación de ellos la luz inicia el proceso de la fotosíntesis (Deulin, 1975). Son por tanto los responsables de la captura de energía luminosa y su transformación en energía química en el proceso global de la fotosíntesis en todas las plantas verdes.

Todas las células fotosintéticas contienen uno o más tipos de pigmentos, pero no todos son verdes. Las algas fotosintéticas y las bacterias pueden ser pardas, rojas o púrpuras. Esta variedad de colores se debe a que, además de clorofila, muchas células fotosintéticas contienen otras clases de pigmentos cuya función es capturar la luz: los carotenoides, amarillos, y las ficobilinas, azules o rojas, denominados frecuentemente pigmentos accesorios, los cuales actúan como receptores suplementarios de la luz para porciones del espectro visible

que no están cubiertos completamente por la clorofila. Los carotenoides actúan también protegiendo a la clorofila del ataque degradativo del oxígeno molecular, el cual es producido durante el proceso fotosintético.

Por ser clorofila *a*, el pigmento común a todos los organismos fotosintéticos, se ha postulado que es el único que proporciona energía directamente a la reacción fotosintética, y que todos los demás transfieren la energía que han absorbido a clorofila *a* (Jackson, 1976).

3.- Biosíntesis de clorofilas.

El gran número de grupos de investigación interesados en este aspecto ha contribuido a un conocimiento profundo del proceso. La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo se han realizado con Angiospermas y casi siempre limitadas a tres familias Cucurbitaceae, Leguminosae y Gramineae (Gross, 1991).

Los estudios encaminados a esclarecer las rutas bioquímicas implicadas en la biosíntesis de clorofilas se iniciaron en los años 50 por Granick, quién propuso un esquema biosintético que fue aceptado en su mayor parte, y que se recoge en la Figura 5. En líneas generales se puede resumir de siguiente modo: dos moléculas del precursor inicial, ácido δ -aminolevulínico (ALA), se dimerizan para dar el monopirrol llamado Porfobilinógeno. A continuación, cuatro moléculas de porfobilinógeno se condensan para dar en primer lugar el tetrapirrol lineal llamado 1-hidroximetilbilano, el cual se cicla dando lugar al Uroporfirinógeno III (Urogen), que es el primer macrociclo del tipo tetrapirrol. Seguidamente, las cadenas laterales de sustituyentes (ácido acético y propiónico) son modificadas, y entonces el macrociclo es oxidado. La inserción del átomo central de magnesio en el anillo tetrapirrólico, el primer paso específico en la biosíntesis de la clorofila, es seguido por la formación de un quinto anillo de ciclopentanona característico de clorofilas. Posteriormente el cuarto anillo pirrólico es reducido, y su residuo de ácido propiónico es esterificado con alcohol tetraisoprenoide llamado fitol, llegándose de este modo a la estructura final de la clorofila *a* (Gross, 1991).

La biosíntesis de clorofila desde ácido δ -aminolevulínico ocurre completamente en los cloroplastos, y aunque este orgánulo posee material genético propio en su interior (debido a su posible origen endosimbionte), todas las enzimas implicadas tanto en la biosíntesis de

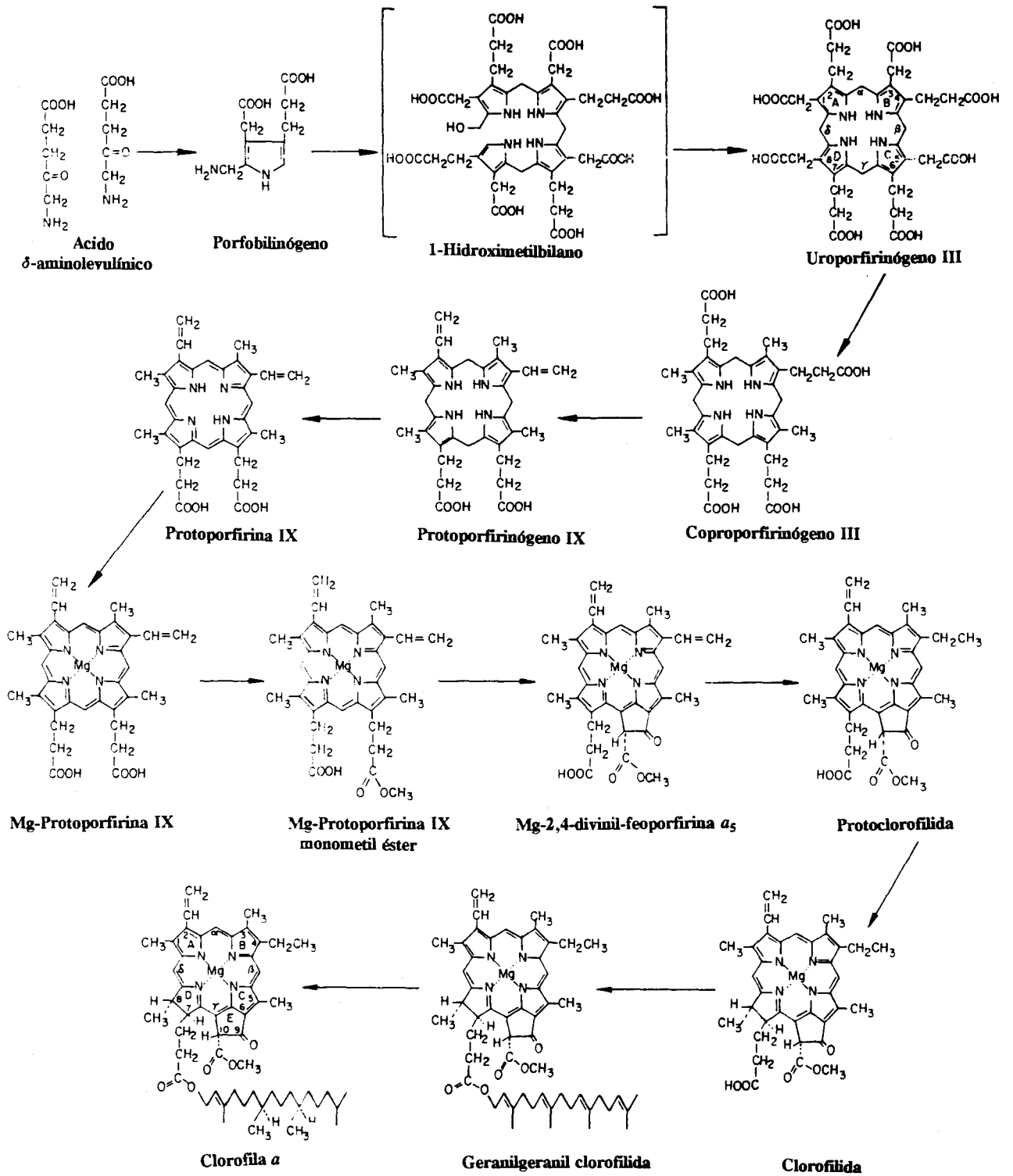


Figura 5: Esquema de la biosíntesis de clorofilas.

clorofilas como de carotenoides son codificadas en el citoplasma de la célula y deben ser exportadas al interior del cloroplasto. Las reacciones comprendidas entre ácido δ -aminolevulínico y protoporfirina IX ocurren en el estroma catalizadas por enzimas solubles, mientras que el resto de reacciones se realizan en la membrana. Cada una de las etapas, catalizadas por enzimas específicas, se detallan a continuación:

Etapas 1. Formación del ácido δ -aminolevulínico.- El ácido δ -aminolevulínico es la pieza clave precursora de porfirinas, tipo de moléculas que incluye a clorofilas, siendo la fuente del carbono y nitrógeno del anillo. Esto se sabe con toda seguridad desde que en 1954 Granick lo demostrara utilizando ALA marcado radioactivamente y observando que era incorporado enzimáticamente al porfobilinógeno en extractos de espinacas.

Clásicamente se aceptaba que la formación de ALA tenía lugar por la *Ruta de Shemin*, la cual consistía en una condensación de succinil-CoA con glicina, siendo catalizada por la enzima ALA sintetasa. Sin embargo, se observó que esto sólo ocurría en dos tipos concretos de tejidos vegetales, la piel verde de patatas almacenadas en cámara frigorífica y en células de callos de soja (Wider de Xifra et al., 1971; Ramaswamy y Nair, 1973; 1974; 1976; Battle et al., 1975). Más recientemente se ha concluido que la actividad ALA sintetasa por la *Ruta de Shemin* es la responsable de la biosíntesis de tetrapirroles no-plastídicos (Kasemir, 1983).

En plantas superiores se acepta en general que la síntesis de ALA es mediante la *Ruta C-5* localizada en los plastidios, según la cual ALA se forma a partir de un compuesto con cinco átomos de carbono en su esqueleto, pudiendo ser indistintamente glutamato o α -cetoglutarato (Beale, 1978).

La conversión de α -cetoglutarato en ALA implica la reducción a 4,5-dioxovalerato (DOVA), seguido de una transaminación. En el caso del glutamato, este es reducido a glutamato-1-semialdéhido (GSA), el cual se transforma en ALA mediante una transaminación intramolecular.

La formación de ALA a partir de precursores C-5 fue demostrado por primera vez en hojas verdes de cebada y en cotiledones de melón (Beale y Castelfranco, 1974). Posteriormente se han encontrado resultados similares en hojas de maíz (Meller et al., 1975) y otras plantas en las cuales tiene lugar una u otra de las dos rutas biosintéticas, habiéndose

aislado, purificado y caracterizado las enzimas que intervienen tanto en la ruta del α -cetoglutarato (Porra et al., 1980), como en la ruta del glutamato (Wang et al., 1981; Weinstein et al., 1987).

Etapa 2. Formación del pirrol Porfobilinógeno.- La molécula de porfobilinógeno (PBG) se forma mediante una condensación asimétrica de dos moléculas de ALA con eliminación de dos moléculas de agua, estando catalizada la reacción por la enzima ácido δ -Aminolevulínico deshidratasa ó porfobilinógeno sintetasa. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada, habiéndose encontrado en muchas bacterias, hongos y plantas superiores (Gibson et al., 1955; Schneider, 1973). En 1984, Huault y Bruyant la aislaron y purificaron a partir de hojas de rábano. Investigaciones recientes han mostrado que se trata de una enzima de localización subcelular y exclusiva del plastidio (Smith, 1988).

Etapa 3. Formación del tetrapirrol cíclico Uroporfirinógeno III.- El mecanismo de biosíntesis del Uroporfirinógeno III ha sido estudiado durante muchos años (Jordan y Seehra, 1979; Battersby et al., 1981). El paso previo a la formación del tetrapirrol cíclico es la formación de un tetrapirrol lineal, el 1-hidroximetilbilano, mediante la condensación cabeza-cola de cuatro moléculas de PBG con eliminación de amoníaco, catalizada por la enzima porfobilinógeno desaminasa (hidroximetilbilano sintetasa). La reacción se lleva a cabo muy rápidamente en presencia de la cosintetasa, enzima responsable del cierre del macrociclo para dar el uroporfirinógeno III. La enzima PBG desaminasa y la cosintetasa fueron aisladas por primera vez en hojas de espinaca y germen de trigo respectivamente (Bogorad, 1958a,b), siendo la primera posteriormente caracterizadas por Frydman y Frydman (1970).

Etapa 4. Modificación de las cadenas laterales del anillo de porfirina.- Este paso involucra la descarboxilación de los residuos de ácido acético y propiónico unidos a cada uno de los cuatro anillos pirrólicos, siendo catalizadas estas transformaciones por dos enzimas. La primera enzima, Uroporfirinógeno descarboxilasa cataliza la descarboxilación de las cadenas laterales de ácido acético a grupos metilos, transformando el Uroporfirinógeno III, que contiene ocho grupos carboxilos, a Coproporfirinógeno III que sólo contiene cuatro grupos carboxilos. La enzima uroporfirinógeno descarboxilasa ha sido encontrada en numerosas plantas como espinaca, pepino, maíz, cebada y tabaco (Chen y Miller, 1974).

La segunda enzima, la coproporfirinógeno oxidasa, cataliza la descarboxilación oxidativa de dos residuos de ácido propiónico a grupos vinilos (en los anillos A y B). De esta forma Coproporfirinógeno III es transformado en Protoporfirinógeno IX. La actividad enzimática de coproporfirinógeno oxidasa ha sido detectada en numerosas especies de plantas, destacando sobretodo el pepino (Rebeiz et al., 1970).

Etapas 5. Oxidación de Protoporfirinógeno IX a Protoporfirina IX.- En esta etapa seis átomos de hidrógeno son retirados del macrociclo de protoporfirinógeno IX, resultando la formación de un cromóforo estable, consistente en un sistema planar de enlaces conjugados que determina las propiedades espectroscópicas de las clorofilas.

Debido a que la molécula de porfirinógeno tiende a deshidrogenarse espontáneamente en presencia de luz y oxígeno molecular se pensó en un principio que la reacción no era enzimática. Más recientemente, Jacobs et al. (1982) han encontrado en plantas la enzima protoporfirinógeno oxidasa. Posteriormente la enzima ha sido aislada, purificada y parcialmente caracterizada a partir de hojas etioladas de cebada por Jacobs y Jacobs (1987).

Etapas 6. Quelatación de Protoporfirina IX con magnesio.- El macrociclo de protoporfirina puede quelatarse con numerosos metales, así en el reino animal se quelata con hierro (Fe) para formar al grupo hemo de la hemoglobina, y en plantas se quelata con magnesio para formar Mg-protoporfirina IX. La quelatación del magnesio en la protoporfirina IX está catalizada por la enzima Mg-protoporfirina quelatasa y constituye el primer paso específico de la biosíntesis de clorofilas. Las propiedades de la enzima han sido estudiadas por numerosos investigadores (Castelfranco et al., 1979; Pardo et al., 1980; Fuesler et al., 1981), habiéndose identificado inequívocamente por HPLC los productos resultantes de la quelatación *in vitro*. Como se desprende de los estudios realizados con cloroplastos intactos de pepino, la localización de la enzima es intraplastídica (Fuesler et al., 1984).

Etapas 7. Esterificación de Mg-Protoporfirina IX.- En esta etapa la cadena lateral de ácido propiónico de la posición 13 es esterificada para formar Mg-protoporfirina IX monometil ester (MPE). La enzima responsable de su formación es llamada *S*-adenosil-*L*-metionina-magnesio protoporfirina *O*-metil transferasa, habiendo sido encontrada en bacterias, algas, y en plantas superiores como cloroplastos de maíz y guisantes (Radmer, 1966; Radmer y Bogorad, 1967).

Durante mucho tiempo no se supo si la metilación ocurría antes o no que la quelatación con Mg debido a que las reacciones daban mezclas de Mg-protoporfirina y sus ésteres. Posteriormente, y mediante HPLC se ha comprobado y verificado que la quelatación con magnesio precede a la metilación, de forma que Mg-protoporfirina IX sirve de sustrato para la metilación (Richter y Rienits, 1980; Fuesler et al., 1982).

Etapa 8. Formación del anillo isocíclico (Protoclorofilida).- Durante esta etapa del proceso de biosíntesis se produce la modificación de las cadenas laterales en las posiciones 8 y 13. La primera transformación, consiste en la formación del anillo isocíclico, el quinto anillo (E) en la molécula, lo cual ocurre a partir de la cadena lateral de ácido propiónico metilado de la posición 13 en el anillo C mediante reacciones de β -oxidación y ciclación. El producto resultante se llama Mg-2,4-divinil-feoporfirina a_5 (MgDVP), el cual es una divinil protoclorofilida. Esta molécula se encontró por primera vez en la cubierta interna de semillas de pepino (*Cucurbita pepo*) (Jones, 1966).

La otra modificación, la reducción del grupo vinilo de la posición 8 a grupo etilo, fue un tema de controversia, no estableciéndose su orden respecto a la modificación anterior. Así, el hallazgo de MgDVP en la cubierta interna de semillas de pepino parecía ser la prueba de que la formación del anillo isocíclico ocurre primero (Jones, 1966), sin embargo otros datos experimentales mostraban que la reducción precedía a la formación del anillo. El dilema fue resuelto por Rebeiz y colaboradores que demostraron que la reducción se daba primero.

La enzima responsable de la formación del anillo isocíclico es la Mg-protoporfirina IX oxidativa ciclasa. La enzima fue resuelta en dos subunidades y caracterizada por Wong y Castelfranco (1984). Parece ser que se encuentra inmersa en el interior del plastidio (Fuesler et al., 1984).

Etapa 9. Reducción de Protoclorofilida a Clorofilida.- En esta etapa, llamada de "verdecimiento", tiene lugar la conversión de protoclorofilida a clorofilida a mediante una reacción de fotorreducción del anillo D, concretamente la reducción del doble enlace entre los carbonos 17 y 18. Esta transformación da lugar al cromóforo que imparte el color verde a clorofila a . La reacción *in vivo* tiene lugar en tan solo 30 segundos tras la iluminación con luz de longitud de onda comprendida entre 635 y 678 nm. El proceso es complejo, formándose gran cantidad de productos intermediarios con vida media muy corta. Griffiths

(1978) determina que la enzima responsable de la fotorreducción es la NADPH-protoclorofilida oxidorreductasa. Posteriormente Lütz et al. (1981) encuentran que está localizada en los protilacoides de los etioplastos.

Etapa 10. Esterificación de Clorofilida *a*.- Durante esta etapa, la última del proceso de biosíntesis de clorofila *a*, el residuo de ácido propiónico del carbono 17 es esterificado con un alcohol isoprenoide C-20, fitol (C₂₀H₃₉OH), para formar clorofila *a*. Hasta hace poco tiempo, se aceptó que clorofilida *a* era esterificada con fitol en un único paso mediante una reacción catalizada por la enzima clorofilasa, enzima con actividad tanto biosintética como catabólica. En 1977 se demostró que clorofilida *a* es primero esterificada con geranilgeraniol, el cual se transforma gradualmente en fitol mediante tres pasos de hidrogenación en los cuales se forman los intermediarios clorofílicos dihidro- y tetrahydrogeranilgeranil ester.

Todos los ésteres intermediarios de clorofila han sido separados e identificados (Costes, 1966; Schoch et al., 1977; Schoch, 1978; Schoch y Schäfer, 1978). Se ha demostrado que la ruta biosintética vía clorofilida geranilgeraniol es el principal camino para la formación de clorofila *a* en hojas previamente etioladas y posteriormente expuestas a la luz (Schoch et al., 1977; Schoch, 1978).

Rüdiger et al. (1977) demostraron por primera vez la esterificación *in vitro* de clorofilida por geranilgeranil pirofosfato (GGPP) utilizando sistemas libres de células provenientes de retoños de maíz. Posteriormente, los mismos autores observaron que la enzima responsable de la esterificación era diferente de clorofilasa, siendo llamada *clorofila sintetasa*. Dicha enzima fue detectada y aislada por primera vez a partir de membranas de etioplastos (Rüdiger et al., 1980), comprobándose por estudios en espinaca que está localizada en las membranas tilacoidales (Block et al., 1980; Soll y Schulz, 1981; Soll et al., 1983). Dogbo et al. (1984) también llegaron a la misma conclusión trabajando con plastidios de *Capsicum annuum*.

La enzima clorofila sintetasa puede utilizar como sustratos tanto geranilgeranil pirofosfato (GGPP) como fitil pirofosfato (PPP), habiéndose demostrado en espinacas que ambas rutas alternativas coexisten. Así en la envuelta del cloroplasto GGPP es reducido a PPP siendo este último utilizado para la esterificación, mientras que en la membrana tilacoidal es el geranilgeranil unido ya como cadena lateral a la clorofila el que se reduce (Soll et al., 1983).

La ruta vía geranilgeranil-clorofila es la principal en retoños etiolados, mientras que la ruta vía PPP opera como ruta principal en retoños verdes (Rüdiger, 1986).

Etapa 11. Biosíntesis de Clorofila b.- Clorofila *b* se diferencia de clorofila *a* en que el grupo metilo del C-7 se encuentra oxidado a grupo aldehído. En experimentos realizados por Ellsworth et al. (1970) que utilizaban incubaciones de homogeneados de soja con clorofila *a* marcada radioactivamente con ^{14}C se obtenían cantidades significativas de clorofila *b* marcada por lo que se consideró que clorofila *a* era precursor directo de clorofila *b*. Posteriormente, Ölze-Karow y Mohr (1978) sugirieron en base a estudios cinéticos de formación de clorofilida *a* y clorofila *b* en cotiledones etiolados de mostaza, que clorofila *b* se forma a partir de clorofilida *a* en lugar de clorofila *a*.

Investigaciones posteriores evidenciaron que clorofilida *b* también podía estar implicada en la formación de clorofila *b*. Así a partir de hojas de té a las que previamente se les suministró [^{14}C]ALA, se aislaron clorofilas, clorofilida *a* y clorofilida *b* marcadas radiactivamente, sugiriendo la cinética de aparición que clorofilida *b* precede a clorofila *b* (Aronoff, 1981). Además Benz y Rüdiger (1981) demuestran a partir de estudios con la enzima clorofila sintetasa que tanto clorofilida *a* como *b* son buenos sustratos para la misma.

Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que clorofila *b* se forma por esterificación de clorofilida *b* con geranilgeraniol, a lo que siguen tres pasos sucesivos de hidrogenación del radical alcohol para dar lugar al fitol de forma análoga a como ocurre en clorofila *a*.

- *Mecanismos de control de la biosíntesis.*

Se piensa que la mayor o menor disponibilidad de ALA sea el factor limitante y controlador de la biosíntesis de clorofila. La síntesis de ALA está regulada por efecto de retroalimentación (inhibición feedback) como consecuencia de los niveles existentes de protoporfirina IX y protoclorofilida. A su vez la luz es totalmente necesaria para la reducción de protoclorofilida a clorofilida, por lo que su ausencia produce una acumulación de protoclorofilida e inhibe por lo tanto la síntesis de ALA, efecto que revierte cuando se da la exposición a la luz (Wang, 1978).

4.- Propiedades químicas.

Dado que la función *in vivo* de clorofila es captar energía de modo muy eficiente, es fácil comprender que se trate de una molécula muy susceptible a experimentar transformaciones en su estructura y consecuentemente en sus propiedades por multitud de causas, sobretodo externas. La Figura 6 muestra la relación entre la molécula de clorofila y la de sus derivados más importantes, resumiéndose a continuación las modificaciones más características que puede experimentar.

4.1.- Eliminación e inserción de magnesio.- El átomo de magnesio se elimina rápidamente de la molécula de clorofila por acción de ácidos diluidos dando lugar a la formación de feofitinas, lo que se refleja en un cambio inmediato de color y consecuentemente en el espectro de absorción visible. Si en lugar de clorofila, partimos de clorofilidas, derivado libre de fitol, se obtienen feoforbidas. La reinsertión del magnesio en el anillo tetrapirrólico se consigue por tratamiento con reactivo de Grignard, o su derivado alcoxi, teniendo que llevarse a cabo la reacción en una atmósfera inerte para evitar la oxidación por el aire (alomerización) o la posible transesterificación de los ésteres de las cadenas laterales. Otros metales como Zn, Cu, Fe y Co se pueden introducir con mayor facilidad que el Mg en el núcleo macrocíclico, usando acetatos o cloruros metálicos (Falk, 1964; Yoshimune et al., 1994).

4.2.- Hidrólisis o transesterificación del grupo ester fitilo.- La hidrólisis del ester fitilo en el C-17³ del grupo propionato se lleva a cabo enzimáticamente por acción de la enzima clorofilasa dando lugar a clorofilidas y liberando el alcohol fitol (Holden, 1961). La misma reacción también puede producirse por la acción de ácido o álcali bajo condiciones suaves sin que afecte el grupo metoxicarbonilo del C-13², aunque la hidrólisis alcalina debe realizarse bajo una atmósfera inerte para evitar la oxidación en el C-13². La hidrólisis ácida produce al mismo tiempo la eliminación del magnesio originando feoforbida, mientras que el tratamiento con ácido en un medio alcohólico da lugar además, a la transesterificación con la formación del ester correspondiente al alcohol utilizado (Jackson, 1976).

4.3.- Isomerización.- La epimerización del C-13², centro asimétrico localizado en el anillo isocíclico, inducida por un suave calentamiento, provoca la formación de los isómeros 13-epiclorofilas, denominados *a'* y *b'* (Katz et al., 1968). Aunque en un principio se

consideró que pudiesen ser artefactos producidos durante la manipulación de los pigmentos, más tarde se ha comprobado que al menos clorofila *a'* es un constituyente natural de las membranas fotosintéticas (Watanabe et al., 1984).

5.- Propiedades físicas.

5.1.- Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.- Debido a la estructura tetrapirrólica del anillo porfirínico, las clorofilas y sus derivados poseen un espectro de absorción electrónica característico, presentando en todos los casos, cuatro importantes bandas de absorción entre 500 y 700 nm en la región visible del espectro y una gran banda, alrededor de los 400 nm (banda Soret), en la región cercana al UV. La ausencia de la banda Soret en el espectro indica que la estructura de porfirina se ha roto (Clydesdale y Francis, 1976; Holden, 1976; Jackson, 1976).

Las modificaciones estructurales en la molécula básica de clorofila provocan cambios en la forma y posición de las bandas en el espectro de absorción. Así mismo, las propiedades dieléctricas del disolvente también afectan al espectro. Las soluciones etéreas de clorofilas tienen bandas espectrales muy nítidas debido a la débil interacción entre este solvente y las moléculas del pigmento. En el caso de disolventes más polares como acetona, metanol, etanol o agua, su interacción con el pigmento ocasiona un desplazamiento de los máximos de absorción hacia longitudes de onda mayores, decreciendo la intensidad de la absorción (altura de pico) y reduciéndose la especificidad de la absorción (ensanchamiento de los picos). El efecto de los solventes en las características del espectro de absorción electrónica de clorofilas y feofitinas fue estudiado en profundidad por Strain y Svec (1966).

La relación que existe entre la concentración de una solución de clorofila y la intensidad de absorción de luz de una determinada longitud de onda se ajusta a una respuesta lineal, por lo que para su determinación espectrofotométrica se aplica la ley de Lambert-Beer:

$$E = E^{1\%} * C * l$$

De su aplicación se han deducido ecuaciones que permiten obtener la concentración de clorofilas *a* y *b* en mezclas. A tal fin, se mide la absorbancia a determinadas longitudes de onda obteniéndose los coeficientes de absorción específicos de los pigmentos puros a estas

longitudes de onda. Comar y Zscheile (1942), Smith y Benítez (1955) y Lichtenthaler y Wellburn (1983) desarrollan ecuaciones para determinar las concentraciones de clorofilas *a* y *b* en éter etílico. En 1963, White et al., para la estimación en éter etílico de clorofilas *a* y *b*, clorofilidas *a* y *b*, feofitinas *a* y *b* y feoforbidas *a* y *b* ampliaron el sistema a 16 ecuaciones. Wintermans y de Mots (1965) determinaron los coeficientes de absorción para clorofilas *a* y *b* en etanol/agua (96%).

5.2.- Otras propiedades espectroscópicas.- Los métodos espectrofluorimétricos no se han usado tan ampliamente como los espectrofotométricos, aunque son mucho más sensibles. El espectro de fluorescencia de las clorofilas es similar al de absorción visible. Actualmente la espectroscopía de fluorescencia se emplea como técnica muy sensible y selectiva para la detección y cuantificación de compuestos clorofílicos acoplándola a técnicas cromatográficas como la TLC (Zonneveld et al., 1984) y la HPLC (Shioi et al., 1983).

La resonancia magnético nuclear (RMN), espectrometría de masas (SM) e infrarroja (IR) han sido herramientas muy valiosas e insustituibles para la elucidación estructural de las clorofilas y sus derivados (Katz et al., 1966; Scheer y Katz, 1975; Jackson, 1976; Janson y Katz, 1978). Recientemente, Schick y Bocian (1987) han elaborado una revisión de todos los estudios realizados con espectroscopía de resonancia Raman de hidroporfirinas y clorofilas.

La espectrometría de reflectancia es una técnica muy utilizada para la evaluación del color en alimentos, pudiendo ser correlacionado con su contenido en clorofilas (Gold y Weckel, 1959; Mínguez et al., 1991a).

6.- Uso como colorantes alimenticios.

Los pigmentos clorofílicos pueden ser utilizados como colorantes en alimentos, sin embargo la clorofila como tal, es relativamente inapropiada para tal fin, ya que no sólo es inestable, sino que su insolubilidad en agua y sus características cerasas dificultan considerablemente su aplicación. Todos estos inconvenientes se salvan utilizando un derivado conocido como clorofilina sódico-cúprica, el cual está siendo ampliamente utilizado en la actualidad. Se trata de la sal sódica de clorofilina en la que Mg^{2+} ha sido reemplazado por Cu^{2+} . Tiene color verde-azulado, es moderadamente soluble en agua y resiste las condiciones de calentamiento utilizadas durante la elaboración de alimentos. La cantidad de cobre que

contiene es muy inferior a la que representa un riesgo de intoxicación, no obstante, su empleo a escala industrial tiene ciertas limitaciones por razones toxicológicas (Coultrate, 1984).

Así mismo, son también muy utilizados como aditivos colorantes los quelatos de cobre y zinc formados a partir de feofitinas y feoforbidas, que confieren una coloración verde brillante a los alimentos. Los quelatos de feofitina son liposolubles, mientras que los de feoforbida son solubles en agua. En estos casos la unión del metal es muy fuerte siendo compuestos muy estables, resistentes incluso al ácido clorhídrico concentrado, lo que les convierte en buenos colorantes de alimentos.

Las primeras citas bibliográficas sobre los complejos metaloclorofílicos se refieren a su formación circunstancial en vegetales enlatados. En okra (Fischbach, 1943; Fischbach y Newburger, 1943) y puré de guisantes enlatados (Schanderl et al., 1965) aparecía un color verde brillante debido a la formación de quelatos con zinc y cobre, proveniente probablemente de la planta. En coles de Bruselas recolectadas al comienzo del otoño y procesadas, Swirski et al. (1969), encontraron un pigmento verde estable y soluble en agua, que parecía ser un complejo entre pigmentos clorofílicos y una proteína que contenía pequeñas cantidades de cobre y zinc.

Posteriormente, Segner et al. (1984), han patentado la utilización de iones metálicos, concretamente zinc y cobre, para fijar el color verde en alimentos vegetales procesados y enlatados, desarrollando el proceso denominado "Veri-Green", que incorpora iones metálicos en el interior de las cubiertas de las latas. Von Elbe et al., (1986), atribuyen el color verde de los productos "Veri-Green" a la formación de complejos de feofitina y pirofeofitina de zinc predominando los derivados de la serie *a*, y atribuyen la falta de implicación de los derivados de la serie *b*, a su baja concentración en los tejidos vegetales así como su mayor dificultad de formar complejos metálicos. El grupo formilo presente en pigmentos de la serie *b* proporciona un electrón saliente al sustituyente, resultando un descenso en la densidad electrónica localizada en los nitrógenos pirrólicos y por tanto una reactividad menor con los cationes metálicos. También se piensa que la cadena de fitol interfiere estéricamente con la reacción de complejación, resultando una velocidad de inserción del ión metálico más rápida para los derivados libres de fitol.

En la actualidad clorofila y sus derivados se aplican en el tratamiento de anemia secundaria, debilidad, convalecencia, infecciones y operaciones quirúrgicas.

7.- Enzima clorofilasa.

7.1.- Función y localización.- La enzima clorofilasa fue descubierta por Willstätter y Stoll (1928). Esta enzima cataliza *in vitro* la hidrólisis del ester fitol formado en el resto de ácido propiónico unido al macrociclo tanto en clorofilas como feofitinas. Así mismo, se ha comprobado que extractos obtenidos a partir de plantas también actúan sobre sustratos como bacterioclorofila y clorofila 650 del *Clorobium* (Klein y Vishiac, 1961). Esto último resulta muy interesante, puesto que clorofila de *Clorobium* no contiene fitol sino farnesol, demostrándose que el espectro de actuación de clorofilasa se extiende a todos los organismos fotosintéticos, sugiriendo en todos ellos un ancestro común.

In vivo la enzima parece ser responsable del paso final en la síntesis de clorofila que es la adhesión de la cadena lateral de fitol a clorofilida. Algunos investigadores han estudiado la capacidad de síntesis de la enzima *in vitro*. Shimizu y Tamaki en 1963 fueron capaces de fitilar clorofilidas y feoforbidas usando una preparación purificada de clorofilasa obtenida de hojas de tabaco. Chiba et al. (1967), utilizando un extracto enzimático de *Chlorella protothecoides*, demostraron la fitilación de metil-clorofilida *a* pero no de clorofilida *a*, lo cual fue confirmado posteriormente por Wellburn (1970). Así mismo, Ellsworth (1972), empleando preparados enzimáticos obtenidos de plantas de trigo, consiguió fitilar feoforbida *a* y convertir metil-feoforbida *a* en feofitina *a* por transesterificación. Sin embargo, mediante estudios de filtración en gel, encontró evidencias de que estaban presentes más de una enzima en los extractos crudos (Holden, 1976).

Clorofilasa es una proteína intrínseca localizada en las membranas fotosintéticas del cloroplasto, asociada principalmente al estroma laminal, donde la actividad del fotosistema I es predominante (Lambers et al., 1984, 1985). La identificación de clorofilasa como enzima intrínseca a la membrana se hace patente por el hecho de que en casi todos los procesos de extracción de la enzima se hace necesario el empleo de disolvente orgánico y/o detergente. Aunque clorofilasa fue descubierta a principios de siglo, las primeras preparaciones solubles fueron obtenidas relativamente hace poco tiempo (Holden, 1961; Klein y Vishiac, 1961). Desde entonces numerosos investigadores han realizado preparaciones solubles a partir de

hojas, cultivos vegetales y algas. En los casos en que ha sido posible una purificación y caracterización de la proteína, la mayoría de la veces se llega a la conclusión de que la enzima es un dímero, oscilando el peso de las subunidades entre 30 y 65 kDa (Nishiyama et al., 1994).

7.2.- Distribución.- La enzima clorofilasa está presente en todos los tejidos verdes de vegetales y en algas, habiéndose estudiado principalmente en hojas y frutos durante las etapas de crecimiento y estado de senescencia. Abdul-Baki (1971) estudiando los cambios en el contenido en clorofilas y carotenos en relación con la actividad de clorofilasa durante el desarrollo y maduración de frijoles, detecta que el máximo de actividad coincide en los frutos con el mayor contenido en clorofilas, y es superior al encontrado cuando se inicia el catabolismo o pérdida de clorofilas. En este mismo sentido, Minamide y Ogata (1972) siguen la evolución del contenido clorofílico y la actividad clorofilasa durante la maduración del tomate, mostrando que la enzima tiene un máximo de actividad clorofilasa en el estado rompiente, a partir del cual decrece rápidamente. Así mismo, Mínguez et al. (1993a) encuentran una importante actividad clorofilasa en aceitunas durante el procesado de estas como aceitunas verdes de mesa.

Sin embargo, otros autores han encontrado que la actividad clorofilasa y la degradación de clorofilas en hojas se incrementa durante la senescencia (Yamauchi et al., 1980; Rodríguez et al., 1987), observándose lo mismo en frutos tratados con etileno cuando son expuestos al aire (Wang, 1970; Shimada y Shimokawa, 1978; Shimokawa et al., 1978; Purvis, 1980; Purvis y Barmore, 1981). Shimokawa et al. (1978) estudian la degradación de clorofilas *a* y *b* en mandarina, tanto durante la maduración en el árbol, como cuando es inducida por etileno. En los frutos tratados se observa un importante descenso en clorofilas después de 12 h de exposición al aire mientras que en los frutos madurados en el árbol las clorofilas desaparecen a una velocidad constante en 20 días. Los autores indican una degradación preferente para clorofila *b*.

El incremento de actividad se relaciona con problemas de deficiencias nutricionales o estados fenológicos de la planta como son la maduración o senescencia. La desorganización del cloroplasto en estos estados favorece la puesta en contacto de la enzima y los sustratos y justifican el incremento de actividad (Terpstra y Lambers, 1983).

Aunque la pérdida de clorofilas se relaciona causalmente con la ruptura del cloroplasto y/o la actividad de clorofilasa esto no es fácilmente demostrable (Purvis, 1980). Amir-Shapira et al. (1987) detectan clorofilidas en la piel de cítricos senescentes lo cual se asocia a un incremento en la actividad de clorofilasa. El tratamiento con etileno intensifica la actividad de la enzima. Sin embargo los mismos autores revelan un modelo catabólico diferente para hojas de perejil al producirse feofitinas y sólo aparecer transitoriamente derivados defitilados. Purvis y Barmore (1981) encuentran que el nivel de actividad clorofilasa no cambia cuando cesa el tratamiento con etileno en frutos cítricos, aún cuando se para la degradación de clorofilas. Concluyen por tanto que aunque el etileno es necesario en la degradación de clorofilas su papel principal no es solamente la inducción de la actividad clorofilasa.

7.3.- Medida de la reacción enzimática.- Al tratarse de una enzima asociada a lípidos de membrana, se hace necesario para su extracción la disgregación de la membrana para lo cual, se recurre al uso de disolventes orgánicos o detergentes. La mayoría de los ensayos encaminados a la preparación de extractos con actividad clorofilasa consisten básicamente en una extracción de los homogeneizados de células, cloroplastos o tejidos enteros con acetona (McFeeters et al., 1971; Holden, 1976), o isobutanol (Klein y Vishiac, 1961), ambos a temperatura menor de -20 °C. El residuo o precipitado proteínico obtenido se utiliza para una posterior extracción de la enzima empleando buffers alcalinos que contienen deoxicolato sódico (Klein y Vishiac, 1961), Tritón X-100 (McFeeters et al., 1971), o sin detergentes (Holden, 1961; Kuroki et al., 1981). Nishiyama et al. (1994) encuentran que 0.05% es el óptimo de concentración de Tritón X-100 para la medida de actividad clorofilasa.

Aunque el sustrato básico de clorofilasa es clorofila, recientemente algunos investigadores utilizan feofitinas para la medida de actividad enzimática, ya que, tanto ellas como las feoforbidas formadas como productos de la reacción, son más estables a la luz que clorofilas y clorofilidas, y por tanto su manipulación es más fácil.

La reacción se suele llevar a cabo en presencia de disolvente orgánico como acetona acuosa (40% v/v) (Holden, 1961; Kuroki et al., 1981; Jeffrey y Hallegraeff, 1987; Levadoux et al., 1987) o de detergentes como Tritón X-100 (Klein y Vishiac, 1961; McFeeters et al., 1971), deoxicolato u óxido de laurildiamina (Schoch y Brown, 1987). Cuando la acción de clorofilasa tiene lugar en acetona acuosa o en éter etílico saturado con agua, el grupo fitol es reemplazado por hidrógeno dando lugar a clorofilidas y feoforbidas. En metanol acuoso o

etanol tiene lugar una transesterificación, reemplazándose el fitol por metilo o etilo dando ésteres de clorofilidas o feoforbidas.

Para conseguir el pH óptimo de actividad clorofilasa, generalmente comprendido entre 7.0 y 8.0 unidades, se emplean distintos sistemas buffers como: citrato 0.02 M (Holden, 1961), fosfato 0.08 M (Klein y Vishiac, 1961), Tris-HCl 0.1 M mas $MgCl_2$ 10-50 mM (Levadoux et al., 1987; Terpstra y Lambers, 1983; Schoch y Brown, 1987).

Normalmente la temperatura óptima de actuación de la enzima es alta, alrededor de 75°C (Levadoux et al., 1987), pero la empleada para la incubación oscila entre 20 y 30°C (Holden, 1976). El tiempo de incubación varía, según la actividad del material biológico, desde 10 - 60 min, para los de mayor actividad, hasta horas en el caso de materiales con baja actividad clorofilasa (Holden, 1961). La reacción se detiene añadiendo acetona en cantidad suficiente para que su concentración final sea superior al 70% (Jeffrey y Hallegraef, 1987; Levadoux et al., 1987; Schoch y Brown, 1987; Mínguez et al., 1994).

Por último, una vez terminada la incubación se necesita una metodología que permita determinar la actividad enzimática. En la bibliografía se encuentran numerosos métodos encaminados a la determinación de actividad clorofilasa en tejidos vegetales. Todos los métodos tienden a salvar de un modo u otro la dificultad añadida de que tanto sustrato como producto, clorofila y clorofilida respectivamente, poseen idénticos espectros de absorción, por lo que deben ser separados si se quieren cuantificar espectrofotométricamente. El primer método propuesto por Willstätter y Stoll (1910) y posteriormente utilizado por Mayer (1930) y Peterson y McKinney (1938), dista mucho de ser el método ideal para la medida rutinaria de la actividad. Posteriormente coincidiendo con el auge de las técnicas cromatográficas Sironval en 1954 propone un método de gran precisión pero lento y laborioso para fines rutinarios. El método que tuvo más aceptación, y aun hoy en día es utilizado por numerosos investigadores, fue propuesto por Weast y McKinney (1940), y está basado en la insolubilidad de clorofilidas en éter de petróleo frente a la solubilidad de clorofilas, con lo que mediante reparto de fases se consigue separar sustrato y producto de modo sencillo y especialmente útil para medidas rutinarias. No obstante la tendencia actual se dirige a la utilización de técnicas cromatográficas para la separación del sustrato y producto, habiéndose aplicado la TLC y últimamente la técnica de HPLC (Mínguez et al., 1994).

II. CAROTENOIDES.

1.- Presencia y distribución.

Entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, no hay duda que los carotenoides, junto con las clorofilas, son los más ampliamente distribuidos e importantes, estimándose que la producción anual de carotenoides en la naturaleza ronda las 10^8 Tm (Isler, 1971). Los carotenoides se encuentran en todo el reino vegetal, aunque su presencia está a veces enmascarada por las clorofilas a las que siempre acompañan. Además son los responsables del color amarillo y rojo de flores y frutos. Los carotenoides están también presentes en algas y bacterias. En animales también podemos encontrar carotenoides, aunque no poseen capacidad de sintetizarlos y dependen de la dieta para su incorporación en el organismo, siendo responsables del color de peces, plumas de aves, exoesqueleto de artrópodos, etc.

El patrón de distribución de carotenoides dentro del reino vegetal no sigue un modelo único. Así en vegetales foliares encontramos el patrón denominado "carotenoides cloroplásticos", que básicamente engloba a cuatro carotenoides: un caroteno, β -caroteno, y tres xantofilas, luteína, violaxanteno y neoxanteno, lo que parece indicar la intervención de un antecesor común en todas las plantas superiores (Strain, 1966). En cantidad minoritaria y de forma ocasional dependiendo de la especie vegetal se encuentran otros carotenoides como: α -caroteno, α y β -criptoxanteno, zeaxanteno y anteraxanteno.

Mayores diferencias se encuentran en el patrón de pigmentos que muestran los frutos, de forma que dependiendo de la especie y variedad e incluso del estado de madurez, la distribución de los carotenoides puede variar mucho, pudiendo llegar a ser extremadamente compleja. De este modo no es extraño encontrar xantofilas exclusivas de un cierto género o especie vegetal. Tal es el caso de capsanteno, capsorrubeno y criptocapsin en *Capsicum sp.*, y bixina en *Bixa orellana* (Goodwin y Goad, 1970; Goodwin, 1976).

2.- Estructura, localización y función.

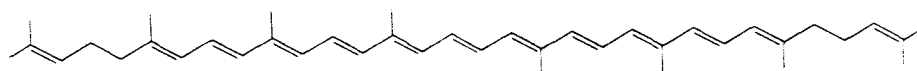
La extensa gama de colores entre amarillo a rojo que presentan los carotenoides en la naturaleza despertó la curiosidad de numerosos investigadores desde los comienzos de la

Química Orgánica. De hecho algunos de los primeros trabajos fueron publicados a principios del siglo XIX. En 1831, Wackenroder aisló por vez primera el "caroteno" de la zanahoria, en griego *Carota*, a lo que debe su nombre. Posteriormente Berzelius denominó "xantofila" al principio amarillo que colorea las hojas senescentes. Desde entonces han sido numerosas las investigaciones encaminadas al conocimiento químico-físico de estas moléculas. Ya en 1902 Kohl publicó una primera monografía con más de 800 citas. Entre 1900 y 1927, Tswett y la escuela de Willstätter trabajaron en la separación y determinación de la fórmula empírica de numerosos carotenoides.

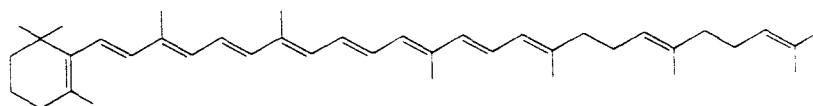
En 1928 las escuelas de Karrer, Kuhn, Zechmeister y Heilbron, comenzaron las primeras investigaciones encaminadas a la dilucidación estructural de los carotenoides conocidos hasta el momento, llegándose ya en 1930 a conocer que la estructura del β -caroteno, luteína y zeaxanteno era simétrica y poliénica, así como la relación del primero con la vitamina A. En 1935 se conocían 15 carotenoides, en 1948 unos 80 y hoy en día superan los 500 (Isler, 1971).

Químicamente los carotenoides se definen como terpenoides derivados de la unión de 8 unidades de isopreno, unidad básica, dando lugar a un tetraterpenoide (Moss y Weedon, 1976). En función de su estructura los carotenoides se dividen en dos grupos: los carotenos, que son estrictamente hidrocarburos, y las xantofilas, que contienen oxígeno. Licopeno es un ejemplo característico de caroteno lineal, a partir del cual y por ciclación de los extremos de la cadena, se forman carotenos cíclicos con dos posible estructura en los extremos, llamadas "anillo tipo β -ionona" y "anillo tipo α -ionona". Ejemplos de carotenos que contienen estos anillos son β -caroteno y α -caroteno. En la Figura 7 se muestran algunos ejemplos de estructuras de carotenos.

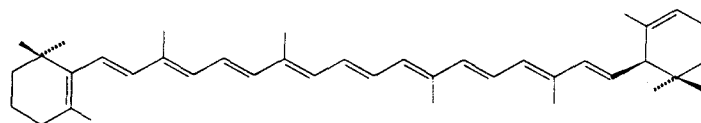
Las xantofilas, Figura 8, se forman inicialmente por hidroxilación de carotenos, y la mayoría de los tejidos de las plantas contienen trazas de precursores monohidroxílicos como criptoxanteno, y de las xantofilas dihidroxílicas como zeaxanteno o luteína. Posteriores reacciones de oxidación conducen a la formación de epóxidos, como violaxanteno, y de cetonas, como el capsanteno. Como casos singulares pueden destacarse neoxanteno que es un ejemplo peculiar de carotenoide con grupo aleno, y los apocarotenoides, constituyen un reducido grupo de xantofilas, en las que se ha perdido algún fragmento, a uno o a ambos lados de la cadena, como el β -apo-8'-carotenal y la crocetina.



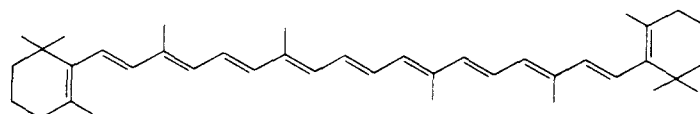
Lycopeno



β -Zeacaroteno



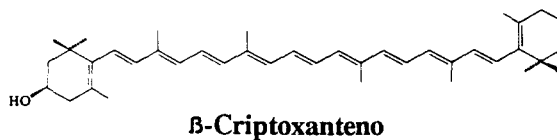
α -Caroteno



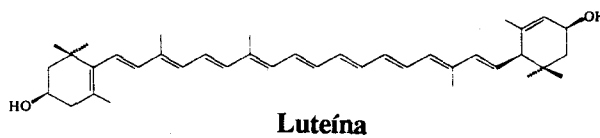
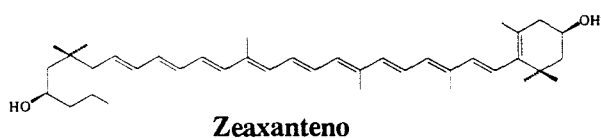
β -Caroteno

Figura 7: Estructura de carotenos.

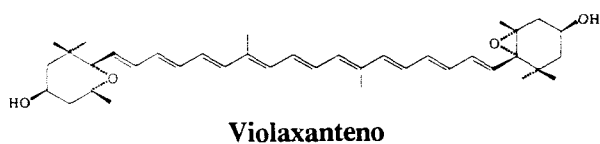
MONOHIDROXIDERIVADO



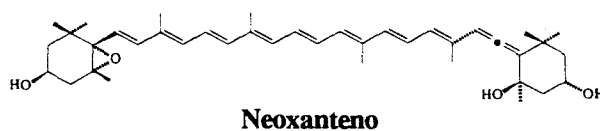
DIHIDROXIDERIVADOS



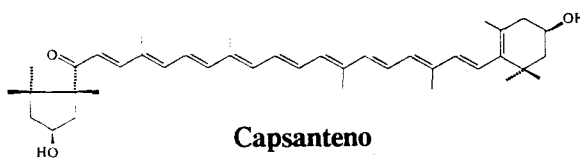
EPOXIDERIVADO



ALENO



CETODERIVADO



APOCAROTENOIDE

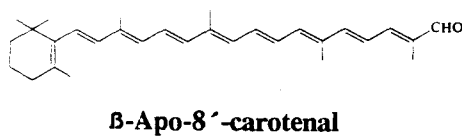


Figura 8: Estructura de xantofilas.

Con excepción de los apocarotenoides ácidos, los cuales forman sales solubles en agua en condiciones alcalinas, los carotenoides sólo son solubles en disolventes orgánicos apolares (Clydesdale y Francis, 1982; Coultate, 1984).

En las plantas superiores los carotenoides están localizados en cloroplastos y cromoplastos. Los primeros se encuentran en todos los tejidos fotosintéticos, especialmente en hojas, mientras que los segundos aparecen en frutos y flores. En los organismos fotosintéticos, prácticamente todos los carotenoides se hayan presentes en forma de complejos clorofila-carotenoide-proteína, desarrollando su función primaria en la naturaleza como colectores accesorios de energía lumínica en el proceso fotosintético. Adicionalmente los carotenoides son importantes como antioxidantes, actividad de provitamina A, acción fotoprotectora, regulan fenómenos de fototaxis en bacterias fotosintéticas, etc.

3.- Biosíntesis de carotenoides.

Las características generales de la carotenogénesis son similares en plantas superiores, algas, hongos y bacterias, aunque nos limitaremos sólo a lo que ocurre concretamente en plantas superiores. Son numerosos los libros y artículos que tratan y discuten la biosíntesis de carotenoides y aspectos relacionados, pudiéndose destacar los trabajos de Goodwin (1952, 1980), Isler (1971), Britton (1983), Spurgeon y Porter (1983), Bramley (1985) y Jones y Porter (1986).

Clásicamente el estudio y elucidación de los mecanismos bioquímicos que controlan la biosíntesis de carotenoides se ha venido realizando principalmente mediante estudios genéticos, de inhibición, y técnicas de marcaje radioactivo *in vivo*. La tendencia actual es realizar los estudios biosintéticos *in vitro* mediante incubación de sistemas enzimáticos aislados de plantas, especialmente tomate y pimiento.

La biosíntesis de carotenoides comprende seis etapas fundamentales, de las cuales la primera, a partir de mevalonato, es común para el resto de isoprenoides como gomas, esteroides y terpenos. En la Figura 9a,b se muestra el esquema de biosintéticas de carotenoides en plantas superiores, describiéndose a continuación las principales etapas del proceso.

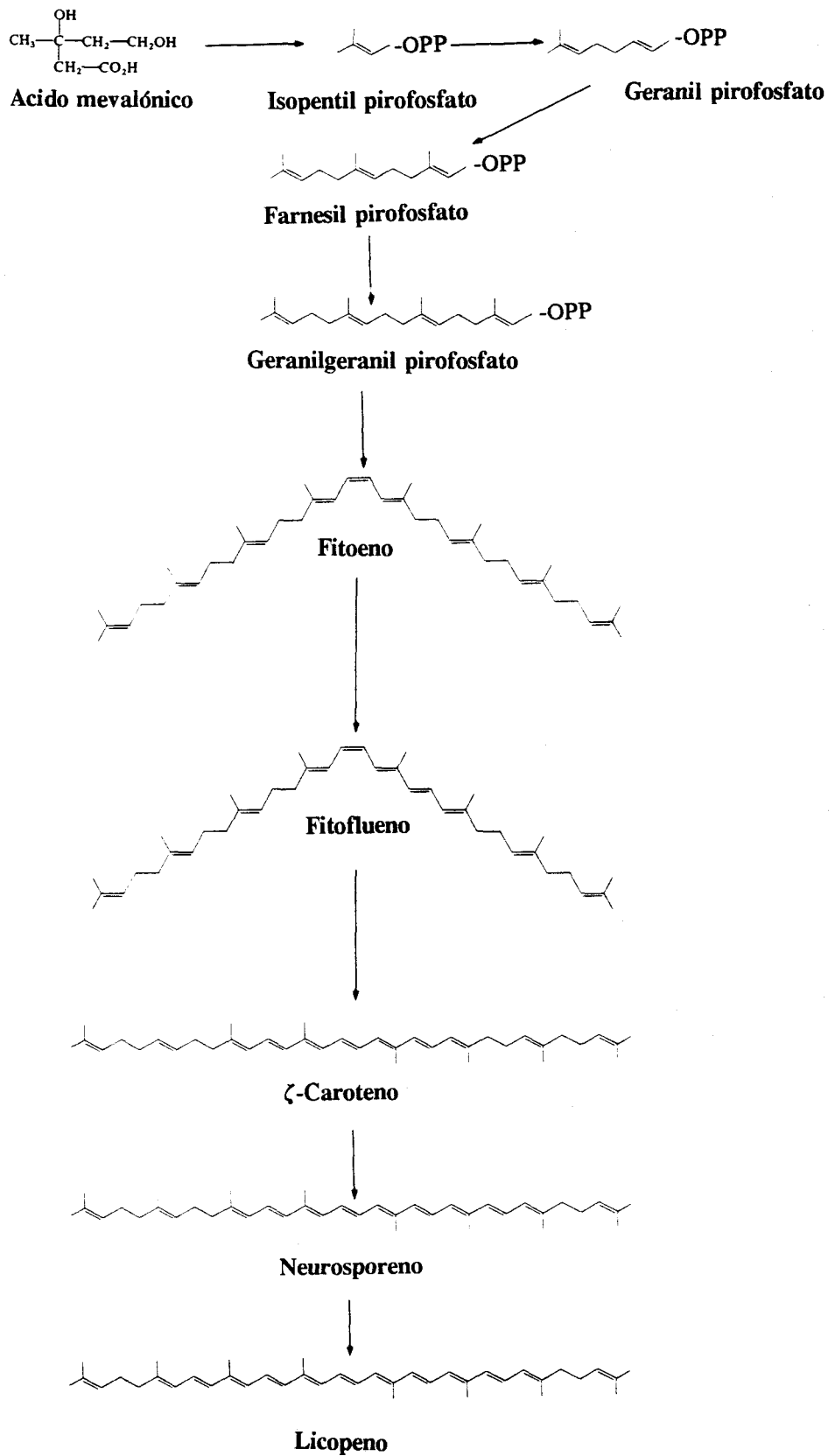


Figura 9a: Esquema de la biosíntesis de carotenoides.

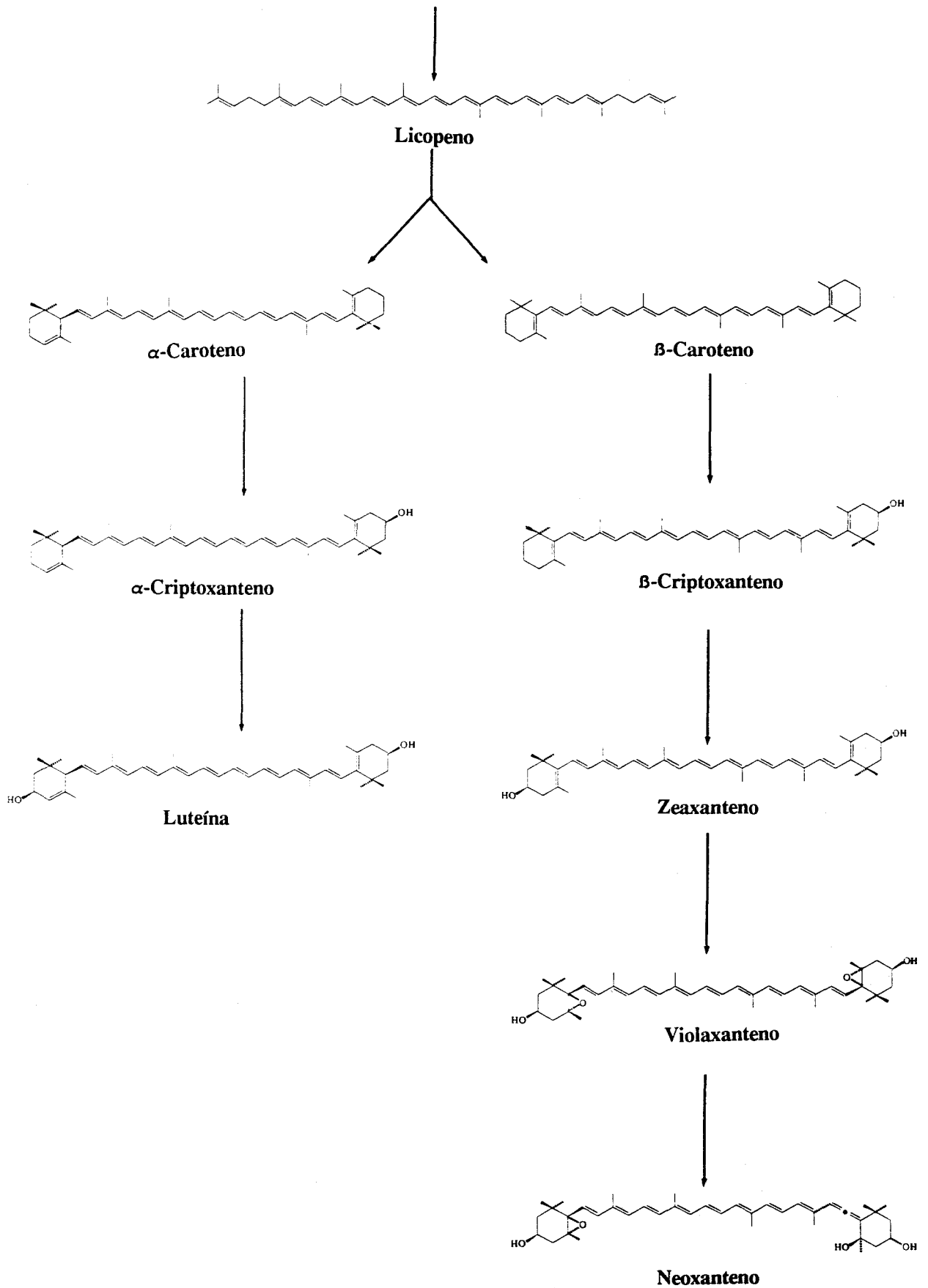


Figura 9b: Esquema de la biosíntesis de carotenoides (Continuación).

Etapa 1. Formación de ácido mevalónico.- Tanto los carotenoides como todos los terpenoides tienen como precursor natural común al isopentil pirofosfato (IPP), el cual se forma a partir del ácido mevalónico (MVA) mediante dos fosforilaciones sucesivas por medio de kinasas y ATP, dando primero el ácido mevalónico 5-fosfato y seguidamente el ácido mevalónico 5-pirofosfato, el cual experimenta una descarboxilación para dar una unidad isoprenoide de IPP.

Por otro lado, el ácido mevalónico se forma por condensación de tres moléculas de acetil-CoA vía acetoacetil-CoA y β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMGCoA), siendo este último reducido a MVA. La incorporación de HMG y HMGCoA en carotenoides fue demostrada por primera vez por Berry et al. (1972) a partir de preparados enzimáticos obtenidos de retoños de maíz.

Etapa 2. Formación de geranilgeranil pirofosfato.- El proceso por el cual se produce la elongación de la cadena carbonada desde IPP (C_5) hasta geranilgeranil pirofosfato (C_{20}) está catalizado por la enzima prenil transferasa. El primer paso consiste en la isomerización de moléculas de IPP en dimetilalilo pirofosfato (DMAPP), el cual por condensación con IPP da lugar a geranil pirofosfato (GPP), intermediario C_{10} . Sucesivas adiciones de dos moléculas de IPP dan lugar primero al intermediario C_{15} farnesil pirofosfato (FPP) y posteriormente al C_{20} geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Este último puede ser utilizado para sintetizar diterpenos como el fitol, la cadena lateral de clorofilas, o para sintetizar carotenoides C_{40} .

Mediante las experiencias con marcadores radioactivos, en 1960 Braithwaite y Goodwin demostraron la incorporación de CO_2 y acetato en carotenoides. Más tarde, en 1965, Jungalwala y Porter consiguieron sintetizar fitoeno a partir de IPP y FPP utilizando sistemas enzimáticos parcialmente purificados de tomate. Con posterioridad, tanto la enzima isopentil pirofosfato isomerasa, que cataliza la isomerización de IPP en DMAPP, como la prenil transferasa, que cataliza la condensación de tres moléculas de IPP con DMAPP, GPP y FPP, han sido encontradas en plastidios aislados de tomate, siendo parcialmente purificados y caracterizados (Spurgeon et al., 1984).

Por otro lado, los cloroplastos son capaces de sintetizar los carotenoides cloroplásticos utilizando CO_2 fijado fotosintéticamente, hecho que fue demostrado por Goodwin en 1958 suministrando $^{14}CO_2$ a retoños etiolados de maíz que tras iluminación lo incorporaban rápidamente en β -caroteno (Goodwin, 1958b). De igual modo, mediante el empleo de ^{14}C se

ha comprobado que cloroplastos intactos de espinaca convierten CO₂, fosfoglicerato, acetato y mevalonato en β-caroteno y xantofilas, lo cual prueba su autonomía en cuanto a la biosíntesis de terpenoides (Bickel y Schulz, 1976; Grumbach y Forn, 1980).

En 1982, Camara et al., utilizaron cromoplastos aislados de *Capsicum annuum* para realizar experiencias con IPP marcado, consiguiendo su incorporación en fitoeno. Ese mismo año, Camara y Monéger estudian y localizan las actividades enzimáticas responsables de dicha transformación en los cromoplastos. Separaron dos fracciones, una estromática y otra membranosa. La primera fracción sólo se podía incorporar IPP en fitoflueno, mientras que en la segunda fracción es donde ocurría el resto de etapas biosintéticas de carotenoides.

Etapas 3. Formación de fitoeno.- La primera etapa exclusiva de la biosíntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de GGPP para formar fitoeno, el cual es formado vía un intermediario C₄₀ ciclopropano llamado prefitoeno pirofosfato (PPPP) (Altman et al., 1972). En plantas superiores el isómero de fitoeno que se forma suele ser el 15-*cis*, mientras que en otros organismos es el isómero *trans*, dependiendo ello de la estereoquímica del átomo que se retira en la condensación de GGPP.

Se ha encontrado que la fracción estromática de plastidios en diferentes estados de desarrollo es el sitio de localización de la enzima fitoeno sintetasa, no siendo requerido para su actuación la presencia de membranas, envueltas o tilacoides (Lütke-Brinkhaus et al., 1982). Más recientemente se ha demostrado que el complejo fitoeno sintetasa está presente en forma soluble en el estroma (Lütke-Brinkhaus y Kleinig, 1987).

Etapas 4. Desaturación de fitoeno.- Partiendo de fitoeno, y de acuerdo con la *Ruta de Porter-Lincoln*, licopeno se forma mediante sucesivas deshidrogenaciones, siendo los intermediarios sucesivos fitoflueno, ζ-caroteno y neurosporeno.

La determinación de esta ruta se realizó en base a un concienzudo estudio sobre el patrón de distribución de pigmentos en varios mutantes de tomate, debiendo hacerse constar que aún no se conocía la estructura de alguno de los pigmentos involucrados (Porter y Lincoln, 1950). Ya entonces también se apuntó la posibilidad de que fitoeno o fitoflueno fuesen los pigmentos en donde ocurrieran las isomerizaciones *cis/trans*, puesto que como se observaba, la mayoría de los carotenoides coloreados eran *trans*. Posteriormente, Clough y Pattenden (1983) han

demostrado que fitoeno es claramente el nivel al cual se da la isomerización *cis* transfiriéndola de ese modo a fitoflueno y carotenoides posteriores.

Etapa 5. Formación de carotenos cíclicos.- Como sugirieron Porter y Lincoln, la biosíntesis de carotenos cíclicos ocurre por ciclación de uno o los dos extremos finales de licopeno fundamentalmente, y de neurosporeno en casos más señalados. En plantas superiores los dos tipos de anillos encontrados son β y ϵ , siendo la biosíntesis de ambos anillos independientes y no por interconversión de los anillos β - en ϵ -, como se apuntó en un principio. La elucidación de este mecanismo se realizó por estudios con mevalonato marcado radioactivamente (Williams et al., 1967). Ambos tipos de anillos se generan a partir del mismo intermediario, un ión carbonio, que por eliminación de un protón, bien del C-6 o del C-4, origina un anillo u otro. Para que la ciclación tenga lugar es necesario que posea al menos un enlace doble a nivel C-7,8.

Los intermediarios monocíclicos de α -, β - y ϵ -caroteno son δ -caroteno y γ -caroteno, y dependiendo del tipo de anillo que se forme en el extremo libre de la molécula se formarán los respectivos carotenos bicíclicos correspondientes. Así mismo, la reacción de ciclación también puede ocurrir a nivel de neurosporeno, dando lugar a α - y β -zeacaroteno, los cuales se encuentran comúnmente en los granos de maíz.

La conversión de licopeno marcado radioactivamente en mono- y biciclo carotenos ha sido demostrada a partir de preparados de enzimas solubles de plastidios de tomate (Kushwaha et al., 1970; Papastephanou et al., 1973). De modo similar, utilizando cromoplastos de pimiento e incubándolos con neurosporeno y licopeno, Camara y Monéger (1982) han demostrado su transformación en β -caroteno, destacándose que licopeno era el sustrato utilizado preferentemente. Con posterioridad, se reprodujo la misma experiencia, pero en esta ocasión sólo se utilizaron membranas de cromoplastos, encontrando que licopeno era transformado en β -caroteno sin acumulación del intermediario γ -caroteno (Cámara et al., 1985b). En 1986, Camara y Dogbo, demostraron la presencia de la enzima licopeno ciclasa en membranas cromoplásticas de *Capsicum*.

Como evidencia adicional de que licopeno es el sustrato preferente en la ciclación están los estudios realizados *in vitro* con inhibidores de la ciclación como 2-(4-clorofeniltio) trietilamina hidrocloreuro (CPTA) y nicotina, causando ambos la acumulación de licopeno al

inhibirse la ciclación. El efecto del CPTA fue también estudiado en naranjas, las cuales después del tratamiento desarrollaron un intenso color rojo como el de los tomates maduros debido a la acumulación de licopeno (Yokoyama et al., 1971, 1972).

Etapa 6. Formación de xantofilas.- La inserción de oxígeno en forma de grupos hidroxilos y epóxidos tiene lugar tras la ciclación como último paso de la biosíntesis mediante la oxidación de los correspondientes carotenos. La hidroxilación ocurre principalmente a nivel del C-3 en uno o ambos anillos como se desprende de la mayor parte de la xantofilas hidroxiladas existentes como luteína, zeaxanteno, β -criptoxanteno, etc. Sin embargo también es posible la inserción de grupos hidroxilos en otras posiciones del anillo, como ocurre en lactucaxanteno (ϵ, ϵ -caroteno-3,3'-diol), e incluso de la cadena carbonada.

La mayoría de los estudios realizados en relación con la biosíntesis de xantofilas han sido efectuados con algas y bacterias debido a su fácil manipulación y versatilidad. No obstante en plantas superiores las transformaciones que tienen lugar son análogas, pudiendo extrapolarse los resultados en la mayoría de los casos. Así en plantas superiores, al igual que en bacterias, zeaxanteno se forma por hidroxilación de β -caroteno. El origen del oxígeno insertado es el oxígeno molecular (Yamamoto et al., 1962), y la reacción es catalizada por enzimas del tipo oxidasas (Goodwin, 1980) conservándose la configuración absoluta de la molécula (Milborrow, 1982).

Los carotenoides con grupos epóxidos se forman por oxidación de los correspondientes carotenos o xantofilas, así por ejemplo, violaxanteno, que contiene dos grupos epóxidos, se forma por epoxidación de zeaxanteno vía anteraxanteno, el derivado monoepóxido. Las xantofilas que de forma natural, y no como consecuencia de un procesado o manipulación, contienen grupos 5,8-epóxidos se forman por reorganización estructural a partir de grupos 5,6-epóxidos. Análogamente los carotenoides que contienen grupos alenos en su estructura se forman por reorganización de un grupo 5,6-epóxido, como ocurre en el mecanismo propuesto para la biosíntesis de neoxanteno a partir de violaxanteno (Davies et al., 1970).

En el caso concreto de la biosíntesis de xantofilas exclusivas del género *Capsicum*, el mecanismo para explicar la formación de los grupos acilciclopentanol ha sido y es motivo de amplia investigación. Al igual que con los grupos alenos, el mecanismo propuesto incluye la participación de grupos 5,6-epóxidos preexistentes, más concretamente de grupos 3-hidrox-

5,6-epóxido en el extremo de la molécula de xantofila precursora, que mediante una reorganización pinacólica da lugar al grupo acilciclopentanol (Cholnoky y Szabolcs, 1960; Weedon, 1967). De este modo β -criptoxanteno 5,6-epóxido es el precursor de criptocapsin, anteraxanteno lo es de capsanteno, y violaxanteno de capsorrubeno con capsanteno 5,6-epóxido como intermediario. Como confirmación de estos mecanismo se han realizado seguimientos de la carotenogénesis durante la maduración del pimiento, los cuales revelan estrechas relaciones precursor-producto entre xantofilas presentes (Valadon y Mummery, 1977; Rahman y Buckle, 1980). Así mismo existen pruebas concluyentes de estas transformaciones, como son la conversión *in vitro* de violaxanteno en capsorrubeno, y de anteraxanteno en capsanteno incubando las respectivas xantofilas precursoras con extractos de cromoplastos de *Capsicum* (Camara, 1980; Camara y Monéger, 1981).

4.- Propiedades químicas.

Los carotenoides son bastante estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan o cuando los carotenoides son extraídos con aceite o con disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. Aunque los carotenoides son relativamente resistentes al calor y a valores de pH extremos, estos agentes pueden provocar una transformación *cis-trans* de ciertos dobles enlaces, lo que puede modificar el color y el valor nutritivo. Al tratarlos con calor en ausencia de aire, existe una tendencia de algunos dobles enlaces *trans* de los carotenos a isomerizarse a *cis*.

En presencia de oxígeno, especialmente en alimentos deshidratados, la oxidación y decoloración tienen lugar con mucha rapidez. Los hidroperóxidos resultantes de la degradación de lípidos favorecen considerablemente la decoloración de los carotenoides. La degradación total de β -caroteno da lugar a un resto de β -ionona, compuesto volátil que proporciona al heno secado al sol, su olor característico. Son por tanto, muy sensibles a la oxidación por el oxígeno del aire, reacción catalizada por la luz, lipoxidasas y peróxidos lipídicos. Esta reacción es la responsable de la decoloración de algunos vegetales en conserva colocados en recipientes permeables a la luz, como zanahoria, melocotón, etc., (Goodwin, 1980).

En general los carotenoides presentan las propiedades químicas propias de los grupos que poseen. Los grupos 5,6-epóxidos se isomerizan rápidamente a 5,8-epóxidos en presencia de

ácidos diluidos. Los grupos carbonilos se pueden reducir con hidruros metálicos, tales como AlLiH_4 en éter etílico o NaBH_4 en etanol. Los hidroxilos primarios y secundarios se acetilan a temperatura ambiente con anhídrido acético en piridina, mientras que los terciarios no reaccionan bajo estas condiciones. Por otro lado, los grupos hidroxilos alílicos se pueden deshidratar al tratarlos con cloroformo acidificado

5.- Propiedades físicas.

5.1.- Espectro de absorción electrónica ultravioleta visible.- Debido al sistema de enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada, los carotenoides presentan un espectro de absorción muy característico en la región del visible. La posición de las bandas de absorción máxima, que normalmente son tres, es función del número de dobles enlaces de su molécula. Un incremento en este número provoca un desplazamiento a longitudes de onda mayores (20-22 nm por cada nuevo doble enlace conjugado), pero este efecto puede estar modificado por la ciclación. Si el anillo de β -ionona se convierte en α -ionona los máximos se desplazan a λ menores entre 9-11 nm. Contrariamente, si el anillo se abre, entonces el desplazamiento es hacia λ mayores. Cuando el doble enlace del grupo terminal se reemplaza por un grupo 5,6-epóxido ocurre una variación de 6-9 nm a λ inferiores. La conversión del grupo epóxido en 5,8 epóxido ocasiona un desplazamiento hipsocrómico de 19-22 nm. La introducción de un grupo hidroxilo no afecta mucho la posición de los máximos de absorción, y lo mismo ocurre con los grupos cetónicos no conjugados con la cadena de polienos, mientras que los conjugados desplazan los máximos 3-5 nm a la derecha. La isomería *cis-trans* sí tiene un profundo efecto en el espectro de absorción, apareciendo un nuevo máximo en torno a 325 nm. Las posiciones de los máximos de absorción pueden variar en función del disolvente empleado para obtener el espectro de absorción electrónica de un carotenoide, correspondiendo los valores más bajos en éter de petróleo ligero y los más altos en disulfuro de carbono.

Las variaciones estructurales también afectan la forma del espectro de absorción. Los carotenoides acíclicos presentan espectros con mucha mayor persistencia, esto es con alto grado de estructura fina, que aquellos carotenoides con anillos en su molécula. Por ejemplo, las bandas de onda corta de los carotenoides con dos grupos de β -ionona, se reducen a meras inflexiones. En algunos cetocarotenoides, donde el doble enlace $\text{C}=\text{O}$ se conjuga con la cadena de polienos, se pierden las tres bandas y se reemplazan por una banda ancha y casi completamente simétrica o por una única banda principal con inflexiones muy débiles a uno

y otro lado. En los carotenoides con grupos 5,8-epóxidos, generalmente las dos bandas de absorción a mayor longitud de onda, son de igual intensidad y están muy bien definidas, mientras que la banda a menor longitud de onda, aunque está presente, lo está mucho peor y es menos intensa.

5.2.- Otras propiedades espectroscópicas.- Los únicos carotenoides que pueden ser detectados por su fluorescencia a temperatura ambiente son el fitoflueno y sus derivados, que en placa fina bajo luz UV_{360nm} muestran una intensa fluorescencia verdosa. En solución etanólica fitoflueno presenta tres máximos de excitación a 333, 350 y 368 nm que aumentan linealmente con el logaritmo de la concentración. El máximo de emisión ocurre a 490 nm. La determinación del fitoflueno por fluorescencia es tres veces más sensible que por espectrofotometría (Davies, 1976).

El avance en los últimos años de la espectroscopía de infrarrojo (IR), que con la aparición de los FT-IR (espectrofotometría de infrarrojo por transformadas de Fourier) han dejado de lado a los anteriores aparatos de dispersión, ha permitido un manejo más fácil de los datos obtenidos con esta técnica. Esto, unido al desarrollo de sistemas informáticos más rápidos y fiables para el tratamiento de datos, ha favorecido en conjunto su mayor aplicabilidad. El espectro de IR da una información rápida sobre los grupos -OH (3400-3700 cm⁻¹) y C=O (1600-1740 cm⁻¹) presentes en muchos carotenoides (por ejemplo, luteína y capsanteno, respectivamente), siendo muy útil para detectar aquellos que son inaccesibles a los reactivos químicos como ocurre en fucoxanteno (Davies, 1976; Davies y Köst, 1988). Es también muy útil la información que esta técnica proporciona sobre dobles enlaces conjugados y enlaces C-H, presentes en todos los carotenoides, así como acerca de la isomería *cis/trans*. Los espectros resultantes son a su vez más sencillos cuanto más simétrica es la estructura. Como desventaja cabe destacar que la cantidad de muestra requerida es a veces superior a la que normalmente se dispone (pocos microgramos), lo que limita el empleo de la técnica. Sin embargo, otros tipos de espectroscopías (MS, NMR, Raman, etc.) han experimentado también un fuerte avance, dejando de lado la utilidad que en tiempos tuvo la IR para la elucidación estructural e identificación de grupos funcionales, pasando en muchos casos a ser una técnica auxiliar de otras más potentes.

6.- Propiedades nutricionales y beneficiosas de los carotenoides.

Desde el punto de vista nutricional la principal función fisiológica de los carotenoides es su capacidad como precursores de la vitamina A en los organismos animales, por lo que se dice que poseen valor de provitamina A (Isler, 1971; Simpson, 1983). Esta importante cualidad ha llevado a algunos autores a proponer una clasificación de aquellos según su actividad nutricional (en función de su carácter de provitamina A) y su actividad biológica (antiúlcera, anticáncer, reguladores inmunológicos, pigmentos fotosintéticos antena, etc.) (Olson, 1989).

La condición para que un carotenoide tenga tal actividad es que posea al menos un anillo terminal de tipo β no sustituido. De todos ellos β -caroteno es el que presenta mayor actividad potencial, ya que la rotura enzimática central de su molécula origina dos moléculas de vitamina A. Otros carotenos como α -caroteno, γ -caroteno o β -criptoxanteno sólo dan lugar a una molécula de vitamina A al poseer solamente un anillo β en su estructura (Pitt, 1971). La vitamina A es esencial para la visión nocturna o periférica y necesaria para mantener sanos la piel y tejidos superficiales. No se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, siendo las fuentes naturales el aceite de hígado de pescado y en menor proporción el hígado de mamíferos, los riñones, productos lácteos y huevos.

En mamíferos, incluyendo humanos, se ha comprobado que los carotenoides ingeridos en la dieta son en parte absorbidos tal cual y depositados en diversos tejidos, como adiposo y plasma, y en células como eritrocitos y leucocitos (Mathews-Roth, 1975, 1978), así como en la mácula donde se han encontrado luteína y zeaxanteno (Bone et al., 1985). El plasma es, entre los tejidos estudiados, el que mayor concentración de carotenoides presenta, estando éstos siempre asociados a lipoproteínas, principalmente a las de baja densidad LDL (Krinsky et al., 1958; Mathews-Roth y Gulbrandsen, 1974). Los carotenoides que más comúnmente se encuentran en estos tejidos son α -caroteno, β -caroteno, licopeno, zeaxanteno, luteína, cantaxanteno y β -criptoxanteno.

Existen estudios que relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, y por tanto también se consideran compuestos anticancerígenos (Olson, 1989; Bendich, 1989; Krinsky, 1989; Moon, 1989). Así mismo hay estudios que les confieren propiedades antiulcerosas por actuar como protectores de la mucosa gástri-

ca. Otros investigadores apuntan a relacionarlos con la respuesta inmunitaria, a modo de efectores positivos de ésta (Bendich, 1989). Por otro lado, Bushway (1986) sostiene que poseen efectos de "antienvjecimiento", y que existe una relación positiva entre la concentración de carotenoides, en suero y tejido cerebral, y la duración de vida de mamíferos.

7.- Transformación de carotenoides durante el almacenamiento y procesado de alimentos.

Las investigaciones sobre el efecto del almacenamiento y procesado sobre los carotenoides, se centran principalmente en el valor nutritivo de los alimentos y, por lo tanto, dirigidas al estudio de la retención de β -caroteno, el principal carotenoide con actividad de provitamina A. Los distintos procesados a que se someten la mayoría de los vegetales, implican tratamientos térmicos y exposición a la oxidación, favorecida por la luz y presencia de enzimas. En tales condiciones, los carotenoides presentes en los mismos son susceptibles a experimentar transformaciones. En general, en los vegetales sometidos a tratamientos con calor, congelación o durante el tiempo de envasado, no se encuentran pérdidas significativas en el contenido total de carotenos pero, durante el procesado de alimentos, suelen producirse reacciones de isomerización que reducen la capacidad de los carotenos como precursores de vitamina A. Sweeney y Marsh (1987), muestran una pérdida entre 15-30% de vitamina A debida a la conversión de *trans*- β -caroteno en su isómero *cis*, en vegetales procesados.

Durante el calentamiento se desorganiza la compartimentación celular de los vegetales y los complejos carotenoproteínicos, los cuales son más estables que los carotenoides libres, se destruyen quedando los carotenoides expuestos a la degradación. En ausencia de oxígeno, el único efecto del calentamiento es inducir la conversión de los isómeros naturales *trans* a isómeros *cis*, los cuales son menos estables y poseen menor actividad de provitamina A. Si durante el procesado se acorta el tiempo del tratamiento térmico, se reduce al mínimo la presencia de oxígeno, y se añaden antioxidantes, se consigue minimizar la oxidación de los carotenoides.

Los vegetales deshidratados experimentan la mayor degradación. Livingston et al. (1968), encuentran que existe una pérdida del 50% de xantofilas durante el proceso de deshidratación de harina de alfalfa, que podía estar relacionada con la temperatura empleada y la humedad de la harina. Por el contrario, el contenido total de β -caroteno se mantiene relativamente

inalterado aunque la proporción de isómeros aumenta con las elevadas temperaturas de deshidratación y los bajos niveles de humedad.

El secado por congelación se prefiere al secado por aire, el cual implica una mayor exposición al oxígeno y al calor. Los productos deshidratados, en polvo, o liofilizados, con un gran área superficial susceptible a la destrucción, son menos estables, por lo que tienen que ser almacenados en condiciones óptimas de actividad de agua, atmósfera inerte y en presencia de antioxidantes.

8.- Uso de los carotenoides como colorantes.

Aunque hasta hace poco tiempo el uso de carotenoides como colorante alimenticio era poco común y restringido por ciertas limitaciones, lo cierto es que hoy en día su uso ha aumentado paulatinamente lo cual puede explicarse en base a una serie de consideraciones que se citan a continuación:

- alta capacidad de pigmentación.
- no son tóxicos.
- amplia gama de colores, desde rojo a amarillo.
- existencia de preparados solubles en grasas y suspensiones acuosas.
- relativamente estables bajo condiciones reductoras.
- relativamente estables a la luz en atmósferas pobres en oxígeno.
- estable en rango de pH ácidos y neutros presentes en la mayoría de los alimentos.
- pueden ser utilizados en combinación con otros colorantes.
- posibilidad de suministro comercial constante.

De este modo, en la industria alimentaria encuentran gran aplicación los extractos de pimiento, pimentón y oleorresinas, así como extractos de alfalfa, tomate y zanahoria, aportando a los alimentos coloraciones del amarillo al rojo. No obstante la utilización de estos compuestos naturales ha sido reemplazada en gran medida por carotenoides sintéticos, idénticos a los naturales pero producidos a gran escala mediante síntesis química o más recientemente por procedimientos biotecnológicos mediante el uso de microorganismos, obteniéndose por ambos métodos cantaxantina, licopeno, astaxanteno, β -apo-8'-carotenal y β -caroteno. Este último es el más utilizado por su elevado valor de provitamina A, y

proporciona colores amarillentos y anaranjados, mientras que los otros compuestos suministran un matiz más rojizo. Estos carotenoides se añaden directamente a los alimentos para consumo humano, como chacinas, embutidos, quesos, margarinas, bebidas, zumos, helados, etc. (Bauernfield, 1981; Coultate, 1984).

III. ANALISIS DE PIGMENTOS EN VEGETALES.

1.- Técnicas de extracción.

La primera etapa de todo método analítico incluye una fase de aislamiento y enriquecimiento del analito. En el caso de tratarse de pigmentos cloroplásticos, la extracción de los mismos se suele realizar mediante el uso de solventes orgánicos, existiendo en la bibliografía una gran diversidad en cuanto al tipo de solvente utilizado, tanto puro como en mezclas (metanol, etanol, acetona, N,N-dimetilformamida, piridina, tetrahidrofurano acetato de etilo/hexano, etanol/éter de petróleo, metanol/éter de petróleo, acetona/metanol y acetona/acetato de etilo).

Así mismo, se recomienda que todo proceso de extracción se acompañe de una etapa de homogeneización del tejido vegetal a fin de mejorar el contacto con el agente extractante. Tras esta operación la mezcla se filtra (papel de filtro, vidrio sintético, tierras de diatomeas) o se centrifuga para recuperar los sólidos, aunque se prefiere la primero ya que garantiza mejor la eliminación de los mismos. En los casos en que la extracción de pigmentos no es total se recomienda un segundo tratamiento con disolvente. Todas las operaciones deben llevarse a cabo con las máximas precauciones para minimizar la degradación de clorofilas, siendo útil trabajar bajo luz tenue. Se ha recomendado la adición de CaCO_3 , MgCO_3 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NH_4OH o dimetilnilina durante el triturado para prevenir la formación de feofitinas, sobre todo en plantas con citoplasma ácido (Arkcoll y Holden, 1973; Bureau y Bushway, 1986; Kan et al., 1985).

Algunos autores recomiendan el uso de soluciones acuosas de acetona, oscilando la proporción del agua hasta el 20% (v/v), pero ocurre que por encima del 10%, clorofila *a*, al ser la menos polar, no se extrae totalmente. Por otro lado concentraciones de agua

superiores pueden prevenir la conversión de clorofilas en clorofilidas por acción de clorofilasa lo cual puede ser a veces beneficioso (Lichtenthaler, 1987). En otros casos se sugiere un paso inicial con acetona 100% para obtener la extracción completa de clorofilas (Sweeney y Martin, 1958; Buckle y Edwards, 1970; Schwartz et al., 1981).

Moran y Porath (1980) utilizan N,N-dimetilformamida para la extracción de clorofilas en tejidos intactos de plantas de bajo contenido en clorofilas, tales como pepinillos, disminuyendo la potencial pérdida de estos pigmentos durante la trituración o centrifugación. Esta técnica es de gran importancia en el desarrollo de metodologías para plantas que contengan pequeñas cantidades de clorofilas. La N,N-dimetilformamida se ha usado recientemente por Mínguez y Garrido (1989a) para la extracción de clorofilas y carotenoides en presencia de grandes cantidades de lípidos. Mediante fraccionamiento de componentes por reparto entre las fases N,N-dimetilformamida y hexano se consigue una solución de pigmentos sin interferencia de lípidos. Mínguez et al. (1991b) emplean este sistema para la decoloración de aceites vegetales y oleorresinas, con una recuperación total de pigmentos inalterados.

Numerosos investigadores han propuesto la saponificación como método eficaz de purificación de carotenoides, eliminando con dicha operación lípidos y clorofilas (Davies, 1976; Heinonen et al., 1989). Aunque la purificación de xantofilas y carotenos por saponificación es una técnica usual, se han descrito algunos carotenoides sensibles al medio alcalino (Liaaen-Jensen, 1971). Khachik et al. (1986) investigaron el efecto de la saponificación en la distribución cualitativa y cuantitativa de extractos de carotenoides procedentes de diversos vegetales, encontrando que durante la saponificación se producían pérdidas significativas de xantofilas, particularmente los epoxicarotenoides, mientras que los carotenos no se afectaban significativamente.

En la actualidad se está imponiendo cada vez con mayor aceptación la técnica de extracción con fluidos supercríticos, principalmente CO₂, siendo ésta una posible alternativa para la extracción de pigmentos cloroplásticos, acortándose el tiempo de análisis, utilizando como extractante un gas inocuo, y realizándose a temperaturas cercanas a la ambiente. *A priori* parece ser que tiene grandes ventajas sobre las técnicas tradicionales, pero el gran vacío en cuanto al conocimiento y aplicaciones hace que aun muchos laboratorios se muestren recelosos en su utilización.

2.- Separación de pigmentos.

Desde que en 1906, Tswett realizara la primera separación de compuestos, concretamente clorofilas y carotenoides, aprovechando la diferente afinidad de los mismo con respecto a un soporte, abrió paso a una de las técnicas de separación más potente y versátil, la cromatografía. Inicialmente la técnica más utilizada fue la cromatografía en columna abierta, donde la elección de los adsorbentes se efectuaba en base a su selectividad y a la no reactividad con los pigmentos y/o los solventes (Strain y Svec, 1969; Strain y Sherma, 1972). Algunos adsorbentes inorgánicos alteran las moléculas de clorofilas provocando isomerización y los que poseen carácter ligeramente ácido inducen su degradación a feofitinas (Bacon y Holden, 1967; Strain y Svec, 1969; Holden 1976). Como ejemplos de adsorbentes usados se pueden citar almidón, celulosa, algunos tipos de azúcares, polietileno, sílice, tiza precipitada, fosfato cálcico, y alúmina (Smith y Benítez, 1955; Sweeney y Martin, 1961; Tan y Francis, 1962; Anderson y Calvin, 1962; Perkins y Roberts, 1962; Jones, 1963; Bacon, 1965; Stobart et al., 1967; Jeffrey, 1968; De la Mar y Francis, 1969). Así mismo, la cromatografía de pigmentos cloroplásticos sobre papel ha sido bastante utilizada como medio de separación de los mismos (Sanger, 1971; Burke y Aronoff, 1980; Sêsták, 1980).

No obstante, tanto la técnica de cromatografía en columna como en papel han sido completamente relegadas y sustituidas por la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que son más sensible, rápidas y versátiles.

2.1.- Cromatografía en capa fina (TLC).- La asequibilidad y simplicidad de esta técnica han permitido que se emplee ampliamente para separar y controlar pigmentos carotenoides en multitud de investigaciones, existiendo monografía exclusivamente dedicadas a estas aplicaciones. Los adsorbentes usados incluyen silicagel u otros silicatos, celulosa, azúcar, y octadecil (C_{18}) enlazado con silicagel. Aunque algunos autores han señalado que la TLC puede producir artefactos y/o productos de descomposición causados por la luz, la acidez de la sílice, métodos de secado, oxidación y/o solventes, con fines cualitativos de identificación y guardando las debidas precauciones es una técnica insustituible (Bacon, 1966; Strain et al., 1967; Strain y Svec, 1969; Holden, 1976; Lord y Tirimanna, 1976; Buckle y Rahman, 1979; Mínguez-Mosquera et al., 1989b).

2.2.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).- El vertiginoso avance de esta técnica con destacadas ventajas sobre las demás, rapidez, sensibilidad y alta reproducibilidad, la coloca a la cabeza de todas las técnicas cromatográficas. La alta resolución de las columnas de HPLC permite la separación individual de clorofilas y carotenoides a partir de mezclas complejas. El tiempo de análisis, incluyendo la preparación de la muestra, es generalmente menor que con otros métodos cromatográficos. En algunos casos la separación se completa en 30 min. La interacción de estos pigmentos con la luz los hace particularmente apropiados para el uso de HPLC ya que la espectrofotometría se usa como medio de detección. La alta sensibilidad de los detectores UV-visible y de fluorescencia permiten el análisis de muestras de pequeño tamaño a la vez que se pueden cromatografiar grandes cantidades usando HPLC preparativa, la cual es particularmente cómoda para recoger los componentes individuales puros.

La primera aplicación de la HPLC al análisis de pigmentos cloroplásticos se debe a Evans et al. (1975). Desde entonces se han realizado numerosas investigaciones acerca de su aplicación a la separación de carotenoides, clorofilas y derivados clorofílicos en tejidos vegetales y fitoplacton marino. Puede hacerse una distinción entre aquellos autores que emplean cromatografía en fase normal, principalmente sobre columnas de gel de sílice (Iriyama et al., 1978; Jacobsen, 1978; Yoshiura et al., 1978), y aquellos que lo hacen en fase reversa, en general sobre columnas de funcionalidad C_{18} . Este último tipo de columnas parece tener ciertas ventajas en relación con las primeras ya que se evitan problemas de degradación de pigmentos, así como tiempos de acondicionamiento excesivamente largos (Mantoura y Llewellyn, 1983; Wright y Shearer, 1984).

En general los métodos en fase reversa emplean distintas mezclas formadas por metanol/acetona (Schoch et al., 1978), metanol/agua (Braumann y Grimme, 1979) o metanol/acetona/agua (Rebeiz et al., 1978) de forma isocrática o en gradiente. Otros investigadores añaden a la mezcla metanol/agua un modificador de la fase en forma de gradiente que puede ser acetona (Mantoura y Llewellyn, 1983) o acetato de etilo (Eskins y Dutton, 1979; Eskins y Harris, 1981; Schwartz et al., 1981; Schwartz et al., 1983) o THF (Craft et al., 1992). También se ha descrito la adición de ciertos reactivos a la fase móvil para mejorar la resolución de los derivados clorofílicos defitilados (Davies y Holdsworth, 1970; Mantoura y Llewellyn, 1983). La adición de un reactivo de pares iónicos (fosfato de tetrabutilamonio) a la mezcla metanol/agua mejora la resolución de las mezclas complejas.

En este sentido, Mínguez et al. (1991c) estudian los cambios que experimentan clorofilas y carotenoides durante el proceso de fermentación láctica de aceitunas verdes de mesa, utilizando una fase reversa con un sistema de elución en gradiente que también incluye un reactivo de pares iónicos en la mezcla de elución. Posteriormente, los mismos autores (1993b) adaptan el sistema para la separación de feoforbidas y derivados clorofílicos en alto grado de oxidación.

Schwartz et al. (1981) analizan mediante HPLC los pigmentos presentes en espinacas frescas, escaldadas, congeladas y enlatadas. La separación de los pigmentos se lleva a cabo con una columna de fase reversa usando un gradiente de elución con la mezcla metanol/agua/acetato de etilo. Aplicando esta metodología se identifican, por primera vez, pirofeofitinas en extractos de espinacas enlatadas. Similares condiciones fueron usadas por Schwartz (1984) para separar complejos de feofitinas de zinc y cobre.

En general, la detección de los pigmentos mediante el uso de la espectroscopía UV-Vis, se realiza entre 380-450 nm que es la zona de máxima absorción tanto para clorofilas como para carotenoides, proponiéndose la detección selectiva de clorofilas y derivados a 654 nm (Schwartz et al., 1981) ó 667 nm (Schoch et al., 1978) para eliminar interferencias de los carotenoides. Así mismo se ha propuesto la detección de clorofilas y derivados por emisión de fluorescencia que es mucho más sensible que la absorción y que además también elimina la interferencia de los carotenoides (Brown et al., 1981; Shioi et al., 1984).

Así mismo, se han desarrollado métodos específicos de HPLC para la separación de carotenos con actividad de provitamina A. Estos sistemas tienen por objeto separar no sólo los distintos isómeros posicionales de carotenos sino también sus estereoisómeros ya que no todos ellos tienen la misma actividad provitamínica (Stancher y Zonta, 1982). Inicialmente se emplearon fases estacionarias muy polares como alúmina (Vecchi et al., 1981) o hidróxido de calcio (Tsukida et al., 1982; Chandler y Schwartz, 1987; Pettersson y Jonsson, 1989). Estos tipos de soportes tienen el inconveniente de ser inestables frente a pequeñas cantidades de agua, necesitando largos tiempos de acondicionamiento y no ser asequibles comercialmente.

El alto estatus de sofisticación que goza hoy en día la técnica de HPLC, garantiza una gran reproducibilidad y precisión en los métodos. No obstante, en lo que se refiere a

pigmentos cloroplásticos, y fundamentalmente a las muestras complejas obtenidas a partir de alimentos procesados, se necesitan esfuerzos adicionales encaminados a obtener mejores resultados en la separación de productos de degradación e isómeros. En este sentido, se esperan bastantes avances con el desarrollo de los sistemas acoplados HPLC-espectrometría de masas, e incluso el tandem HPLC-MS-PDA, con los cuales es factible la identificación de pigmentos a nivel de trazas.

IV. PIGMENTOS CAROTENOIDES EN EL PIMIENTO.

El color rojo intenso de los frutos maduros del género *Capsicum* ha venido despertando la curiosidad desde antiguo en multitud de investigadores, pudiendo decirse que muchos avances realizados en el campo de los carotenoides se han llevado a cabo durante el estudio de los pigmentos presentes en los frutos del pimiento.

En 1927, Zechmeister y Cholnoky aislaron por vez primera en estado cristalino el pigmento que mayoritariamente confiere la coloración roja al pimiento maduro, siendo llamado desde entonces "capsanteno". Posteriormente, estos mismos autores mediante la aplicación de la técnica de adsorción cromatográfica propuesta por Tswett, consiguieron separar y aislar otro carotenoide rojo a partir del pimiento, siendo llamado "capsorrubeno" (Zechmeister y Cholnoky, 1934). Para ambos se dedujo que debían contener al menos un grupo cetónico en su molécula. Mediante el mismo procedimiento, en poco tiempo se aislaron xantofilas como zeaxanteno, luteína, β -criptoxanteno, así como β -caroteno y algunos otros polienos no identificados. Por aquel entonces, también era conocido el hecho de la esterificación de xantofilas con ácidos grasos, tales como mirístico y palmítico.

Posteriormente, en 1937 Cholnoky consiguió cuantificar por primera vez los carotenoides presentes en variedades húngaras de pimiento rojo, encontrándose que capsanteno es siempre el pigmento mayoritario, seguido del resto de xantofilas. Más tarde, en 1955 el mismo autor realizó un estudio detallado de los cambios producidos durante el desarrollo y maduración de frutos de la variedad húngara *C. annum licopersiforme rubrum*. Encontró que en los frutos verdes el patrón de pigmentos era el propio de cloroplastos, mientras que en el fruto maduro dicho patrón cambiaba drásticamente, apareciendo nuevas xantofilas como zeaxanteno, β -criptoxanteno, anteraxanteno, y diversos carotenoides

conteniendo grupos epóxidos en su molécula. Encontró que el pimiento rojo contenía 35 veces más carotenoides que el verde. Durante este mismo trabajo se describió por primera vez un tercer pigmento rojo, llamándose criptocapsin, y sugiriéndose por primera vez la posibilidad de biosíntesis de estos pigmentos a partir de xantofilas con grupos epóxidos. Por esta época ya se intuía la exclusividad de estos pigmentos en el género *Capsicum*.

Tres años más tarde, Cholnoky et al. (1958) investigaron la composición pigmentaria existente en pimientos de la variedad húngara *C. annuum licopersiforme flavum*, caracterizados por presentar un color amarillo intenso en el estado de total madurez. Encontraron que en esta variedad no se formaba los característicos carotenoides rojo y que había acumulación de xantofilas con grupos epóxidos, hecho que parecía apoyar la teoría biosintética antes expuesta.

En 1960, Entschel y Karrer, así como Barber et al. (1960), realizaron los primeros trabajos encaminados a la dilucidación estructural de capsanteno y capsorrubeno, demostrando que contienen uno y dos anillos de ciclopentanol respectivamente, los cuales son adyacentes de sendos grupos cetónicos incluidos en el sistema de dobles enlaces conjugados. Hasta entonces no se habían descrito estos grupos funcionales en carotenoides. A partir de estudios mediante degradación química, estos mismos autores volvieron a sugerir la síntesis de estos grupos funcionales a partir de grupos 5,6-epóxidos por reorganización pinacólica. Esto fue demostrado posteriormente por Faigle y Karrer (1961), y Weedon (1967) a partir de grupos 3-hidroxi-5,6-epóxido por reorganización pinacólica. Análogamente, en 1969 Cholnoky et al., demostraron que partiendo de los mismos grupos también se forman los correspondientes 3,5-dihidroxi-aleno característico de neoxanteno, siendo posteriormente confirmado por Davies et al. (1970).

A principio de los años sesenta, Curl (1962, 1964) realizó investigaciones similares a las de Cholnoky en variedades americanas de pimiento, encontrando resultados similares en cuanto al patrón de pigmentos presentes en los estados verde y maduro. No obstante encontró al menos ocho pigmentos minoritarios no descritos hasta el momento, entre los que destacaba capsanteno 5,6-epóxido y capsoluteína.

En 1968, Egger realizó los primeros estudios encaminados a la separación e identificación de las xantofilas esterificadas. Para ello desarrolló la técnica de cromatografía en celulosa

impregnada de aceite logrando aislar hasta 60 compuestos diferentes, cada uno de ellos correspondiente a una xantofila esterificada con ácidos grasos como palmítico, mirístico y láurico. Trabajos similares fueron realizados posteriormente por Philip et al. (1971) en pimentón.

Las investigaciones realizadas por Davies et al. (1970) sobre variedades ornamentales de pimiento, permitieron establecer en base a la distribución de carotenoides encontrada, un esquema de la biosíntesis de tales pigmentos en el pimiento. La ruta biosintética propuesta fue posteriormente confirmada por los detalladísimos estudios realizados por Valadon y Mummery en 1977, y continuado por los trabajos de Rahman y Buckle (1980).

Hoy en día, el esquema básico de la ruta biosintética mediante la cual se forman los principales carotenoides en el pimiento está totalmente establecida y sólo difiere en ciertos detalles de los sugerido por los autores mencionados anteriormente. En la actualidad el interés está centrado principalmente en el estudio a nivel bioquímico y genético de estas reacciones, habiéndose aislado gran número de enzimas que participan en estos procesos. La mejora genética de las diferentes variedades con vistas a aumentar su contenido carotenoide debe apoyarse en un profundo conocimiento de todas las reacciones implicadas para poder actuar en la dirección adecuada.

Al mismo tiempo que se han ido realizando estudios en frutos de pimiento, se ha realizado investigaciones en torno a productos derivados del mismo, principalmente pimentón y oleorresinas. La mayoría de estos trabajos han ido encaminados a investigar aspectos relacionados con la estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el procesado de los frutos y el almacenamiento, así como la puesta a punto de métodos analíticos para la evaluación del color en estos productos. Los primeros trabajos en este sentido se deben a Moster y Prater (1952) que desarrollan un método de medida espectrofotométrica del color en pimentón mediante la extracción con alcohol. Posteriormente, basándose en los trabajos de Shuster y Lockhart (1953), los cuales utilizaban extracción con acetona por maceración durante 24 horas, optimizan el proceso de extracción del color utilizando isopropanol durante 3 horas.

Haciendo uso de los métodos desarrollados por los autores antes mencionados, Lease y Lease (1956) realizan una interesante investigación de los factores que afectan a la retención

del color en pimentones de diversa procedencia. Estos autores encuentran una gran dependencia de la retención del color con la temperatura, humedad y tiempo de almacenamiento, así como la forma de cultivar el pimiento, su recolección, el grado de madurez, abonado y otros factores.

Posteriormente autores como Francis, De la Mar, Ramakrishnan, Philip y Nawar han estudiado en profundidad la estabilidad de los pigmentos del pimentón en diversas condiciones, encontrando que los procesos que generan la pérdida de los compuestos carotenoides en el pimentón son de tipo oxidativo (De la Mar y Francis, 1969; Ramakrishnan y Francis, 1973). Así mismo algunas de estas investigaciones se han centrado en los pigmentos mayoritarios del pimiento y pimentón, dedicándose principalmente al estudio de capsanteno y sus formas de esterificación. Encuentran que capsanteno aparece en el pimiento principalmente como dilaureato y estudian los productos que se producen en su oxidación (Philip et al., 1971; Philip y Francis, 1971).

Con el desarrollo de la técnica de TLC y HPLC se produce un incremento de los trabajos que estudian la estabilidad de carotenoides en el procesado de productos vegetales. No obstante la compleja composición carotenoide que posee el pimiento rojo obliga a la puesta a punto de métodos cromatográficos específicos. Las primeras aplicaciones de la TLC a la separación de pigmentos carotenoides en extractos saponificados de pimiento se debe a Vinkler y Kizsel-Richter (1972). Estos autores elaboran un método que utiliza Kieselgel G como soporte cromatográfico y la mezcla éter de petróleo/benceno/ácido acético/acetona (40:10:2.5:2.5) como eluyente con el que consiguen separar las xantofilas y carotenos mayoritarios, que posteriormente tras su elución son evaluados espectrofotométricamente.

La primera aplicación de la técnica de HPLC para la separación y cuantificación de pigmentos carotenoides en pimiento se debe a Baranyai et al. (1982), para lo cual utilizan una modificación del método propuesto por Lange (1976). Posteriormente han surgido multitud de métodos de análisis mediante esta técnica, los cuales han ido ganando en sofisticación conforme han sido mejoradas los soportes cromatográficos y las técnicas de detección. De este modo se pueden citar como muy interesantes los métodos propuestos por Iriyama et al. (1978), Bushway y Wilson (1982), Noga y Lenz (1983), Rahmani y Saari-Csallany (1985), Pavisá et al. (1987), Biacs et al. (1989) y Almela et al. (1992).

En España, siendo una de las primeras potencias mundiales en la producción de pimiento pimentonero y pimentón, sorprendentemente la investigación en este campo ha estado ignorada, no por el desconocimiento de su importancia, sino más bien por la complejidad de su estudio. Los primeros estudios en profundidad fueron realizados en los años 70, pudiendo destacarse por un lado los trabajos dirigidos por J. Costa en relación a la selección y mejora genética de variedades cada vez más aptas para su transformación en pimentón, así como los estudios realizados por Fernández Díez y Mínguez Mosquera en relación al pimiento morrón y cinta de pimiento utilizados en el relleno de la aceituna verde de mesa. En los años 80, el grupo dirigido por M.I. Mínguez inicia los primeros estudios conducentes a conocer en detalle la composición carotenoide de los pimientos y pimentones españoles. Durante estos primeros estudios se introduce el concepto de relación de pigmento rojos a amarillos (R/Am), que permite mediante la separación previa de dichas fracciones de pigmentos por TLC evaluar la calidad del pimiento y pimentón (Mínguez y Fernández, 1981; Mínguez et al., 1984), así como indicar una posible adulteración del color por adición de colorantes (Mínguez et al., 1992).

EXPERIMENTAL

I. MATERIA PRIMA.

El estudio se realiza en dos variedades de pimiento pimentonero (*Capsicum annuum* L.), *Bola* y *Agridulce*, cultivadas ambas en la comarca de La Vera en el norte de la provincia de Cáceres, una de las zonas productoras tradicionalmente más importante de pimiento pimentonero y pimentón de España. Tanto los frutos como el pimentón fueron suministrados por la empresa T. Pérez Trancón, S.A. (Cuacos de Yuste, Cáceres).

Los frutos de la variedad *Bola* tienen forma esferoidal, con un diámetro que puede alcanzar los 4-6 cm, presentan un pericarpio bastante carnoso y su peso medio oscila entre 20 y 30 gramos. Los frutos de la variedad *Agridulce*, autóctona de La Vera, presentan una forma alargada (15-25 cm) y curva en la mayoría de los casos, su es pericarpio fino y su peso medio oscila entre 15-25 gramos.

1.- Cambios en los pigmentos cloroplásticos y actividad clorofilasa durante la maduración de los frutos.

El estudio se realiza durante dos campañas consecutivas (1992 y 1993), eligiéndose en el primer año 3 estados de madurez. En el segundo año se realizaron dos recolecciones, una a principio de campaña (finales de Septiembre) y otra a final de campaña (mediados de Octubre), siendo recolectados los frutos en cinco estados sucesivos y bien diferenciados de madurez en función del color externo. A continuación se describen brevemente los estado de madurez seleccionados:

- V: Color verde intenso. Fruto completamente formado. Inmaduro.
- CI: Color cambiante. Predominantemente verde con zonas naranja y rojizas.
- CII: Color cambiante. Predominantemente naranja o rojizo con zonas verdes.
- RI: Color rojo anaranjado. Placenta de color blanco o rosa.
- RII: Color rojo intenso. Placenta de color rojo. Maduro.

En la Figura 10 se muestran fotografías de los estados de madurez anteriormente descritos para la variedad *Bola* y *Agridulce* respectivamente.



Figura 10: Estados de madurez estudiados durante la maduración de frutos de pimientos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Dado que la planta del pimiento fructifica de forma escalonada, y que en una misma plantación es posible encontrar al mismo tiempo todos los estados de madurez antes citados, esto posibilita poder realizar la toma de muestra de una sola vez para cada recolección. Se recogieron manualmente unos cinco kilos de pimiento en cada estado de madurez, que posteriormente fueron reclasificados en el laboratorio. Inmediatamente se procede a preparar la muestras, para lo cual se trocearon 200 gramos de pimientos en cada estado y se tomaron cuatro muestras alícuotas de 10 gramos en frascos de vidrio y se congelaron inmediatamente a -20°C. En todas las muestra se determina el contenido individual de pigmentos clorofílicos y carotenoides, así como la actividad de enzima clorofilasa frente a clorofila *a*.

2.- Cambios en la composición carotenoide durante el proceso de elaboración de pimentón.

Se emplean frutos de ambas variedades recogidos de la planta en el estado de madurez completa (pansios). El procesado de los mismos se ha realizado en la industria antes citada. El sistema de elaboración en líneas generales consiste en un secado tradicional empleando secaderos de leña de encina o roble. Esta etapa dura unos 15 días y durante la misma se alcanzan temperaturas que rondan los 40-60°C, lo que permite un secado lento y reduciéndose la humedad de los frutos al 15%. La cascara seca obtenida se tritura y se retiran semillas (binza) y pedúnculos. La cáscara se moltura en molinos de martillo y posteriormente se le dan unas pasadas en el molino de piedra (piedra de refino) hasta alcanzar la granulometría adecuada según el mercado, la cual se estandariza por tamizado. Durante el proceso de molturación se suele añadir una cantidad dada de semillas de pimiento a fin de estandarizar el color final del producto. Así mismo es habitual añadir una pequeña cantidad de aceite o agua, inferior al 10%, durante la molturación en el molino de piedra para aglomerar las partículas finas y dar mejor aspecto al producto final.

Se toman muestras de fruto fresco y maduro, pimiento seco (cáscara) y pimiento molido (pimentón). En todas ellas se analizan los pigmentos carotenoides por cuadruplicado.

II. METODOLOGIA

IIa. CONTROL DE PIGMENTOS.

1.- Extracción de pigmentos.

El proceso de preparación de muestra para el análisis de clorofilas y carotenoides en los frutos del pimiento incluye siempre una etapa de extracción de pigmentos, utilizándose para tal fin disolventes orgánicos. El método puesto a punto, y que se describe a continuación, puede considerarse de aplicación general para tejidos vegetales que no sean ricos en grasas. Se pesan 10 g de pimiento troceado y se tratan con 50 ml de acetona y con ayuda de un homogenizador tipo Ultraturrax. La operación se repite hasta que no se extraiga mas color, siendo por lo general suficiente 4 o 5 veces. Los extractos se reúnen en embudo de decantación y se tratan con 100 ml de éter etílico, agitando vigorosamente, para transferir los pigmentos a la fase etérea. A continuación se añaden 100 mL de solución al 10% de NaCl, se agita durante un minuto y se deja reposar a fin de separar las fases. Se recoge la fase etérea que contiene los pigmentos y la fase acuosa se descarta, salvo en el caso de presentar coloración lo cual obliga a tratarla de nuevo con éter etílico.

El extracto etéreo, que contienen los pigmentos en solución, se lava sucesivas veces sulfato sódico al 2% (p/v). Llegados a este punto y dependiendo de la presencia o no de clorofilas en la muestra, o de querer estudiar el grado de esterificación de los pigmentos, hay que operar de un modo u otro. En el caso de haber clorofilas y querer analizarlas deberemos filtrar la fase etérea a través de filtro con lecho de sulfato sódico anhidro pasando a un matraz de rotavapor para concentrar, a presión reducida y a temperatura menor de 30°C. El residuo seco se disuelve en 25 mL de acetona trasvasando a matraz aforado, y se guarda una alícuota de 0.5 mL en un vial en cámara frigorífica a -30°C hasta su análisis. El resto de la disolución se trasvasa a un embudo de decantación, se le añaden 100 mL de éter etílico y se saponifica como posteriormente detallaremos. En el caso de tratarse de muestras de pimiento rojo, pimentón u oleorresina el extracto etéreo se somete directamente a saponificación.

En el caso de tratarse de muestras de pimentón la cantidad de muestra a procesar es de 1.0 a 1.5 gramos. Las muestras de pimentón se procesan de modo similar al pimiento pero utilizando acetona acuosa al 10% para la extracción. Todas las operaciones deben ser llevadas

a cabo lo mas rápidamente posible, y preservando a los pigmentos de cualquier fuente de radiación luminosa y de calor.

Dada la cantidad de operaciones que incluye todo el proceso de preparación de la muestra, la inherente baja estabilidad de los pigmentos, así como la dificultad añadida de procesar muchas muestras al mismo tiempo, se vio necesaria la adición de un patrón interno al comienzo del proceso de preparación de la muestra, lo cual minimiza los errores, simplifica las operaciones volumétricas y facilita, como posteriormente discutiremos, la cuantificación cromatográfica. El patrón interno elegido fue β -Apo-8'-carotenal, carotenoide disponible comercialmente y ausente en el pimiento en cualquier estado de maduración. El modo de operar consiste en añadir un volumen de disolución de concentración conocida de dicho pigmento sobre la muestra justo en el momento de realizar la extracción con acetona. La cantidad añadida suele rondar los 100 μg para pimiento verde y cambiante, y 250 μg para pimiento rojo, pimentón y oleorresinas.

2.- Saponificación del extracto de pigmentos.

Tanto la identificación de carotenoides, como su separación y cuantificación se simplifica si se realiza con los pigmentos en su forma libre, por ello en el caso de tratarse de extractos procedentes de pimientos en estado cambiante o rojo, dicho extracto se debe saponificar para de ese modo reducir todas las formas de esterificación de cada pigmento a una sola, la libre.

El procedimiento utilizado con estos fines consiste, en líneas generales, en un tratamiento del extracto etéreo de pigmentos con potasa alcohólica. Existen pequeñas variaciones entre los distintos métodos que da la bibliografía (Jungalwala y Cama, 1962; De la Mar y Francis, 1969; Rodríguez et al., 1973), adoptando en nuestro caso la forma operativa siguiente:

El solución etérea procedente de la extracción de pigmentos se somete a saponificación mediante adición de 100 mL de KOH-MeOH al 20% (p/v), se agita vigorosamente durante un minuto y se deja actuar durante una hora. En el caso de tratarse de una oleorresina el tiempo se amplía a dos horas. Transcurrido ese período de tiempo se añade agua destilada para producir la separación de fases, lavando la fase etérea con agua destilada hasta neutralidad. Seguidamente se lava dos veces con disolución de sulfato sódico al 2% (p/v). Finalmente, se pasa a través de filtro con lecho de sulfato sódico anhidro, a un matraz de



rotavapor para concentrar, a presión reducida y a temperatura menor de 30°C. El residuo seco se disuelve con 25 mL de acetona y se guarda una alícuota en cámara frigorífica a -30°C hasta su análisis cromatográfico.

3.- Separación y purificación de pigmentos por TLC.

La separación general de pigmentos se verifica sobre placas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas en el laboratorio con gel de sílice 60 GF₂₅₄ (Merck n° 7730) y de espesor 0.7 mm. Una vez secas al aire, las placas deben ser activadas antes de su uso durante una hora en estufa a 120°C. Con fines cualitativos se emplean placas flexibles de poliéster (40 x 80 mm) recubiertas de gel de sílice con indicador fluorescente UV₂₅₄, (Scharlau, S.A.) de 0.25 mm de espesor. La cromatografía se desarrolla en cámara saturada, empleando los siguientes líquidos de desarrollo, según finalidad:

- Eter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1), para separación general de pigmentos de frutos verdes y extractos saponificados (Mínguez Mosquera y Garrido Fernández, 1989a).
- Diclorometano/acetato de etilo (4:1) para la purificación de luteína (Foppen, 1971).
- Benceno/acetona (4:1) para purificar clorofilas, violaxanteno y neoxanteno (Foppen, 1971).
- Benceno/éter de petróleo ligero 40-60°C (1:1) para purificar zeaxanteno y β -criptoxanteno.
- Hexano/acetato de etilo/etanol/acetona (95:3:2:2) para la separación capsanteno, capsorrubeno, zeaxanteno y β -criptoxanteno esterificados, así como β -caroteno Mínguez-Mosquera et al. (1984).

4.- Identificación.

4.1.- Clorofilas y derivados.

4.1.1.- Obtención de patrones.

- Clorofilas *a* y *b*. Se aislan indistintamente de frutos verdes de pimiento, hojas frescas de espinacas, y de hojas de *Menta arvensis*, mediante extracción de pigmentos con acetona

y posterior separación de los mismos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (Holden, 1976; Mínguez y Garrido, 1985).

- **Feofitinas a y b.** Se preparan a partir de las respectivas soluciones puras de clorofilas en éter etílico, por acidificación con varias gotas de HCl al 13% (v/v). Se agita la mezcla en embudo de decantación durante cinco minutos y transcurrido ese tiempo se elimina el ácido lavando con solución de Na₂SO₄ al 2%. Finalmente, la fase etérea se seca mediante filtración a través de lecho de Na₂SO₄ anhidro (Holden, 1976; Sievers y Hynninen, 1977).

- **Clorofilidas a y b.** Se obtienen mediante incubación de soluciones puras de las correspondientes clorofilas con enzima clorofilasa, según adaptación de los métodos propuestos por Holden (1976) y Jones et al. (1972). Como material biológico se utilizan hojas frescas de *Ailanthus altissima*, cuyo tejido está considerado como una de las fuentes más ricas de clorofilasa (McFeeters et al., 1971). El precipitado proteínico se obtiene según el método de Terpstra y Lambers (1983). Se parte de 5 g de hojas frescas y troceadas. Se añaden 100 mL de acetona fría a -20°C y se trituran con Ultraturrax en baño de hielo picado para mantener la temperatura fría y minimizar la solubilización de la enzima. Se mantiene durante 1 minuto a velocidad mínima de homogeneización procurando impedir la formación de espumas que es síntoma de desnaturalización de la enzima. El residuo se recoge por filtración a vacío y se trata con la mezcla acetona/tampón clorofilasa dos veces al 80% y una al 70%. El tampón clorofilasa es tris-HCl 20 mM a pH 8 que contiene además NaCl 0.5 M y MgCl₂ 10 mM. El precipitado proteínico así obtenido se deja secar a temperatura ambiente y se almacena a -20°C hasta su uso. La conversión de clorofilas a clorofilidas se realiza bajo las condiciones óptimas de activación de la enzima. Soluciones puras de clorofila a o clorofila b en acetona se incuban en frasco cerrado durante 2 horas a 50°C, con 0.5 g de polvo acetónico y tampón clorofilasa de forma que la concentración final de acetona sea del 50%. Una vez concluida la incubación los pigmentos se transfieren a éter etílico y se comprueba que la reacción ha sido completa mediante TLC sobre gel de sílice (Mínguez Mosquera et al., 1989b).

4.1.2.- Pruebas de identificación.

En términos generales se puede decir que la típica coloración que muestran estos compuestos en disolución y en TLC bajo luz blanca y UV, así como su comportamiento

cromatográfico (valores de R_f) tanto en fase normal como reversa orientan su caracterización como compuesto clorofílico. La forma de los espectros de absorción electrónica, la localización y relación de los máximos en distintos disolventes, y la co-cromatografía con los correspondientes patrones completan su identificación (Mínguez et al., 1989b). Algunas pruebas específicas pueden así mismo ayudar a la dilucidación estructural.

- **Presencia de Mg.** El pigmento, disuelto en éter etílico, se trata con 2-3 gotas de HCl 13% y se mantiene en agitación durante 5 min (Sievers y Hynninen, 1977). Un cambio en la coloración es indicativo de la presencia de ión Mg^{2+} en el compuesto inicial. La transformación ocurrida se confirma por cromatografía y a partir del espectro de absorción.

- **Presencia de fitol.** Se determina según Bacon y Holden (1967). Para ello se incuban 3.5 mL de una solución de cada pigmento en KOH metanólica al 2.5% a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente se enfría en hielo y se añade 0.75 mL de éter de petróleo (40-60°C), separándose las fases por adición de 5 mL de agua. El fitol se separa por TLC en silica gel GF₂₅₄ con benceno/acetato de etilo (19:1, v/v) como sistema solvente y se visualiza bajo luz UV a 254 nm.

4.2.- Carotenoides.

4.2.1.- Obtención de patrones.

Al igual que en el caso de los pigmentos clorofílicos, los patrones deben ser preparados en el laboratorio, existiendo solo dos o tres disponibles en el mercado. Para tal fin se obtienen extractos concentrados tanto de frutos de pimiento verde y pimiento rojo.

Luteína, β -caroteno, violaxanteno, anteraxanteno y neoxanteno se obtienen a partir del extracto procedente de pimiento verde y mediante separación cromatográfica en TLC utilizando como líquido de desarrollo la mezcla éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1) (Mínguez Mosquera y Garrido Fernández, 1989a). Posteriormente los pigmentos se purifican cromatografiándolos en la mismas condiciones, salvo en el caso de luteína y anteraxanteno, para lo que se utiliza la mezcla diclorometano/acetato de etilo (4:1).

Capsanteno, capsorrubeno, zeaxanteno y β -criptoxanteno, pigmentos mayoritarios presentes en el pimiento rojo, se separan por TLC utilizando la mezcla hexano/acetato de etilo/etanol/acetona (95:3:2:2). Los pigmentos se purifican cromatografiándolos de nuevo en las mismas condiciones, salvo en el caso de zeaxanteno y β -criptoxanteno para los que se utiliza benceno/eter de petróleo ligero 40-60°C (1:1). Los pigmentos así obtenidos se hallan esterificados por lo que posteriormente deben ser saponificados según se describió anteriormente.

β -Caroteno, fitoflueno y ζ -caroteno se separa partiendo de la banda correspondiente a $R_f=1$ utilizando hexano/acetato de etilo/etanol/acetona (95:3:2:2). Dicha banda se vuelve a cromatografiar utilizando eter de petróleo ligero como líquido de desarrollo.

β -Apo-8'-carotenal, utilizado como patrón interno en la cuantificación de pigmentos carotenoides por HPLC, fue suministrados por Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO.).

4.2.2.- Pruebas de identificación.

La identificación de los pigmentos carotenoides se realiza en función de sus propiedades de adsorción electrónica, color en solución, comportamiento cromatográfico, co-cromatografía con patrones puros, color en placa y disolución. Las características espectrales que muestran, tanto en el visible como en el ultravioleta, en distintos disolventes, son contrastadas con las suministradas en la bibliografía (Foppen, 1971; Davies, 1976). Para la caracterización de grupos funcionales, se ensayan distintas reacciones químicas específicas que se describen a continuación (Jungalwala, 1962; Stobart et al., 1967; Davies et al., 1970; Davies, 1976; Buclke y Rahman, 1979).

- **Grupos 5,6 epóxidos.** Los pigmentos con grupos 5,6-epóxidos en su molécula se transforman en medio ácido en grupos 5,8-epóxidos, lo cual implica un cambio del color que muestra el pigmento en solución, así como una modificación de la forma y la localización de los máximos en el espectro de absorción, experimentando un desplazamiento hipsocrómico de 15-20 nm si la molécula presenta un grupo 5,6 epóxido y de 35-40 nm si son dos grupos. En solución etérea la adición de HCl acuoso al 20% provoca un cambio de color, de amarillo a azul, en los carotenoides con grupos 5,6- ó 5,8-epóxidos. De modo similar, el pigmento disuelto en la mezcla de éter etílico/metanol/HCl concentrado (10:9:1) se torna a amarillo-

verdoso en el caso de monoepóxido y a verde-azulado si es diepóxido. Existe una excepción curiosa a esta prueba en el caso de fucoxanteno, pigmento presente en muchas algas marinas, y que presentando un grupo 5,6-epóxido no se puede transformar en 5,8-epóxido al tener un grupo carbonilo en el carbono 8.

Esta reacción ácida también se puede llevar a cabo en la placa de cromatografía. Una vez desarrollado el cromatograma se expone el pigmento a vapores de HCl concentrado mediante un vaporizador. Los diepóxidos dan un color azul intenso mientras que los monoepóxidos adquieren una tonalidad azul verdosa. Los carotenoides con dos grupos hidroxilos exclusivamente, adquieren un color marrón bordeado de verde. Los demás carotenoides, o no cambian de color o pasan a marrón.

- **Grupos carbonilos.** Los grupos carbonilos se detectan fácilmente mediante reducción a alcoholes empleando hidruros metálicos como LiAlH_4 ó NaBH_4 . El LiAlH_4 es un agente reductor mucho más fuerte, que reduce no sólo aldehidos y cetonas, sino también ácidos, ésteres y otros grupos funcionales polares.

Se lleva a cabo añadiendo algunos cristales de NaBH_4 a una solución del pigmento en etanol del 95% y dejando reaccionar durante 3 horas en refrigerador. Pasado este tiempo se transfiere el pigmento a éter etílico. Modificaciones en el espectro de absorción como descenso en la absorbancia (intensidad de color), un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción, y un cambio notable en la forma del espectro suelen ser signos evidentes de que la reducción se ha llevado a cabo y por los tanto la existencia de grupos carbonilos.

- **Grupos hidroxilos.** Los alcoholes se convierten en ésteres por reacción con los ácidos carboxílicos, cloruros de ácido y anhídridos de ácido. Al pigmento disuelto en 2 mL de piridina se le añade 0.2 mL de anhídrido acético, se deja reaccionar durante 12 horas en la oscuridad. La reacción se detiene añadiendo agua y transfiriendo a éter de petróleo. El número de ésteres que se forman, según que los alcoholes sean simétricos o no, dan una idea del número de grupos hidroxilos que contiene la molécula, tras examinarlos por TLC ó HPLC.

La presencia de un sólo grupo hidroxilo da lugar a un único derivado acetilado. Si están presentes dos grupos hidroxilos el resultado es un derivado diacetilado y uno o dos derivados

monoacetilados, dependiendo de que los grupos hidroxilos sean o no simétricos. Realizando esta prueba sobre pigmentos en distinto grado de esterificación podremos conocer como es dicha esterificación, es decir, no esterificado, monoesterificado o totalmente esterificado.

- **Espectro de absorción infrarroja.** El espectro de infrarrojo (IR) es particularmente útil a la hora de comprobar la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos. Así mismo es utilizada para investigar la presencia de grupos funcionales especiales como acetilénicos, alénicos, carbonilos no reactivos por impedimento estérico, etc.

El pigmento, disuelto en éter etílico, se mezcla con 0.3 g de KBr en un mortero de ágata, se seca y se moltura hasta homogeneización total, se prensa para obtener la pastilla y a continuación se obtiene el espectro correspondiente con una resolución de 4cm^{-1} .

5.- Cuantificación.

5.1.- Separación e identificación de pigmentos clorofílicos por HPLC.- Se emplea el método propuesto por Mínguez et al., (1991c). La separación se lleva a cabo en una columna C_{18} de fase reversa (Spherisorb ODS 2), de 25 cm de longitud, 4 mm de diámetro interno y $5\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula. La columna va protegida con una precolumna de 0.5 cm x 4 mm empaquetada con el mismo material. Los eluentes usados fueron A: agua/reactivo de pares iónicos/metanol (1:1:8, v/v) y B: acetona/metanol (1:1, v/v). El reactivo de pares iónicos consiste en una solución de tetrabutilamonio (0.05 M) y acetato de amonio (1 M) en agua. La muestra inyectada ($20\ \mu\text{L}$) se eluye a una velocidad de flujo de 2 mL/min, siguiendo el esquema de gradiente siguiente:

Tiempo (min)	% A	% B	Curva
Inicial	75	25	
8	25	75	Lineal (6)
10	25	75	Isocrática
18	10	90	Convexa (4)
23	0	100	Cóncava (10)
30	75	25	Cóncava (10)

Los números entre paréntesis corresponden al tipo de curva incluida en el programa del cromatógrafo líquido Water 600E. La detección se realiza a 430 nm usando un detector de diodos programable.

La identificación de los picos se lleva a cabo comparando los espectros de absorción y sus tiempos de retención y factores de capacidad con los de los respectivos patrones. El factor de capacidad k se define como $k = (t_r - t_m)/t_m$ donde t_r es el tiempo de retención de cada componente y t_m el tiempo que tarda en un compuesto no retenido.

5.2.- Cuantificación de clorofilas por HPLC.- La operación lenta y laboriosa de obtención de patrones en el laboratorio, unido a la incierta conservación de sus mezclas patrones debido a la sensibilidad de estos pigmentos a la luz, temperatura, etc., limitan las posibilidades de utilizar el método de cuantificación de patrón interno. Las clorofilas se degradan muy fácilmente a feofitinas cambiando totalmente sus características espectrofotométricas y, como consecuencia, en un pequeño intervalo de tiempo se pierde la certeza de que la concentración de la mezcla patrón sea la inicialmente medida. Este hecho obliga a la preparación continua de pigmentos puros, alargando excesivamente el tiempo de análisis. Para salvar esta complicación, lo más aconsejable es utilizar otra sistemática que estima las concentraciones de los componentes a partir de una extensión de la ley de Lambert-Beer, adaptada a sistemas no homogéneos (Torsi et al., 1992) y que se rige por la ecuación:

$$N_o = A_i F / \epsilon_\lambda L 10^3 \quad (1)$$

donde:

N_o = número de moles por cm^2

A_i = absorbancia \times tiempo (min)

F = velocidad de flujo (cm^3/min)

ϵ_λ = absortividad molar a la λ de detección

L = longitud de la celda (nm), que es específica de cada detector.

Haciendo las conversiones de unidades pertinentes y expresando la concentración de la muestra en mg/Kg de material biológico, la ecuación final que resulta es:

$$C = (A F V_f 10^{10}) / (E_\lambda V_i pm) \quad (2)$$

donde:

C = concentración (mg/Kg).

A = área de pico (absorbancia × min).

F = velocidad de flujo (mL/min).

V_f = volumen en el que se recoge el extracto (mL).

$E_{\lambda}^{\%}$ = absorptividad específica a la longitud de onda de detección (absorbancia a la longitud onda λ que presenta 1 g de producto disuelto en 100 mL).

V_i = volumen de muestra inyectada en el cromatógrafo (mL).

pm = peso de muestra (g).

Los valores de $E_{\lambda}^{\%}$ se calculan a partir del espectro de absorción obtenido con el detector para cada pigmento y de los valores de $E_{\lambda_{max}}^{\%}$ que da la bibliografía (Wright y Shearer, 1984; Mínguez et al., 1991c). Así para una concentración dada se cumple que:

$$C = E_{\lambda}/E_{\lambda}^{\%} = E_{\lambda_{max}}/E_{\lambda_{max}}^{\%} \quad (3)$$

Sin embargo, en la práctica pueden ocurrir ciertas variaciones en la sensibilidad instrumental (deterioro de la lámpara, cambios en el índice de refracción con el gradiente de elución, etc.) que afectan a la absorción de la luz y que repercuten por tanto en la cuantificación. Para controlar estos cambios, se multiplica la ecuación (2) por un factor de corrección (F_c) que se obtiene a partir de las rectas de calibrado de β -caroteno patrón en el caso de carotenoides ($F_c = 0.850$) y de clorofila *a*, para los derivados clorofílicos ($F_c = 1.095$).

5.3.- Separación e identificación de pigmentos carotenoides por HPLC.- El método utilizado se ha puesto a punto durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, siendo el resultado de uno de los objetivos principales de la misma. El método utiliza una columna de fase reversa, Spherisorb ODS2, con 25 cm de longitud, 0.46 cm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μ m. La separación se lleva a cabo utilizando una fase móvil binaria acetona-agua, que modifica su composición a velocidad de flujo de 1.5 ml/min, según el programa de gradiente que se especifica a continuación:

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil (%)		Curva
	Acetona	Agua	
Inicial	75	25	
5	75	25	
10	95	5	Lineal
17	95	5	
20	100	0	Cóncava
25	75	25	Lineal

La separación tiene lugar dentro de los primeros 15 minutos, teniendo el resto del programa de gradiente la misión de limpieza y recuperación de las condiciones iniciales para realizar un nuevo análisis. El volumen de muestra inyectado es de 5 μL , y la detección se realiza a 450 nm mediante el uso de detector UV-visible de onda fija para la cuantificación rutinaria o detector de diodos con fines identificativos al poder obtener los espectros de cada pico en la fase móvil.

La asignación e identificación de cada pico cromatográfico se lleva a cabo comparando los espectros de absorción, tiempos de retención y factores de capacidad con los obtenidos para los respectivos patrones.

5.4.- Cuantificación de carotenoides por HPLC.- Al igual que en el caso de pigmentos clorofílicos, la laboriosidad de los procesos de obtención de patrones unido a la baja estabilidad de estos compuestos, hace imposible una calibración a diario como suele hacerse en las determinaciones cromatográficas de otros compuestos. Todo esto obliga a buscar caminos alternativos para la calibración. A diferencia de lo hecho en clorofilas por Mínguez et al., (1991c) en este caso se ha escogido la calibración con patrón interno, utilizando para tal fin el carotenoide β -Apo-8'-carotenal, ausente en el pimiento, comercialmente asequible, y lo que es más importante, separado en las condiciones de análisis del resto de pigmentos presentes en el pimiento.

La calibración se efectúa utilizando cantidades crecientes de mezclas multicomponentes de los pigmentos del pimiento anteriormente aislados, frente a una cantidad constante de patrón interno. Tras el análisis cromatográfico de las muestras, se representa para cada

pigmento los valores de relación de "area de pico" para el pigmento dado y el patrón con respecto a los valores de relación "cantidad inyectada" correspondiente, obteniéndose una recta cuya pendiente se denomina "Factor de respuesta". Dicho factor se utiliza para calcular la cantidad desconocida del pigmento dado en un volumen de inyección dado conteniendo una cantidad conocida de patrón interno. Al afectarse el patrón interno por los mismo errores durante la preparación de muestra y el análisis, es el método ideal para la calibración en metodologías que como ésta tienen numerosas etapas.

5.5.- Separación y cuantificación de luteína y zeaxanteno por HPLC.- Se utiliza el método propuesto por Juhler y Cox (1990) consistente en una cromatografía en fase reversa C18, realizada en nuestro caso con la misma columna anteriormente citada. La fase móvil consiste en un sistema de elución isocrático de la mezcla tetrahidrofurano/agua (52:48 v/v), con una velocidad de flujo de 1 ml/min y detección a 450 nm. Como modificación del método empleado por los autores, la cuantificación se realiza mediante patrón interno, utilizándose también en este caso β -Apo-8'-carotenal.

5.6.- Cuantificación del valor de provitamina A.- En el pimiento sólo existen dos carotenoides, β -caroteno y β -criptoxanteno, que con valor de provitamina A. Como consecuencia el cálculo del contenido en provitamina A en el pimiento se realiza considerando que β -caroteno rinde dos moléculas de retinol, y β -criptoxanteno solamente rinde una molécula de retinol. Teniendo en cuenta que la 1 gramo de β -caroteno equivale a 1660000 unidades internacionales de vitamina A (Isler, 1971), el cálculo del contenido en provitamina A en el pimiento se realiza mediante la siguiente expresión:

$$\text{U.I. de provitamina A/Kg de fruto} = \frac{[1660 (\text{mg de } \beta\text{-caroteno}) + 830 (\text{mg de } \beta\text{-criptoxanteno})]}{\text{Kg de fruto}}$$

5.7.- Análisis de ácidos grasos.- El análisis de los ácidos grasos que esterifican a cada pigmento se realiza por cromatografía gaseosa (GC) mediante la formación de los respectivos esteres metílicos de los ácidos grasos. Para tal fin se efectúa la metanolisis del pigmento esterificado añadiendo 10 ml de disolución de NaMeO al matraz que contiene el pigmento

disuelto en 1 ml de MeOH, y se mantiene a reflujo durante 10 minutos. A continuación se procede a realizar la esterificación, para lo cual se añade una gota de fenolftaleína y 10 ml de disolución de HCl-MeOH, manteniéndose de nuevo a reflujo hasta viraje del indicador. Una vez enfriada la solución, se le añade 1 ml de n-Hexano y suficiente cantidad de solución concentrada de NaCl para llevar el hexano al cuello del matraz. La columna utilizada es Supelcowax-10, (30 metros, 0.53 mm d.i., 1.5 μ m d_g). El volumen de inyección de 1,5-2 μ L. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 250°C, la temperatura del horno se mantiene inicialmente 4 minutos a 195°C para pasar en 4 minutos a 250°C y mantenerlo durante 5 minutos a esa temperatura. El flujo de gas portador fue de 1 ml/min.

IIIb. ACTIVIDAD CLOROFILASA

1.- Preparación del precipitado proteínico.

El método utilizado es una adaptación del que emplean Terpstra y Lambers (1983). Se parte de 10 g de frutos sin semillas, pedúnculos y placentas, son troceados para seguidamente tratarlos con 100 mL de acetona a -20°C, siguiendo las precauciones de temperatura y velocidad de homogeneización anteriormente mencionadas en el apartado de preparación de clorofilidas por desesterificación enzimática. Después de macerar durante 15 min en congelador a -20°C, se retira el sobrenadante por filtración a vacío y el residuo se trata de nuevo con 100 mL de acetona. La operación se repite hasta que el sobrenadante no tiene color, generalmente 4 veces son suficientes. Finalmente el precipitado se recoge por filtración a vacío y se deja secar a temperatura ambiente.

2.- Extracción de la enzima del precipitado proteínico.

El polvo de acetona (0.1 g) se extrae con 5 mL de tampón fosfato 5 mM, pH 7, que contiene KCl 50 mM y 0.24% de Tritón X-100, durante 1 h a 30°C con ayuda de agitador magnético. El extracto se filtra a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifuga a 15000 g durante 15 min. El sobrenadante se usa como extracto crudo enzimático.

3.- Fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico.

Al extracto crudo enzimático se le añade lentamente y con agitación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar valores de saturación del 30% (164 g/l). Se deja reposar durante 1 hora a 4°C en la oscuridad, y posteriormente se centrifuga a 20000 g durante 20 minutos. El precipitado se descarta, y al sobrenadante se le añade de nuevo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar el 60% de saturación (361 g/l). Se opera de igual modo y el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se descarta. El precipitado se disuelve en el tampón de extracción, constituyendo el extracto purificado.

4.- Preparación de los sustratos.

Se emplean soluciones en acetona de clorofila *a* obtenida como se ha descrito en el apartado de "Obtención de patrones", y purificada previamente por TLC en silicagel GF₂₅₄ con el líquido de desarrollo éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1).

5.- Reacción enzimática.

La mezcla de reacción contiene 0.1 μmol de sustrato disuelto en acetona, bufer Tris 100 mM a pH 8.5, y el extracto purificado de clorofilasa en una relación de 1:5:5 (volumen total de 1.1 mL). La reacción se realiza en conos "Eppendorf" en un baño termostático a 50°C y bajo luz verde durante 1 hora. Una vez finalizada la incubación, se detiene la reacción congelando la mezcla a -20°C hasta su análisis. La mezcla se centrifuga a 13 000 g durante 5 min y se inyecta una alícuota del sobrenadante diluida con tetrahidrofurano en proporción 1:1 en el cromatógrafo para la cuantificación del producto. La separación se realiza mediante el método descrito para clorofilas (Mínguez et al., 1991c), cuyo sistema de elución en gradiente permite separar y cuantificar el producto formado (clorofilida) y el sustrato que no ha reaccionado (clorofila). Sin embargo se ha modificado sustancialmente el programa de gradiente a fin de acortar el tiempo de análisis a 15 minutos, siendo el programa el descrito a continuación:

<u>Tiempo (min)</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>Curva</u>
Inicial	75	25	
5	40	60	Lineal (6)
8	10	90	Convexa (1)
12	0	100	Lineal (6)
15	75	25	Convexa (1)

La unidad de actividad, el catal, se define como la cantidad de enzima que se necesita para hidrolizar 1 mol de sustrato por segundo. La actividad específica se expresa como unidad de actividad por Kg de polvo acetónico.

III. APARATOS UTILIZADOS.

- Aparato para la elaboración de placas de TLC Southern, Mod. Unoplen.
- Baño termostático con agitación Unitronic-320, Selecta.
- Centrífuga refrigerada Sorvall, Mod. RC-5.
- Centrífuga MSE, Mod. Micro-centaur.
- Cromatógrafo líquido Waters 600 E provisto de detector de fotodiodos array Waters 994 y printer-plotter Waters 5200.
- Espectrofotómetro FT-IR Varian, Mod. FTS-7.
- Espectrofotómetro UV/Vis Hewlett Packard, Mod. 8452 A, con computador HP 9000 serie 300, provisto de printer HP 2225 y registrador 7550 A.
- Homogeneizador "Politron", Ultraturrax Y25 Janke Kunkel Ika-Labortechnik.
- Lámpara Desaga UV/Vis, provista de luz blanca y ultravioleta UV_{254,366}.
- Liofilizador General.
- Rotavapor Büchi, Mod. R 110.
- Cromatógrafo de Perkin-Elmer modelo 3920B, dotado de detector FID e integrador HP-3394A de gases.
- Balanza analítica Mettler AE-200.
- Prensa para elaborar pastillas de FT-IR. Graseby Specac Limited. Modelo 15011
- Cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Serie 4 provisto de detector UV-vis modelo 85B e integrador Hewlett-Packard modelo 3396A.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. IDENTIFICACION DE PIGMENTOS.

Como resultado del proceso de maduración los frutos del pimiento experimentan un drástico cambio de coloración, pasando de un color inicial verde a un color rojo intenso en el estado de plena madurez. Debido a ello, el estudio de identificación de pigmentos hay que realizarlo en ambos estados al entenderse fácilmente que los pigmentos responsables de la coloración serán sustancialmente diferentes.

En el caso del fruto verde se ha trabajado con el extracto directo de pigmentos, mientras que tratándose del fruto maduro la posible esterificación de las xantofilas obliga a trabajar con el extracto saponificado a fin de reducir el número de bandas y simplificar las separaciones cromatográficas.

La separación de pigmentos se realiza mediante el empleo de TLC para lo cual se han utilizado placas de silicagel 60GF₂₅₄ y como líquido de desarrollo la mezcla éter de petróleo 65-95°C/acetona/dietilamina (10:4:1). Cada pigmento separado en estas condiciones, se raspa y eluye de la placa, operación que se repite en función del caso hasta diez veces a fin de obtener una cantidad suficiente del mismo, que permita su posterior manipulación para poderle realizar las pruebas de identificación. Posteriormente, cada banda aislada es vuelta a cromatografiar en la mismas condiciones en que se obtuvo a fin de chequear su pureza, y en cualquier caso mejorarla. Las características del cromatograma del fruto verde se muestran en la Tabla I, y las correspondientes a un fruto rojo maduro se recogen en la Tabla II. En principio el patrón de ambos cromatogramas refleja la composición de pigmentos en ambas variedades, *Bola* y *Agridulce*, no encontrándose en las mencionadas condiciones ausencia o presencia adicional de compuestos que las diferencien.

Aunque el color que muestran estas sustancias en la placa cromatográfica permite realizar una primera diferenciación entre pigmentos clorofílicos y carotenoides, la identificación de cada banda se realiza en base a su comportamiento cromatográfico y co-cromatografía con patrones, su color en placa bajo luz blanca y luz ultravioleta (254 y 360 nm), su espectro de absorción electrónica UV-visible en varios disolventes orgánicos y comparación con los mostrados por los patrones y los dados en la bibliografía (Foppen, 1971; Davies, 1976; Goodwin, 1976; Davies y Kost, 1988). En el caso de tratarse de pigmentos clorofílicos se realizan pruebas químicas específicas para constatar la presencia o no de

Tabla I: Características del cromatograma obtenido en TLC para el extracto de pigmentos procedente de frutos verdes de pimientos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Banda n°	R _f	Color en placa	
		Luz blanca	Luz UV
1	0.96	Amarillo-naranja	—
2	0.51	Verde azulado	Fluorescencia fresa
3	0.45	Verde amarillento	Fluorescencia fresa
4	0.42	Amarillo-naranja	—
5	0.41	Amarillo	—
6	0.34	Amarillo	—
7	0.23	Amarillo	—
8	0.05	Verde amarillento	Fluorescencia fresa

Soporte cromatográfico: Silicagel 60GF₂₅₄

Líquido de desarrollo: Eter de petróleo ligero (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1)

Tabla II: Características del cromatograma obtenido en TLC para el extracto saponificado de pigmentos procedente de frutos maduros de pimientos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Banda n°	R _f	Color en placa	
		Luz blanca	Luz UV
1	0.96	Amarillo-naranja	Fluorescencia blanca
2	0.57	Amarillo	—
3	0.51	Rojo pálido	—
4	0.47	Amarillo	—
5	0.42	Amarillo-naranja	—
6	0.41	Amarillo	—
7	0.39	Rojo intenso	—
8	0.34	Amarillo	—
9	0.31	Rojo violáceo	—
10	0.23	Amarillo	—

Soporte cromatográfico: Silicagel 60GF₂₅₄

Líquido de desarrollo: Eter de petróleo ligero (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1)

magnesio y fitol en la molécula. En el caso de los pigmentos carotenoides se realizan pruebas químicas para confirmar la presencia o ausencia de grupos funcionales epóxidos, hidroxilos y carbonilos, siendo estos dos últimos confirmados por espectrometría de infrarrojo (FT-IR). En la Tabla III se muestran los resultados de dichas pruebas de identificación, así como la naturaleza de los pigmentos identificados tanto en los frutos inmaduros o verdes, como en los frutos maduros cuyo color es rojo.

La identificación de las bandas correspondientes al cromatograma obtenido para el fruto verde no ha presentado excesiva complicación al tratarse de los pigmentos normalmente presentes en tejidos vegetales verdes, y que se ajusta al patrón del cloroplasto. Así la banda 1 se corresponde con β -caroteno, la banda 2 con clorofila *a*, la banda 3 con clorofila *b*, la banda 4 con luteína, la banda 5 con anteraxanteno, la banda 6 con violaxanteno y la banda 7 con neoxanteno. La banda 8, que por sus características generales parecía ser de naturaleza clorofílica, fue raspada, eluida y vuelta a cromatografiar utilizando un sistema de mayor fuerza de elución consistente en la mezcla éter de petróleo 65-95°C/acetona/piridina (10:4:1). En estas condiciones se separan dos bandas que tras ser sometidas a las pruebas de identificación muestran las mismas propiedades físico-químicas y espectroscópicas que clorofila *a* y clorofila *b*, diferenciándose únicamente en la ausencia de fitol en su molécula, siendo derivados defitilados, razón por la cual presentan una alta polaridad. La identificación de ambos pigmentos conduce a clorofilida *a* y clorofilida *b* respectivamente.

En el caso del pimiento rojo, la banda 1 asociada inicialmente por su color y valor de R_f con β -caroteno, muestra una característica fluorescencia verde amarillenta al ser observada bajo luz ultravioleta, lo cual es indicativo de la presencia de algún otro pigmento en dicha banda. Puesto que fitoflueno es el único carotenoide que muestra esta peculiaridad no cabe duda de que dicho pigmento está presente en la citada banda junto con β -caroteno. No obstante, con objeto de confirmar este punto, la banda se raspa y eluye de la placa y dada su baja polaridad se vuelve a cromatografiar empleando éter de petróleo ligero 40-60°C como eluyente, obteniéndose tras su desarrollo la separación de tres bandas. Las características de dicho cromatograma se muestran en la Tabla IV. Cada banda es eluida y sometida a las diferentes pruebas de identificación antes mencionadas, siendo su identidad β -caroteno (banda 1.1), fitoflueno (banda 1.2) y ζ -caroteno (banda 1.3).

TABLA III. Características espectroscópicas y resultados de las pruebas químicas realizadas para la identificación de pigmentos carotenoides y clorofílicos en frutos verdes y maduros de pimiento pimentonero.

Pigmento identificado	Máximos de absorción (nm) ^{a)}		Espectro de infrarrojo (FT-IR)		Prueba de epóxidos (tratamiento con HCl)	
	Eter de petróleo	Benceno	Grupo -OH Grupo -C=O		Desplazamiento hipsocrómico en EtOH (nm)	Color en placa
<i>β</i> -caroteno	(426),444,470	463,492	-	-	0	Amarillo
<i>ζ</i> -caroteno	387,406,432	378,400,422	-	-	0	Amarillo pálido
Fitoflueno	338,353,374	330,348,367	-	-	0	Amarillo pálido
<i>β</i> -Criptoxanteno	(438),458,486	(424),448,474	+	-	0	Amarillo
Criptocapsin	(445),470,497	486,518	+	+	0	Marrón
Capsoluteína	420,444,472	434,458,486	+	-	0	Azul
Zeaxanteno	(422),448,472	(436),462,488	-	-	0	Marrón
Luteína	418,442,472	429,456,486	+	-	0	Marrón con borde verde
Anteraxanteno	(423),442,473	433,457,488	+	-	20	Azul verdoso
Capsanteno	466,496	486,(520)	+	+	0	Pardo oscuro
Violaxanteno	414,436,466	428,452,484	+	-	40	Azul
Capsorrubeno	(442),468,502	(460),486,522	+	+	0	Pardo oscuro
Neoxanteno	410,436,466	412,434,464	+	-	14	Azul verdoso

PIGMENTOS CLOROFILICOS

Pigmento identificado	Máximos de absorción (nm)		Presencia de Fitol	Presencia de Mg
	Eter etílico	Acetona		
Clorofila <i>a</i>	(382),(412),430,533,578,615,662	(384),(412),430,536,580,616,662	+	+
Clorofila <i>b</i>	(430),455,549,595,644	(430),456,595,646	+	+
Clorofilida <i>a</i>	(382),(412),430,533,578,615,662	(384),(412),430,536,580,616,662	-	+
Clorofilida <i>b</i>	(430),455,549,595,644	(430),456,595,646	-	+

a) Los máximos entre paréntesis son puntos de inflexión.

Tabla IV: Características del cromatograma de TLC obtenido para la separación de los pigmentos que comprende la banda 1 del desarrollo cromatográfico del extracto saponificado de pigmentos de frutos maduros.

Banda n°	R _f	Color en placa	
		Luz blanca	Luz UV
1.1	0.24	Amarillo-naranja	—
1.2	0.12	—	Fluorescencia verde amarillo
1.3	0.02	Amarillo pálido	Fluorescencia blanca

Soporte cromatográfico: Silicagel 60GF₂₅₄

Líquido de desarrollo: Eter de petróleo ligero (65-95°C).

Las bandas 2 y 3 corresponden a pigmentos ausentes en el fruto verde y por tanto de nueva formación, siendo identificadas como β -criptoxanteno y criptocapsin respectivamente.

La caracterización de la banda 4 ha requerido un estudio más detallado y relativamente más complejo hasta llegar a su clara identificación. Las propiedades de este compuesto orientan inicialmente según los datos de la bibliografía ha identificarla como capsoluteína, nombre propuesto por vez primera por Curl (1962) indicando entonces su naturaleza de xantofila diolica y con espectro similar al de luteína, llamándose también "luteína de pimiento". La elucidación estructural de este compuesto ha traído de cabeza a numerosos investigadores, así Curl propuso su estructura como β, κ -caroteno-3,3'-diol. No obstante como posteriormente se discutirá durante el estudio de maduración, resultaba difícil explicar la biosíntesis de esta estructura, la cual parecería derivar de capsanteno en donde el grupo acilo se ha reducido a $-\text{CH}_2-$.

El resultado de las pruebas químicas realizadas al pigmento en cuestión indican la presencia de grupos hidroxilos y epóxidos. No obstante el problema aparece con este último grupo, puesto que si la prueba se realiza en placa se observa el característico color azul característico de estos grupos, cuando se sigue de modo espectrofotométrico no se observa ningún desplazamiento hipsocrómico ni cambio de forma en el espectro. Tras realizar una intensa búsqueda bibliográfica, se encontró la existencia de pigmentos carotenoides con grupos epóxidos entre las posiciones 3 y 6 de un anillo llamándose en conjunto anillo 3,6-oxabicycloheptano, el cual no se afecta por el tratamiento con ácido. Este inusual grupo funcional fue descrito por vez primera al aislar dos nuevos carotenoides en el alga marina *Eutreptiella gymnastica* (Fiksdahl, A. et al., 1984; Bjørnland et al., 1986). Posteriormente se han aislado y elucidado las estructuras de dos pigmentos que contienen este grupo funcional en calabaza (*Cucurbita maxima*), llamándose cucurbitaxanteno A y cucurbitaxanteno B, antiguo nombre designado a luteína de calabaza, y cuyas estructuras son 3,6-epóxido-5,6-dihidro- β, β -caroteno-5,3'-diol y 3,6,5',6'-diepóxido-5,6,5',6'-tetrahidro- β, β -caroteno-5,3'-diol, respectivamente (Matsuno et al., 1986). El primero de estos pigmentos coincide en todas sus propiedades espectrales y cromatográficas con capsoluteína asignándosele dicha estructura como más probable. Esto último se apoya por el hecho de haber sido aislados compuestos conteniendo el grupo 3,6 epóxido en variedades de *Capsicum* (Parkes et al., 1986; Deli et al., 1992).

En base a estas premisas se procedió a realizar como prueba adicional y concluyente una enérgica reducción del pigmento utilizando AlLiH_4 . Al igual que en el caso del pigmento cucurbitaxanteno A aislado por Matsuno et al. (1986), el resultado de esta reducción genera la transformación del pigmento en zeaxanteno (Figura 11), pudiéndose afirmar que el pigmento identificado como capsoluteína posee la misma estructura que cucurbitaxanteno A en calabaza.

El resto del conjunto de bandas que aparecen en el cromatograma de TLC para el pimiento rojo se han identificado sin dificultad, siendo su identidad la siguiente: banda 5: zeaxanteno, banda 6: anteraxanteno, banda 7: capsanteno, banda 8: violaxanteno y banda 9: capsorrubeno. Todas estas bandas corresponden a pigmentos de nueva formación en el fruto maduro, excepto las bandas 6 y 8 que también se encuentran en el cromatograma de TLC correspondiente para un fruto verde.

Para el caso concreto de un pimiento en estado de maduración cambiante o intermedio se comprueba que su composición pigmentaria es una mezcla de los pigmentos presentes en el pimiento verde y los pigmentos de nueva formación correspondientes al fruto maduro.

Como quiera que el espectro de absorción electrónica UV-visible no solo se caracteriza por sus máximos de absorción, sino también por la relación de absorbancia entre dichos máximos, en una palabra su forma, en las Figuras 12-26 se muestra el espectro de absorción electrónica de los pigmentos identificados, junto con la estructura molecular y el nombre sistemático, y en algunos casos el espectro de absorción infrarroja.

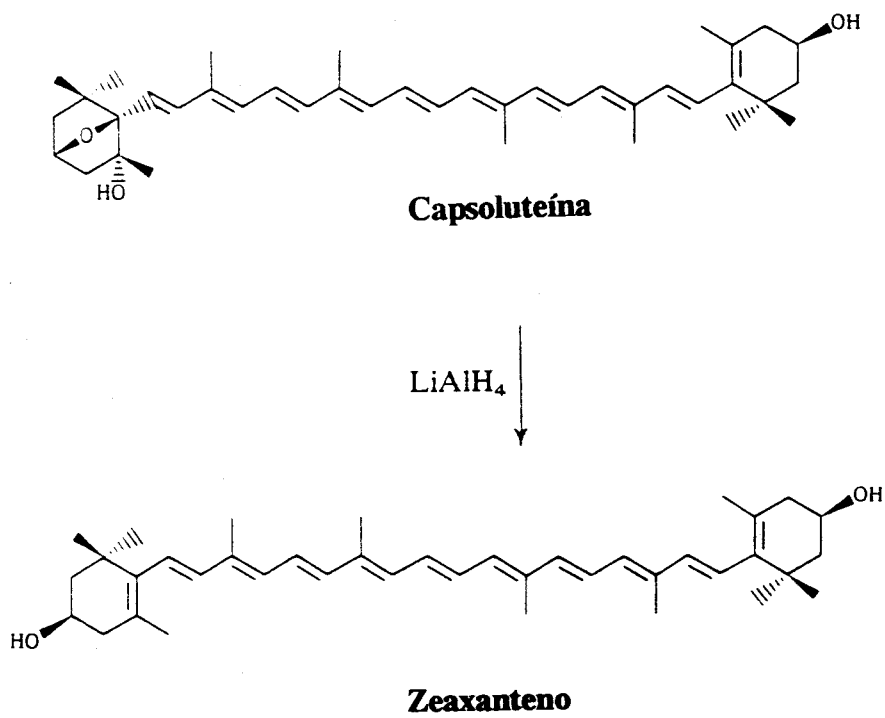


Figura 11: Transformación estructural de capsoluteína en zeaxanteno por reducción con AlLiH_4 .

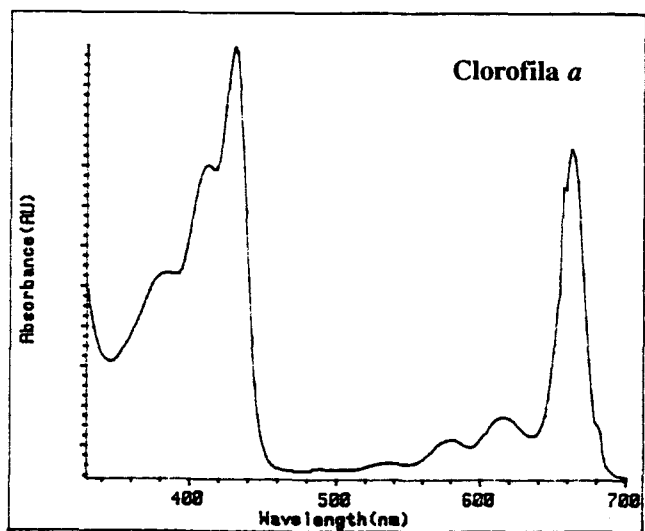
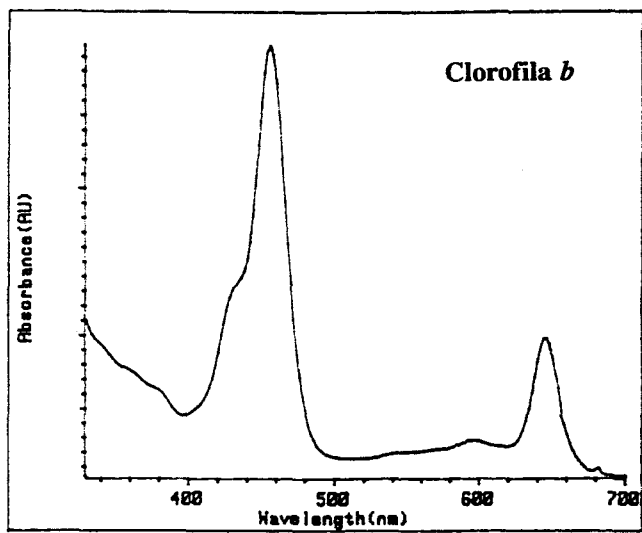
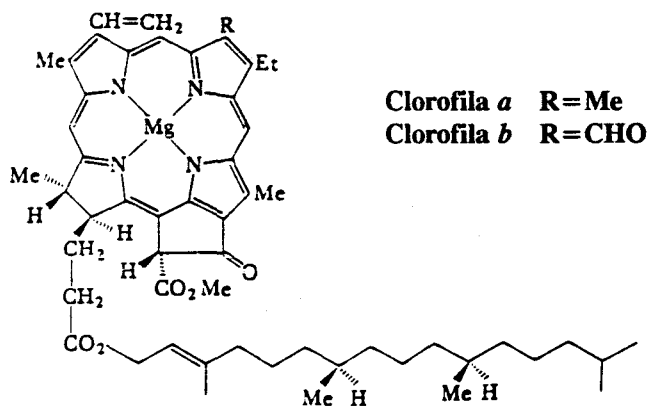
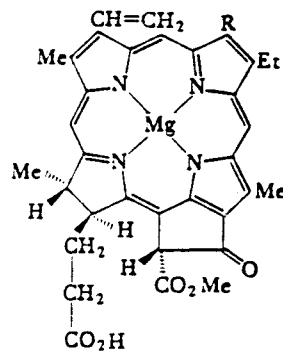


Figura 12: Estructura y espectro de absorción electrónica en acetona de clorofila *a* y clorofila *b*.



Clorofilida *a* R=Me
Clorofilida *b* R=CHO

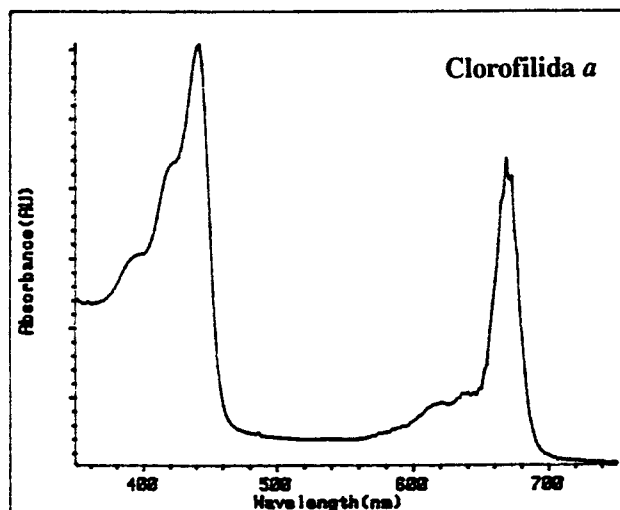
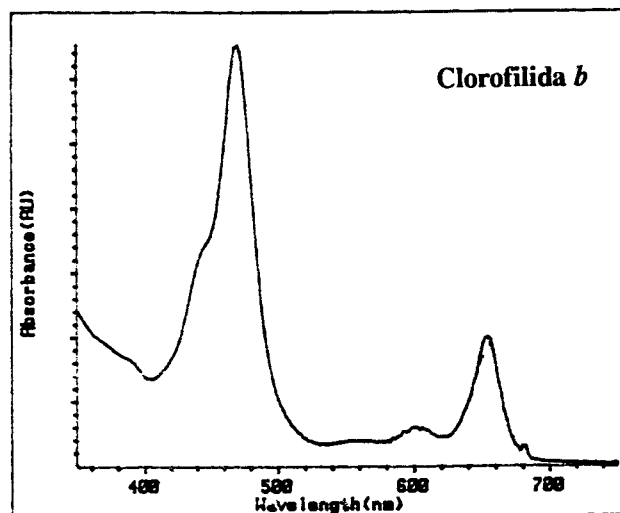
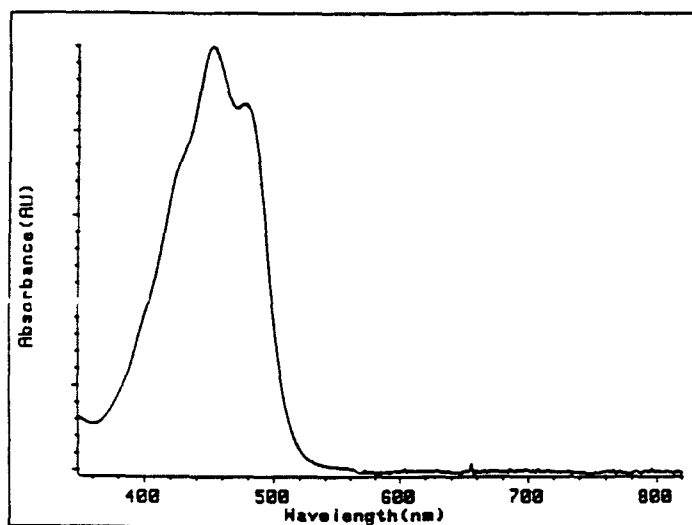
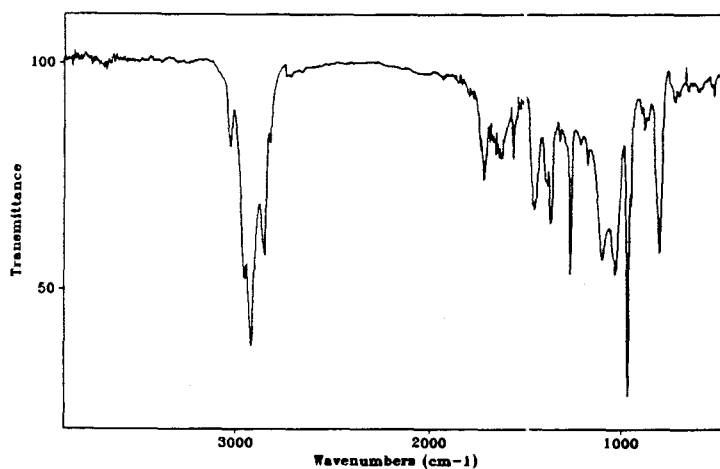


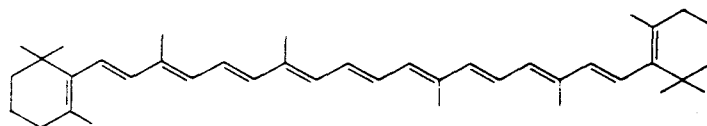
Figura 13: Estructura y espectro de absorción electrónica en acetona/piridina (1:1) de clorofilida *a* y clorofilida *b*.



Espectro de absorción electrónica en acetona

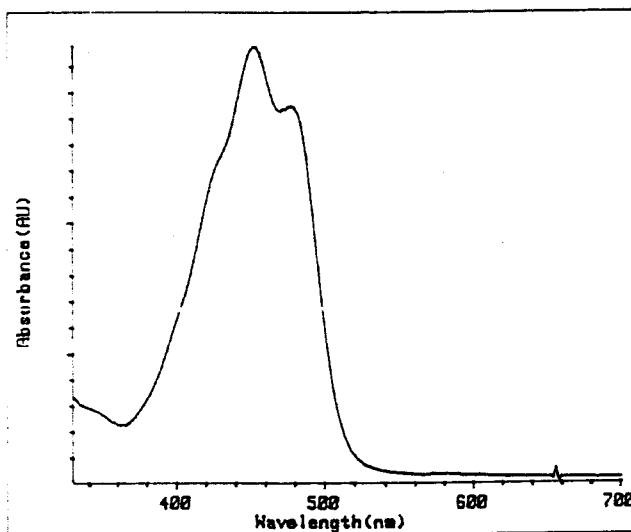


Espectro de absorción infrarroja

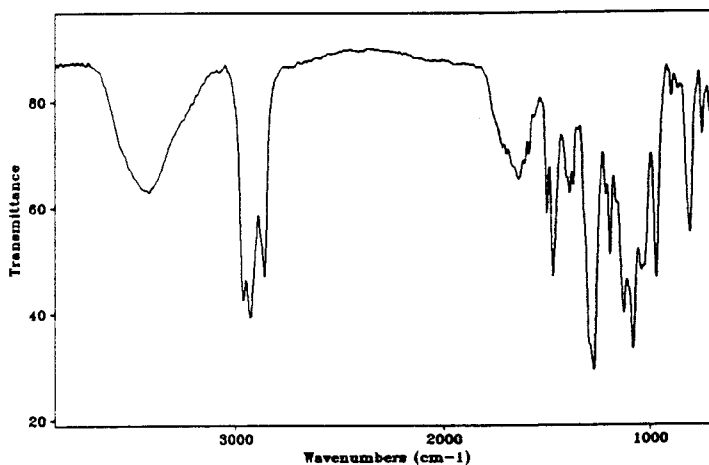


β,β -caroteno

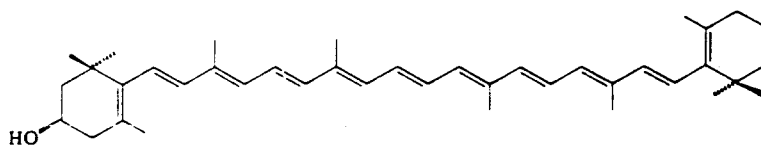
Figura 14: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de β -caroteno.



Espectro de absorción electrónica en acetona

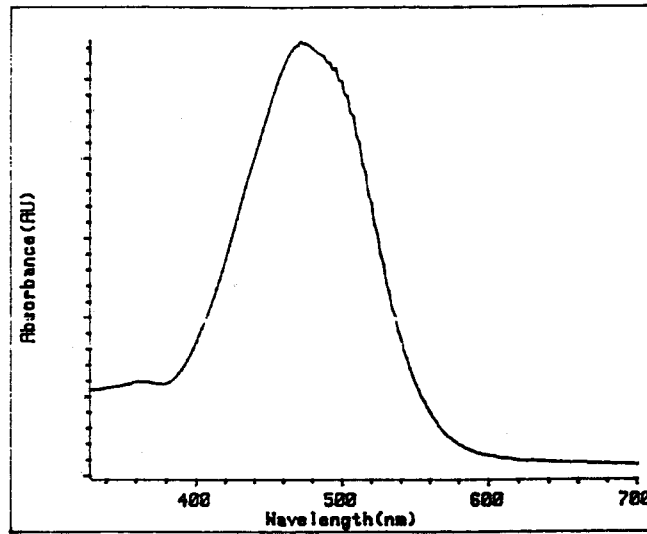


Espectro de absorción infrarroja

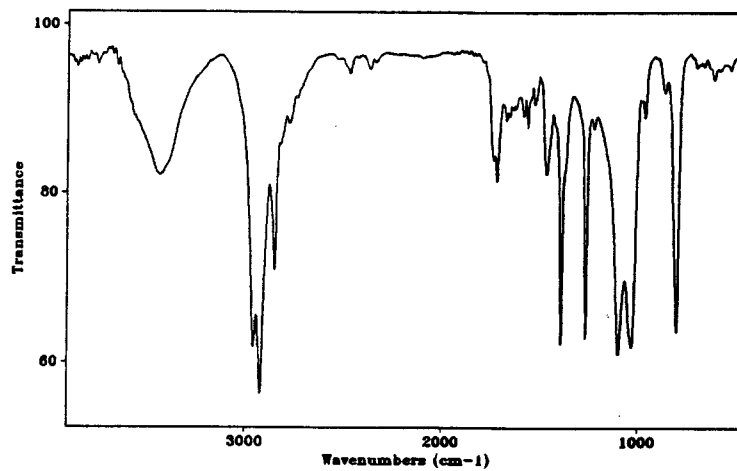


β ,\beta-caroteno-3-ol

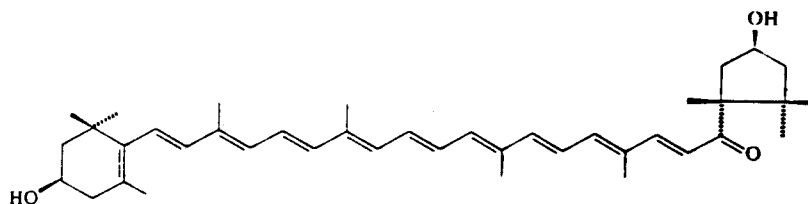
Figura 15: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de *\beta*-criptoxanteno.



Espectro de absorción electrónica en etanol

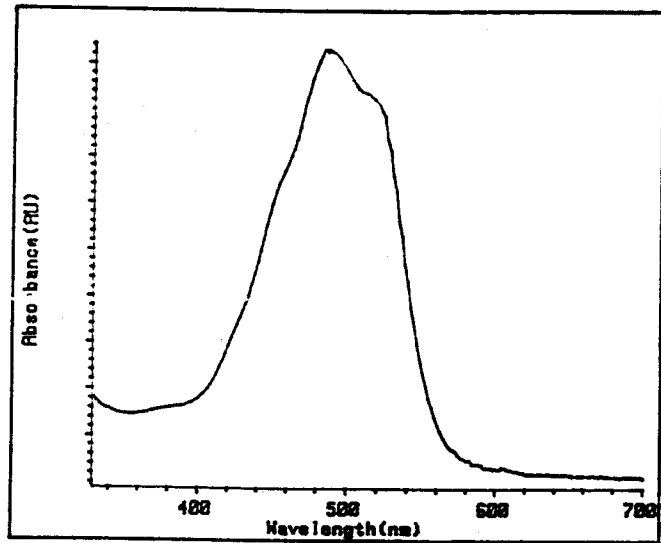


Espectro de absorción infrarroja

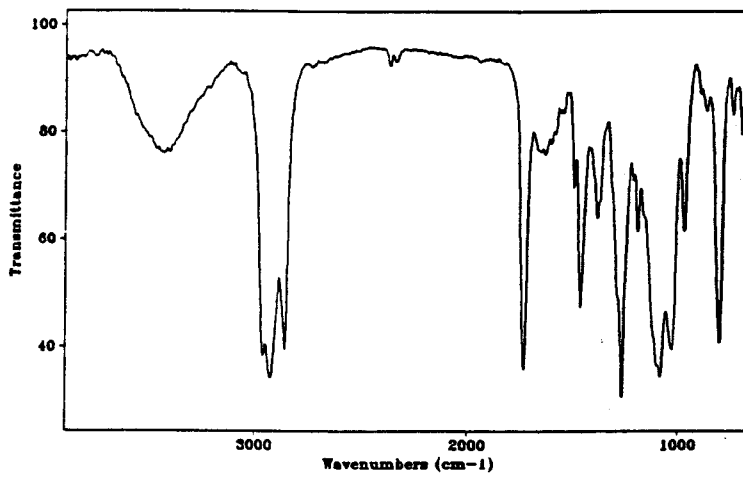


3,3'-dihidroxi-β,κ-caroteno-6'-ona

Figura 18: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de capsanteno.



Espectro de absorción electrónica en etanol



Espectro de absorción infrarroja

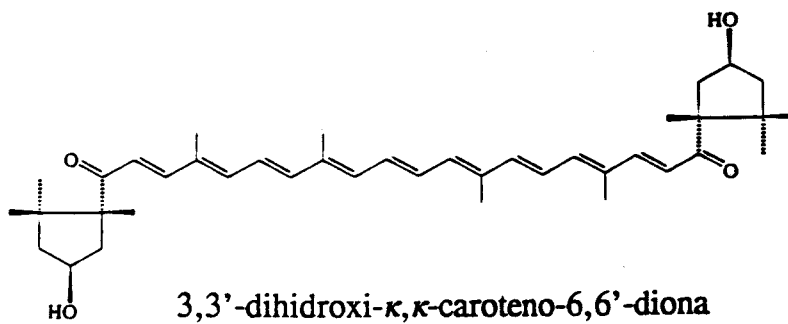
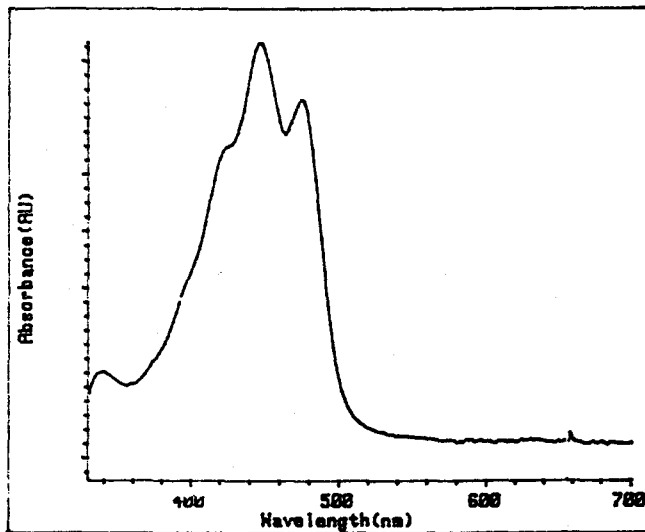
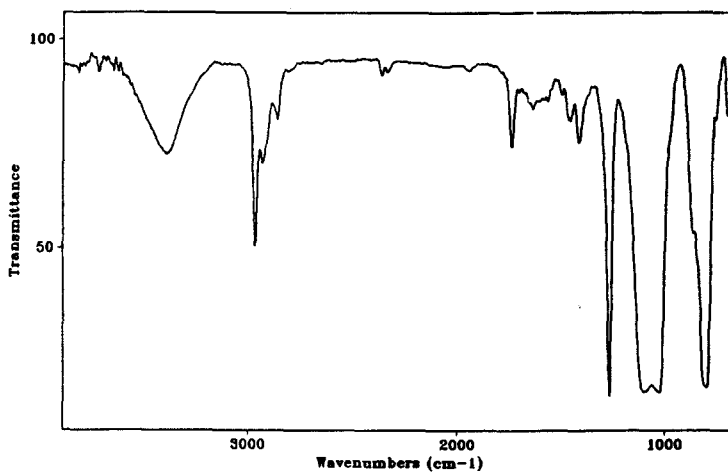


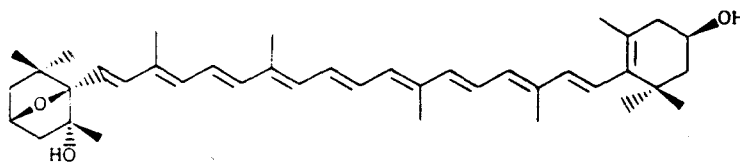
Figura 19: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de capsorrubeno.



Espectro de absorción electrónica en acetona

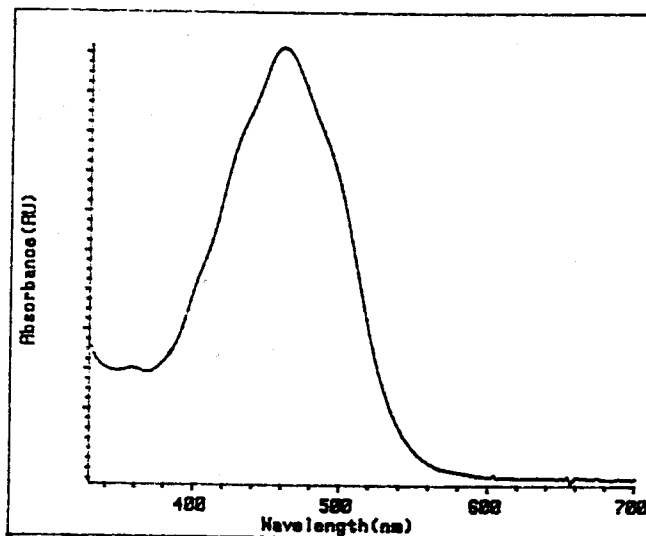


Espectro de absorción infrarroja

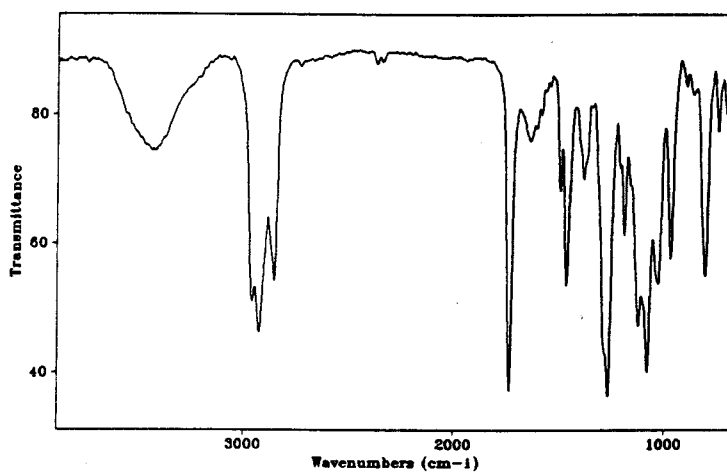


3,6-epoxi-5,6-dihidro- β,β -caroteno-5,3'-diol

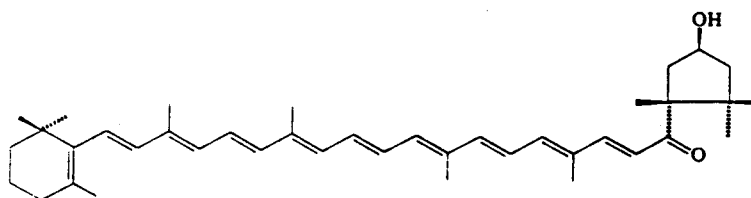
Figura 20: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de capsoluteína.



Espectro de absorción electrónica en acetona

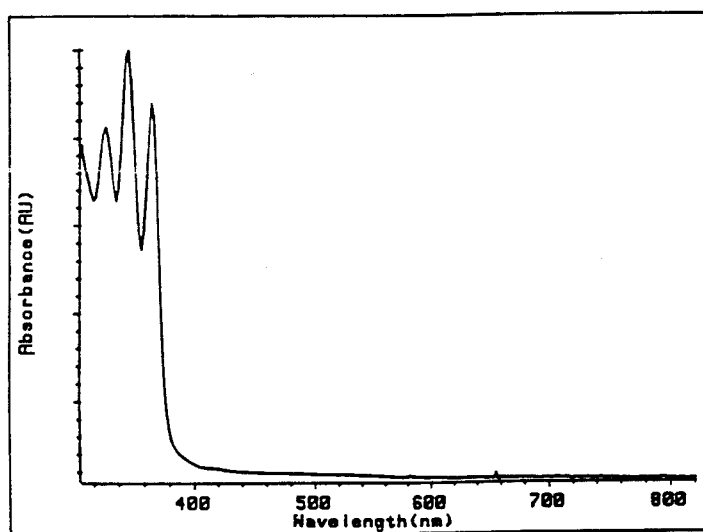


Espectro de absorción infrarroja

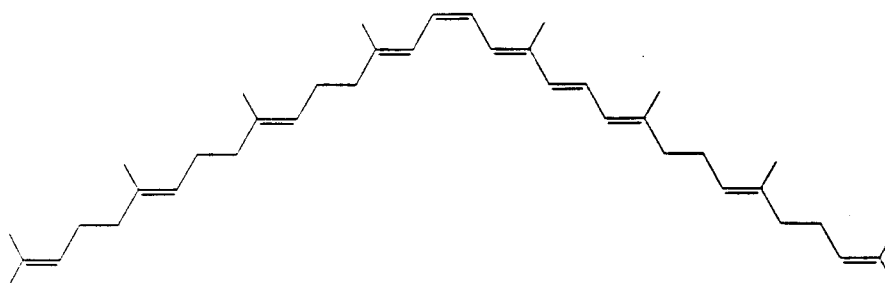


3-hidroxi- β , κ -caroteno-6'-ona

Figura 21: Estructura y espectros de absorción electrónica e infrarroja de criptocapsin.



Espectro de absorción electrónica en acetona



15-*cis*-7,8,11,12,7',8'-hexahidro- ψ , ψ -caroteno

Figura 22: Estructura y espectro de absorción electrónica de fitoflueno.

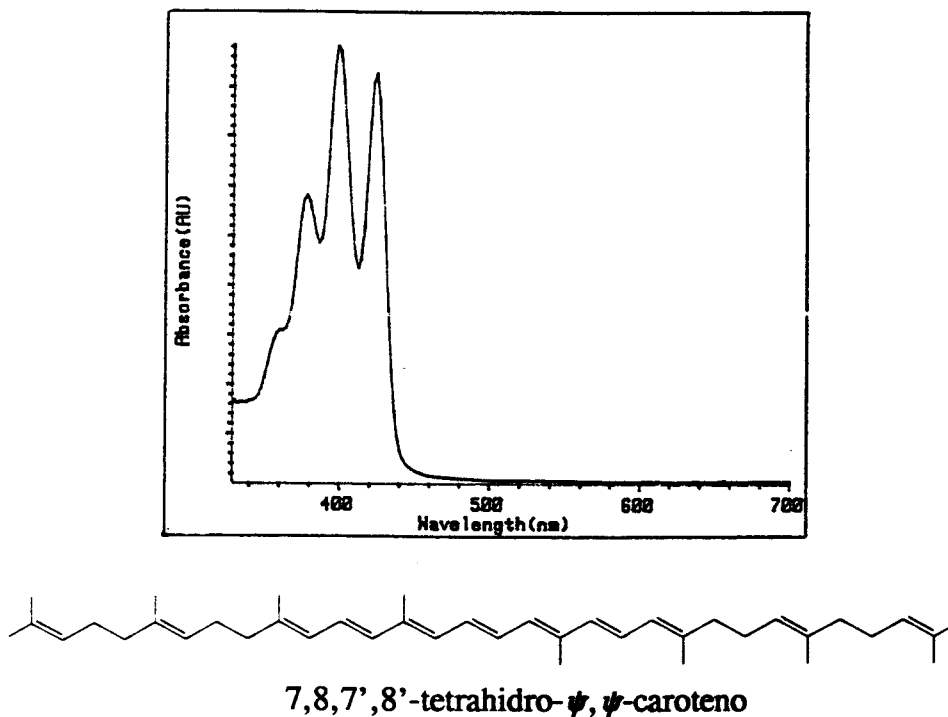


Figura 23: Estructura y espectro de absorción electrónica en éter de petróleo ligero de ζ -caroteno.

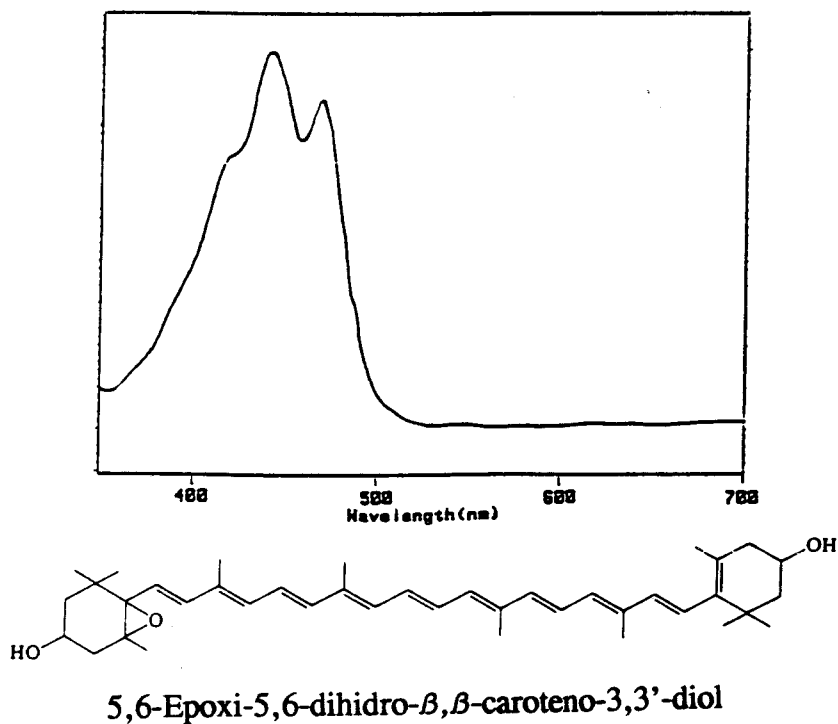


Figura 24: Estructura y espectro de absorción electrónica en acetona de anteraxanteno.

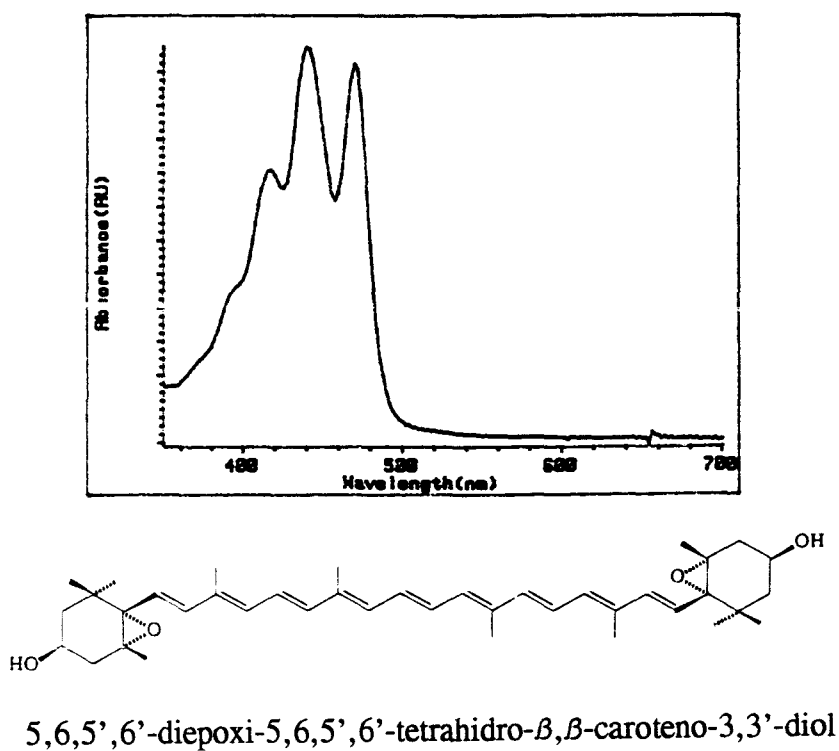


Figura 25: Estructura y espectro de absorción electrónica en acetona de violaxanteno.

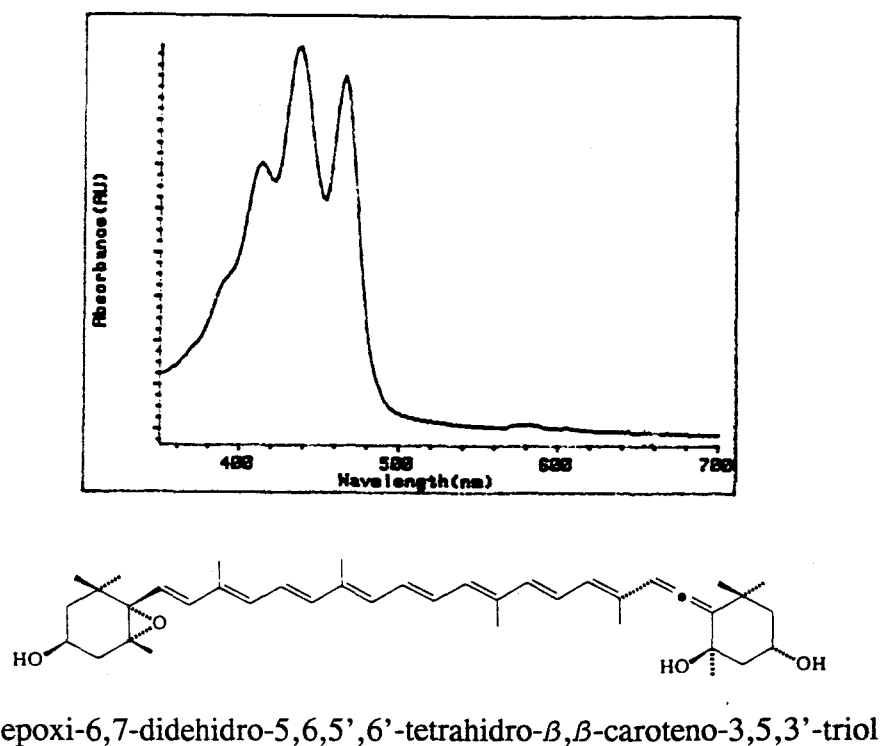


Figura 26: Estructura y espectro de absorción electrónica en acetona de neoxanteno.

II. CONTROL DE CAROTENOIDES POR HPLC.

1.- Separación.

Una vez identificados los pigmentos, se procede a la puesta a punto de un método cromatográfico que permita la separación de los mismos y su posterior cuantificación. Dado el gran avance experimentado por la técnica de HPLC, con grandes ventajas sobre la TLC en cuanto a poder de resolución y rapidez, así como la posibilidad de utilizarla conjuntamente con detectores muy sensibles que posibilitan una detección selectiva de los pigmentos y su cuantificación de modo muy preciso, se optó por el uso de la misma. Para tal fin, se realizó una búsqueda bibliográfica de métodos de análisis de pigmentos por HPLC, encontrándose en muchos casos la utilización de fases estacionarias ya en desuso y superadas en calidad y eficacia por otras existentes en la actualidad. Adicionalmente, en la mayoría de los métodos revisados, las separaciones eran largas, llegándose a tiempos de análisis superiores a una hora, pudiendo provocar con ello la formación de artefactos *in situ* durante el análisis. Por todo ello se contempla la posibilidad de desarrollar un método específico para nuestras necesidades, minimizando el tiempo de análisis y en paralelo optimizando la separación mediante una correcta elección tanto de la fase móvil como estacionaria.

La elección de la fase estacionaria es de suma importancia puesto que limitará completamente la posterior selección de la fase móvil, y en muchos casos la preparación de la muestra. Dada la gran variedad de polaridad que podemos encontrar en la familia de pigmentos carotenoides, desde carotenos apolares a xantofilas extremadamente polares, una fase estacionaria del tipo "reversa" se muestra como la ideal para el análisis de estos pigmentos. Ello se debe, a que este tipo de soporte permite el uso de una gran variedad de solventes y mezclas de éstos, sin alterar su naturaleza y propiedades, permitiendo incluso la utilización de agua. Dentro de este tipo de fases se optó por una C18 (octadecilsililo), que a parte de ser la más conocida y utilizada en diversas aplicaciones, permite la separación de sustancias en un amplio rango de polaridad. Como fase móvil se eligió el par acetona-agua, capaz de solubilizar carotenoides a partir de proporciones de acetona del 50% en volumen. La detección de pigmentos se realiza mediante medida espectrofotométrica utilizando un detector de fotodiodos (PAD) capaz de registrar el espectro de absorción electrónica de cada pico durante el análisis en el rango 350-700 nm, incluso a concentraciones muy reducidas. Posteriormente este detector fue sustituido por otro de longitud de onda fija para fines

cuantitativos durante los análisis de rutina, realizándose la detección a 450 nm, por ser esta una longitud de onda cercana al máximo de absorción para la mayoría de los carotenoides. El volumen de inyección fue de 5 μ l en todo momento.

Toda puesta a punto de un método cromatográfico requiere de unos ensayos preliminares, cuyo número dependerá en gran medida de la complejidad de la muestra problema y de la pericia y experiencia del cromatografista. En nuestro caso se comienza por realizar una separación inicial utilizando un gradiente que partiendo de la mezcla acetona/agua 50:50 cambie de modo continuo durante 30 minutos hasta 100% de acetona, a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. La separación así obtenida presenta un cromatograma en el cual durante los veinte primeros minutos no se detecta ningún pico, comenzando la detección de los mismos cuando la concentración de acetona alcanza el 75%. Como resultado de esta primera prueba se deduce que es posible acortar el tiempo de análisis, aumentando por un lado la polaridad de la fase y por otro la velocidad de flujo. Por ello, el siguiente ensayo se realiza utilizando 1.5 ml/min como velocidad de flujo de la fase móvil, y un gradiente de elución que en veinte minutos varíe del 75% al 100% de acetona. En estas condiciones en el cromatograma obtenido todos los picos están comprendidos en la franja de tiempos de retención de 2-12 minutos, mostrando una zona inicial de picos mal separados, mientras que los picos que aparecen al final del cromatograma sí lo están. Esto indica la necesidad de mantener al principio las condiciones iniciales (75% de acetona) durante unos minutos, para posteriormente comenzar el gradiente.

A fin de determinar ese período de tiempo inicial se cromatografía una muestra en condiciones isocráticas al 75% en acetona. Como resultado se deduce que tal período inicial debe ser de unos cinco minutos. Como consecuencia, el gradiente de elución más adecuado debe incluir una primera etapa isocrática de cinco minutos al 75% de acetona y posteriormente variar al 100% de acetona durante 10 minutos. Tras cromatografiar incluyendo esta modificación el cromatograma resultante posee otra zona de picos solapados en torno a los 10 minutos, lo cual indica la necesidad de incluir otra zona de concentración isocrática a ese tiempo, en donde aproximadamente la fase tiene una concentración del 95% en acetona. Se prueba entonces el siguiente gradiente de elución: inicialmente se parte de una composición al 75% en acetona, manteniéndola durante 5 minutos, para seguidamente variarla de forma lineal durante cinco minutos hasta el 95% de acetona y mantener esas condiciones otros diez minutos. Tras cromatografiar en dichas condiciones se obtiene un cromatograma

con los picos nítidamente separados y sin huecos grandes en el cromatograma, apareciendo el último pico al minuto 17. Por ello se concluye que estas son las condiciones óptimas. A fin de poder realizar análisis sucesivos es necesario añadir una etapa de lavado con el 100% de acetona, cuyo duración óptima se estima en tres minutos. La vuelta a las condiciones iniciales para realizar la siguiente inyección se efectúa en tan solo cinco minutos.

Una vez optimizado, el programa de gradiente queda como sigue:

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil (%)		Curva
	Acetona	Agua	
Inicial	75	25	
5	75	25	
10	95	5	Lineal
17	95	5	
20	100	0	Cóncava
25	75	25	Lineal

Seguidamente se procede a la identificación de cada uno de los picos cromatográficos, lo cual se lleva a cabo inyectando sucesivamente cada uno de los pigmentos previamente aislados e identificados por TLC, para lo cual se sigue la técnica de "adición sucesiva de patrones". Para ello, partiendo de la solución en acetona de un pigmento dado se procede a inyectar una alícuota del mismo en el cromatógrafo. Una vez localizado el pico correspondiente al pigmento en cuestión, se añade a su disolución una alícuota de otro pigmento y se procede de nuevo a inyectarla. En el caso de una buena separación deberá aparecer un nuevo pico después de cada adición. Esta estrategia permite una rápida asignación e identificación de picos, así como conocer fácilmente que picos coeluyen con el mínimo número de inyecciones. La identificación se ve además facilitada por la obtención de los espectros de absorción para cada pico mediante el uso de un detector de diodos, lo que la hace más válida al no basarse exclusivamente en el tiempo de retención, y por otro lado permite comprobar la pureza de cada pico cromatográfico. De modo similar, se añaden alícuotas de cada patrón a un extracto real de pigmentos saponificados, obteniéndose en todos los casos un aumento de la señal del pico correspondiente lo cual apoya de nuevo la asignación de los mismos.

Cabe señalar que debido a la mejor resolución de la HPLC en relación a la TLC durante la asignación e identificación de los picos se ha podido constatar la separación de diversos isómeros entre ellos *cis*, y que en TLC no fue posible separar. Así se han identificado los siguientes pigmentos: capsanteno 5,6-epóxido e isómeros de *cis* de capsanteno, zeaxanteno y β -caroteno.

Aunque la puesta a punto de la separación de pigmentos se ha realizado a partir de un extracto saponificado de carotenoides procedente de un fruto maduro, cuando se cromatografía en las mismas condiciones un extracto directo procedente de un fruto verde, se comprueba que la separación tanto de clorofilas como carotenoides también es satisfactoria. No obstante la separación y cuantificación de clorofilas se realiza mediante el uso del método propuesto por Mínguez et al. (1991c), de comprobada validez en numerosas investigaciones previas.

Los cromatogramas correspondientes a la mezcla patrón de pigmentos y a un extracto saponificado de pimiento rojo se muestran en las Figuras 27 y 28 respectivamente. Así mismo, en la Tabla V se especifican las características cromatográficas y el espectro registrado en la fase móvil para los pigmentos separados en dichos cromatogramas.

2.- Cuantificación.

Una vez separados los pigmentos debemos proceder a establecer la metodología que permita su cuantificación. No obstante antes debemos hacer ciertas consideraciones. Como se ha mostrado mediante las condiciones cromatográficas seleccionadas se separan tanto los pigmentos de un fruto verde como maduro, sin embargo cuando se trata de un fruto en estado intermedio de madurez surge un grave problema. Los cromatogramas se complican enormemente como consecuencia del proceso de esterificación que las xantofilas experimentan durante la maduración incrementándose el número de picos, algunos de los cuales coeluyen. Esto se solventa saponificando los extractos, pero en ese caso destruimos las clorofilas en el caso de haberlas. Por ello el método aquí propuesto lo utilizaremos solo para la separación y cuantificación de carotenoides en cualquier estado de madurez.

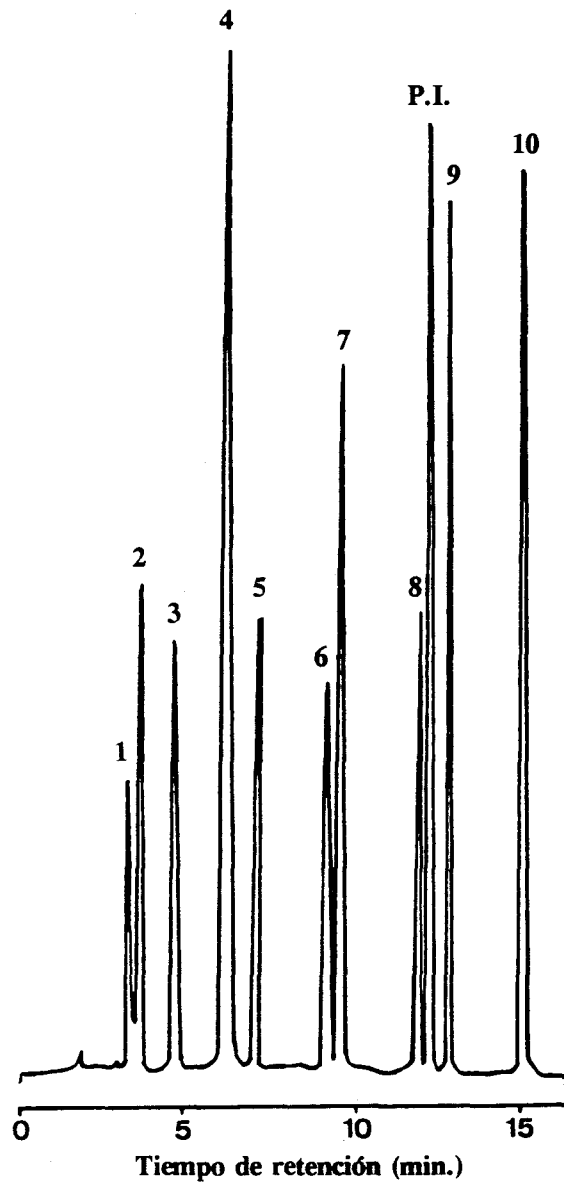


Figura 27: Cromatograma de HPLC en fase reversa de la mezcla patrón de pigmentos carotenoides. Identidad de picos: 1: Neoxanteno, 2: Capsorrubeno, 3: Violaxanteno, 4: Capsanteno, 5: Antheraxanteno, 6: Capsoluteína, 7: Zeaxanteno, 8: Criptocapsin, 9: β -Criptoxanteno, 10: β -Caroteno. P.I.: β -apo-8'-carotenal (patrón interno).

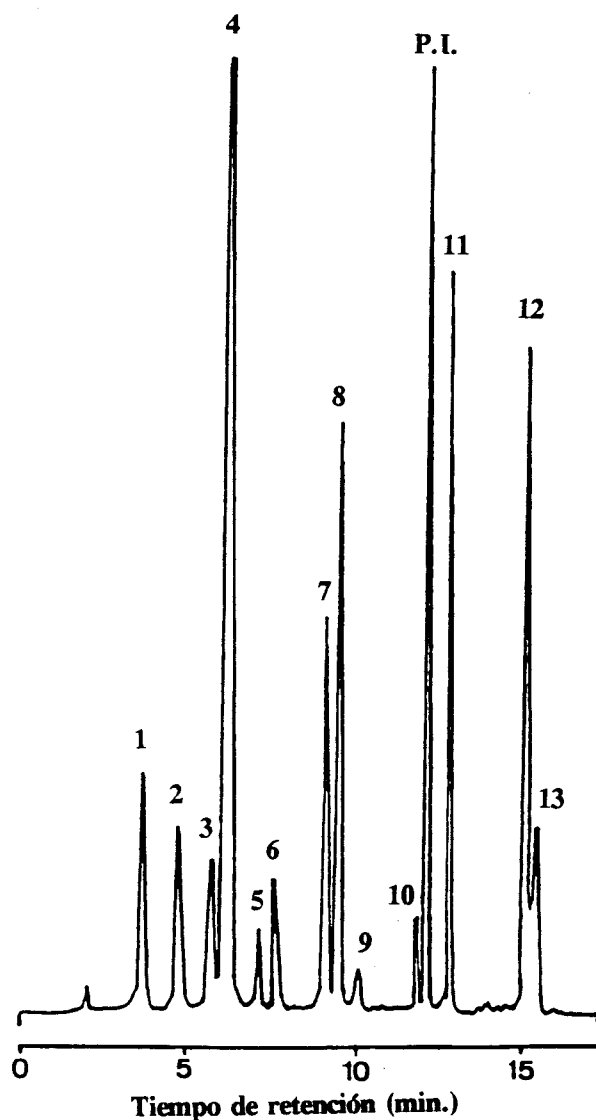


Figura 28: Cromatograma de HPLC en fase reversa de un extracto de pigmentos saponificado obtenido a partir de frutos maduros de pimiento rojo. Identidad de picos: 1: Capsorrubeno, 2: Violaxanteno, 3: Capsanteno 5,6-epóxido, 4: Capsanteno, 5: Anteraxanteno, 6: *cis*-Capsanteno, 7: Capsoluteína, 8: Zeaxanteno, 9: *cis*-Zeaxanteno, 10: Criptocapsin, 11: β -Criptoxanteno, 12: β -Caroteno, 13: *cis*- β -Caroteno. P.I.: β -apo-8'-carotenal (patrón interno).

Tabla V: Características cromatográficas y espectroscópicas correspondientes a los pigmentos carotenoides separados por HPLC.

Pigmento	t_R	t_R'	K_c	Máximos de absorción en la fase móvil			
				cis	I	II	III
No retenido	1.45		0.00				
Neoxanteno	3.44	1.99	1.37		416	438	470
Capsorrubeno	3.49	2.04	1.41		(452)	482	512
Violaxanteno	4.71	3.26	2.23		418	442	472
Capsanteno 5,6-epóxido	5.92	4.47	3.08			470	(496)
Capsanteno	6.35	4.90	3.38			472	(498)
Anteraxanteno	7.43	5.98	4.12		422	448	478
<i>cis</i> -Capsanteno	7.84	6.39	4.41	360		468	(492)
Capsoluteína	9.10	7.65	5.28		424	448	476
Zeaxanteno	9.35	7.90	5.45		426	452	482
<i>cis</i> -Zeaxanteno	9.44	7.99	5.51	340	424	452	480
Criptocapsin	11.85	10.40	7.17			482	(518)
β -Apo-8'-carotenal	11.92	10.47	7.22			458	
β -Criptoxanteno	12.63	11.18	7.71		428	454	482
Fitoflueno	14.82	13.37	9.22		330	348	367
ζ -Caroteno	15.08	13.63	9.22		378	400	422
β -Caroteno	15.08	13.63	9.40		(428)	452	480
13- <i>cis</i> - β -Caroteno	15.28	13.83	9.54	334	(428)	452	480

t_R : tiempo de retención

t_R' : tiempo de retención relativo a un compuesto no retenido ($t_R - t_m$)

K_c : Factor de capacidad ($(t_R - t_m)/t_m$)

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de la cuantificación es la elección de un sistema de detección adecuado. En el caso que nos ocupa dicha elección se decanta claramente por la utilización de un detector espectrofotométrico UV-visible, puesto que los carotenoides y clorofilas poseen espectros característicos en la zona del visible y coeficientes de extinción altos que permiten la detección y cuantificación de cantidades muy pequeñas.

Puesto que el proceso de preparación de las muestras es laborioso e incluye varias etapas de transferencia, se propone que la estrategia mas adecuada para realizar la cuantificación de pigmentos debe ser llevada a cabo mediante la adición de un patrón interno, que añadido al comienzo de la extracción de los pigmentos experimente todas las etapas del proceso de modo que los errores queden minimizados al conocer la cantidad de dicho patrón inicialmente añadida. Así mismo hay que tener en cuenta que la calibración regular mediante patrón externo, la clásica recta de calibrado, tiene ciertas limitaciones puesto que los pigmentos estudiados no pueden ser obtenidos comercialmente y al ser inestables no se pueden almacenar largo período de tiempo, por lo que una calibración a diario se hace prácticamente inviable.

La elección de un patrón interno es uno de los pasos más importantes en la puesta a punto de un método que utilice esta estrategia de cuantificación, no debiendo escatimarse tiempo en encontrar el mas idóneo, puesto que en lo sucesivo todos los resultados dependerán de dicha elección. Los criterios mas importantes a tener en cuenta en la elección de un patrón interno se pueden resumir en los siguientes:

- sustancia similar a las que queremos analizar
- ausente en las muestras a analizar
- respuesta análoga frente al sistema de detección empleado
- a ser posible fácilmente asequible o en su defecto de fácil síntesis
- estable para el almacenamiento y manipulación
- de polaridad intermedia a las sustancia a analizar
- debe experimentar las reacciones de derivatización si las hubiese
- no tóxico y barato

Lo ideal en nuestro caso sería utilizar un carotenoide ajeno al pimiento. Por ello se prueba con dos de ellos, cantaxantina y β -apo-8'-carotenal. Ambos carotenoides se separan del resto de pigmentos en las condiciones propuestas, sin embargo el primero siempre se separa en dos picos consecutivos correspondientes a isómeros, por lo que la elección se decantó por el segundo, el cual eluye con un tiempo de retención de 11.92 minutos, generando un solo pico simétrico y bien separado del resto de pigmentos.

La cuantificación mediante el uso de patrón interno requiere la previa realización de un calibrado en el que se analizan cantidades crecientes del analito problema frente a una cantidad constante de patrón interno. Seguidamente representando la relación que se obtiene entre la señal analítica obtenida para el analito (area de pico) y la del patrón, frente a la relación que se obtiene para las cantidades empleadas de ambos, se obtiene una recta cuya pendiente se denomina "factor de respuesta del analito". Este factor nos permitirá posteriormente poder conocer en una muestra real la concentración del analito problema conociendo el factor, la relación de area de pico y la cantidad añadida de patrón.

$$(\mu\text{gr de pigmento X})/(\mu\text{gr de P.I.}) = f_x * (\text{Area X})/(\text{Area P.I.})$$

- siendo:
- f_x el Factor de Respuesta de cada pigmento
 - X cada pigmento
 - P.I. el patrón interno

En nuestro caso la calibración se realiza utilizando una mezcla multicomponente que contiene los pigmentos mayoritarios anteriormente aislados y purificados. Para preparar dicha solución patrón se parte de soluciones individuales de cada pigmento, cuya concentración se calcula espectrofotométricamente empleando los coeficientes de extinción dados en la bibliografía para un disolvente orgánico concreto (Davies y Köst, 1988). Los coeficientes empleados se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI: Coeficientes de extinción molar y longitud de onda de medida utilizados para la cuantificación espectrofotométrica de pigmentos carotenoides.

Pigmento	E_o(mM⁻¹cm⁻¹)	λ(nm)	Disolvente	Fuente bibliográfica
Neoxanteno	136.4	438	Etanol	Banthorpe, 1972
Capsorrubeno	132.2	489	Benceno	Davies, 1976
Violaxanteno	150.2	441	Etanol	Hager, 1966
Capsanteno	121.0	518	Benceno	Warren, 1958
Zeaxanteno	133.1	452	Acetona	Davies, 1976
β -Criptoxanteno	131.0	452	Eter de petróleo ligero	Isler, 1963
β -Caroteno	134.4	454	Acetona	Hiyama, 1964
β -Apo-8'-carotenal	110.0	457	Eter de petróleo ligero	Davies, 1976

A partir de la disolución patrón que contiene todos los pigmentos mayoritarios se preparan ocho disoluciones de concentración creciente, conteniendo todos los niveles la misma concentración de β -apo-8'-carotenal (patrón interno). Tras cromatografiar cada una de las ocho disoluciones estándar se representa para cada pigmento los valores de relación de "area de pico" y de "cantidad inyectada" para cada pigmento con respecto al patrón interno, obteniéndose los factores de respuesta que se muestran en la Tabla VII, así como el rango de pesos utilizado en la calibración, las respectivas relaciones de peso y el coeficiente de correlación lineal obtenido para la calibración de cada pigmento.

Como se puede observar en dicha tabla, tanto β -caroteno, β -criptoxanteno como zeaxanteno presentan factores de respuesta similares y próximos a la unidad, lo cual evidencia que en el caso de no conocerse el factor de respuesta concreto para un pigmento minoritario no incluido en la calibración anterior, como criptocapsin y capsoluteina, puede aplicársele un factor de 1. Así mismo, llama la atención como los pigmentos que eluyen a tiempo de retención mas cortos y por tanto más alejados del patrón interno poseen factores de respuesta alejados de la unidad. Este hecho tiene su explicación en la utilización del gradiente de elución que como consecuencia de modificar su composición, cambia en coeficiente de extinción del pigmento a la longitud de onda de medida (450 nm), por lo que a igualdad de concentración un pigmento que eluye al comienzo del cromatograma no muestra la misma respuesta expresada en area que el patrón interno que eluye al final del mismo.

Estos factores de respuesta pueden ser utilizados durante bastante tiempo sin necesidad de tener que realizar una recalibración. Sin embargo, ante condiciones especiales como son el cambio de instrumentación, principalmente si se trata del detector, se hace necesaria una nueva calibración, con lo que habría de nuevo que realizar la tediosa labor de aislamiento y purificación de patrones. Para evitar este engorro, proponemos el cálculo de "factores de respuesta relativos a β -caroteno" según la siguiente expresión:

$$F_{X/\beta\text{-car.}} = f_X/f_{\beta\text{-car.}}$$

donde X representa a cada pigmento, y $F_{X/\beta\text{-car.}}$ su factor de respuesta con respecto al patrón interno y relativo a β -caroteno. Una vez conocidos estos factores en futuras recalibraciones,

Tabla VII: Factor de respuesta de cada pigmento obtenido mediante el calibrado respecto β -Apo-8'-carotenal como patrón interno.

Pigmento	Intervalo de cantidad inyectada (μg)	Intervalo de relación de pesos	Factor de respuesta	Coefficiente de correlación
Neoxanteno	1.62-30.85	0.056-1.056	1.988	0.9987
Capsorrubeno	1.15-17.22	0.039-0.590	1.755	0.9975
Violaxanteno	2.36-47.24	0.081-1617	1.177	0.9986
Capsanteno	3.21-83.57	0.110-2.861	1.230	0.9991
Zeaxanteno	2.37-45.02	0.081-1.541	1.069	0.9988
β -Criptoxanteno	1.93-50.33	0.066-1.723	1.057	0.9984
β -Caroteno	1.94-50.58	0.067-1.732	1.047	0.9998

solo tendremos que utilizar β -caroteno y β -apo-8'-carotenal, ambos comercialmente asequibles, y calcular el factor de respuesta para β -caroteno ($f_{\beta\text{-car}}$) como se hizo inicialmente. Posteriormente conocidos los factores relativos de cada pigmento con respecto a β -caroteno ($F_{x/\beta\text{-car}}$) podremos calcular los nuevos factores de respuesta (f_x) utilizando la expresión anterior.

El límite de detección del método se ha determinado utilizando una disolución patrón de β -caroteno, de la cual se han inyectado alícuotas cada vez más diluidas. El límite de detección se ha calculado para una relación señal/ruido de 5:1, consiguiéndose detectar concentraciones de pigmentos inferiores a 0.05 mg/Kg. Así mismo se ha comprobado que la recuperación de pigmentos durante todo el proceso está en torno 96-98%.

III. CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA CLOROFILASA DE PIMIENTO.

La enzima clorofilasa, descubierta inicialmente por Willstätter y Stoll en 1910, está presente en todos los vegetales, siendo responsable de la hidrólisis del ester fitilo del resto de ácido propiónico del anillo macrocíclico de clorofilas, liberando el alcohol fitol.

Mediante ensayos preliminares, y basándonos en lo encontrado en la bibliografía, las condiciones que empleamos para la medida de la actividad se fijaron inicialmente como siguen: pH de incubación 8.0, temperatura de incubación 40°C y tiempo de incubación 30 minutos. Así mismo, el extracto enzimático se mezcla en proporción 1:1 con buffer a pH 8.0 y se añade el sustrato, clorofila *a*, disuelto en 0.1 ml de acetona. Posteriormente, con los resultados que se obtengan del estudio de la enzima, se establecerán las condiciones óptimas. La separación y cuantificación del producto formado y el sustrato remanente se realiza mediante HPLC aplicando el método de Mínguez et al. (1991c) con pequeñas variaciones, según se ha explicado en la sección de Experimental.

1.- Aislamiento y purificación parcial de la enzima.

La enzima clorofilasa es una proteína intrínseca de las membranas tilacoidales de cloroplasto, lo que hace necesario el empleo de detergentes que disgregando la estructura lipídica de la membrana permita su solubilización.

Inicialmente se intentó realizar una extracción directa de la enzima a partir del tejido vegetal fresco utilizando tampón fosfato a pH=7 conteniendo Tritón X-100 al 0.1%. El extracto crudo que se obtiene presenta actividad clorofilasa, sin embargo la coloración verde del mismo indica la presencia de pigmentos clorofílicos solubilizados que pueden distorsionar los resultados al referirlos a cantidades conocidas de sustrato externamente añadido. Así mismo, tras analizar el resultado de las incubaciones se detecta la presencia de feofitinas, muy probablemente procedentes del fruto y formadas durante la manipulación de la muestra.

Dada la imposibilidad de obtener extractos incoloros de modo directo se opta por realizar una precipitación de la enzima utilizando acetona a -20°C, siendo necesarias hasta cinco extracciones sucesivas con acetona para obtener un precipitado proteínico blanco.

Partiendo de 10 gramos de fruto se obtiene aproximadamente 1 gramo de polvo acetónico. A partir de éste se realiza la extracción de la enzima a partir de 0.1 gramos de polvo acetónico y utilizando 5 ml de tampón fosfato 5 mM pH=7.0 KCl 50 mM 0.24% Tritón X-100, dejando actuar durante una hora y con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se filtra por una capa de cuatro gasas de algodón y el filtrado se centrifuga a 15000 g y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido constituye el extracto crudo. En la Figura 29 se muestra la relación que existe entre el tiempo de extracción y la cantidad de enzima extraída expresada como actividad medida. Como puede observarse, a partir de los 40 minutos la actividad encontrada se hace constante, no obstante se selecciona un tiempo de extracción de 60 minutos para asegurar un mejor rendimiento.

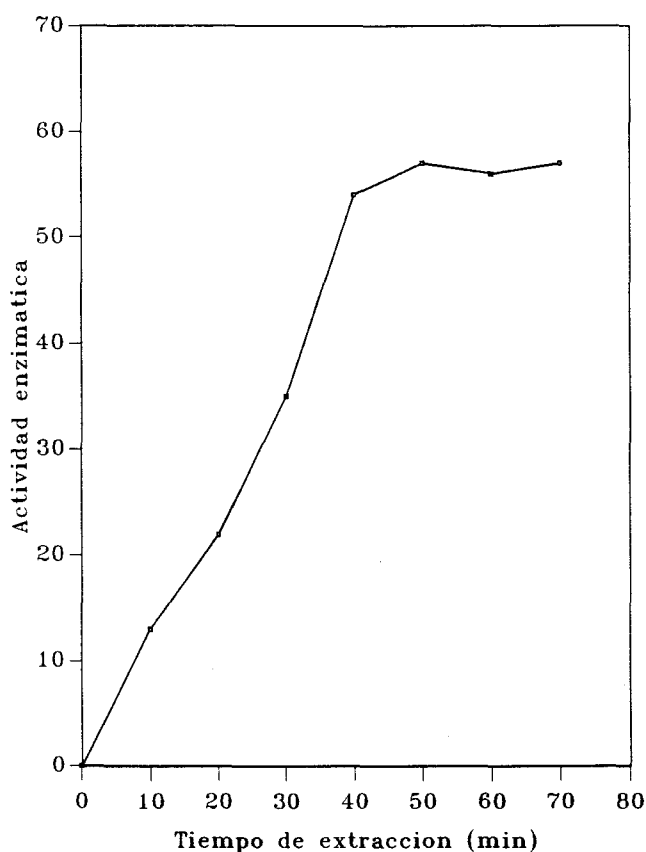


Figura 29: Optimización del tiempo de extracción de la enzima.

El extracto crudo contiene todas las proteínas solubles en las condiciones utilizadas, que por ser bastante generales deben ser muy numerosas. Por este motivo, y para eliminar posibles interferencias, que disturben los estudios posteriores de propiedades de la enzima, se opta por realizar una purificación parcial de la misma mediante precipitación fraccionada con sulfato amónico, aprovechando la propiedad de las proteínas a precipitar ante cambios bruscos de fuerza iónica en el medio. La proteínas así precipitadas conservan su conformación nativa por lo que pueden volver a ser solubilizadas sin experimentar desnaturalización. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 30, indican que las fracciones precipitadas que se recogen en el intervalo 30-60% de saturación con sulfato amónico contienen la fracción proteínica que incluye al enzima clorofilasa. Por lo tanto al precipitado obtenido en dicho rango de saturación con sulfato amónico y redisolto en el tampón de extracción lo denominaremos extracto purificado.

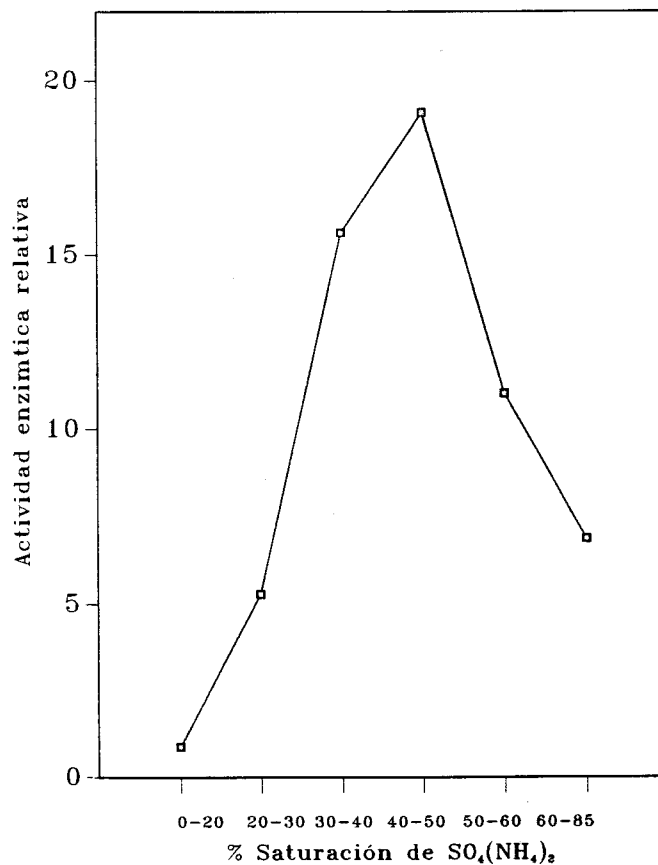


Figura 30: Fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico.

2.- Propiedades catalíticas.

Las enzimas son proteínas encargadas de catalizar reacciones biológicas en los seres vivos. El resultado de las reacciones catalizadas por las enzimas así como la reversibilidad de las mismas se ve muy afectado por las condiciones del medio. La naturaleza polipeptídica de las enzimas hace que estas no solo afecten la reacción química en sí, sino que también lo hacen sobre la enzima, cuya estructura conformacional activa y modo de actuación se ve modificada en función del pH, temperatura, salinidad del medio, presencia de cofactores y coenzimas, etc, (Lehninger, 1985). En este sentido estudiaremos las principales propiedades catalíticas de la enzima clorofilasa, a fin de poder entender mejor su modo de acción.

- Efecto del pH sobre la actividad clorofilasa.

La existencia de grupos amino, carboxílicos y tiólicos en los aminoácidos constituyentes de las proteínas condicionan, en función del pH, las características físico-químicas de la proteína y por lo tanto sus características cinéticas (Hirs y Timasheff, 1977). En la Figura 31 se muestra la dependencia encontrada para la enzima clorofilasa de pimiento en el rango de pH 7.0-12.0.

Como puede observarse, la enzima muestra el máximo de actividad al valor de pH 8.5, punto que se encuentra situado en una especie de meseta comprendida entre pH 8.0-9.0, inhibiéndose hasta un 70% la actividad de la enzima a valores de pH 7.0 y 11.5.

Se sabe que como consecuencia de la actividad fotosintética en los cloroplastos, se genera un bombeo de protones a favor de gradiente desde el estroma al lumen o espacio intratilacoidal, llegándose a valores de pH 8.5 en el estroma y 5.0 en el lumen (Hooper, 1984). Durante la maduración de los frutos del pimiento los cloroplastos se transforman en cromoplastos con lo cual se desorganizan las membranas tilacoidales. Este hecho puede ser de suma importancia puesto que como se ha visto la enzima clorofilasa muestra su máximo de actividad a pH 8.5, y por lo tanto durante la disgregación de las membranas tilacoidales el enzima puede ponerse en contacto con el medio a pH próximos a este máximo, siendo coetáneo con el fenómeno de rápida desaparición de clorofilas.

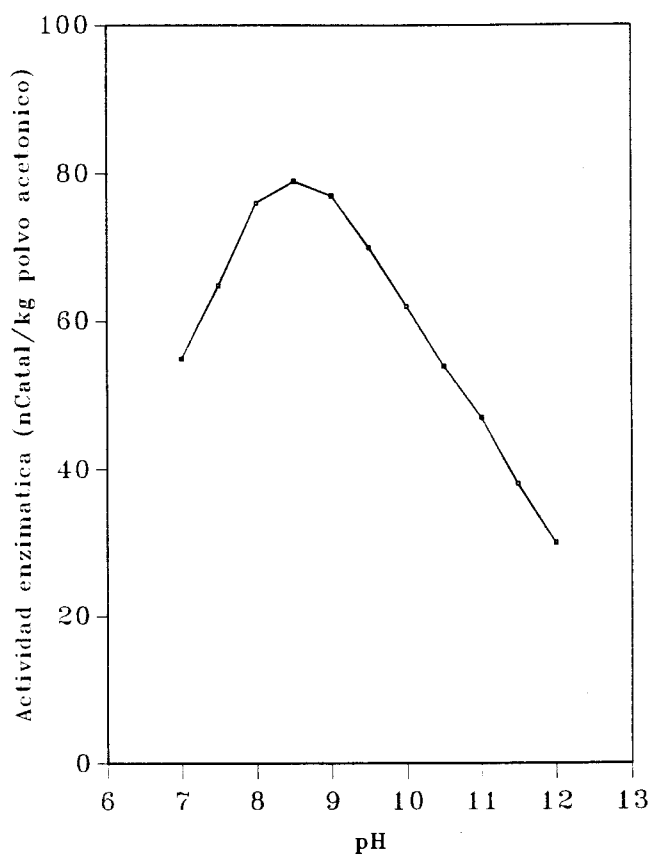


Figura 31: Dependencia de la actividad clorofilasa con el pH del medio.

- *Efecto de la temperatura sobre la actividad clorofilasa.*

* **Dependencia de la actividad con la temperatura.**

Cuando las proteínas se someten a temperaturas elevadas experimentan un proceso de desnaturalización, insolubilizándose en muchos casos, quedando reflejado en una inactivación enzimática que en la mayoría de los casos resulta irreversible.

En la Figura 32 se muestra la dependencia frente a la temperatura encontrada para la enzima clorofilasa de pimiento a pH 8.5. Se observa que en el rango de temperaturas ensayado, 30-70°C, presenta un óptimo a 50°C. El primer tramo de la curva de actividad, comprendido entre 30 y 50°C obedece a un proceso de activación térmica gobernado por la ley de Arrhenius. Por el contrario el tramo comprendido entre 50 y 70°C responde a un proceso de desnaturalización térmica de la enzima, y como consecuencia un efecto negativo sobre la actividad.

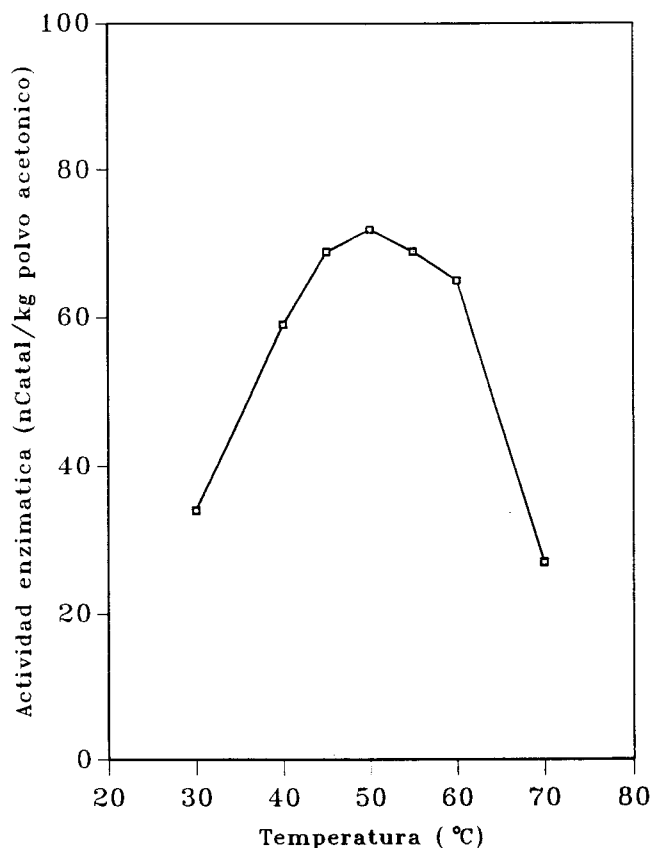


Figura 32: Dependencia de la actividad clorofilasa con la temperatura.

*** Estabilidad térmica de la enzima clorofilasa in vitro .**

Las cinéticas de desnaturalización que presenta la enzima clorofilasa a cuatro temperaturas, 40, 50, 60 y 70°C, medidas al óptimo de pH (8.5) se muestran en la Figura 33.

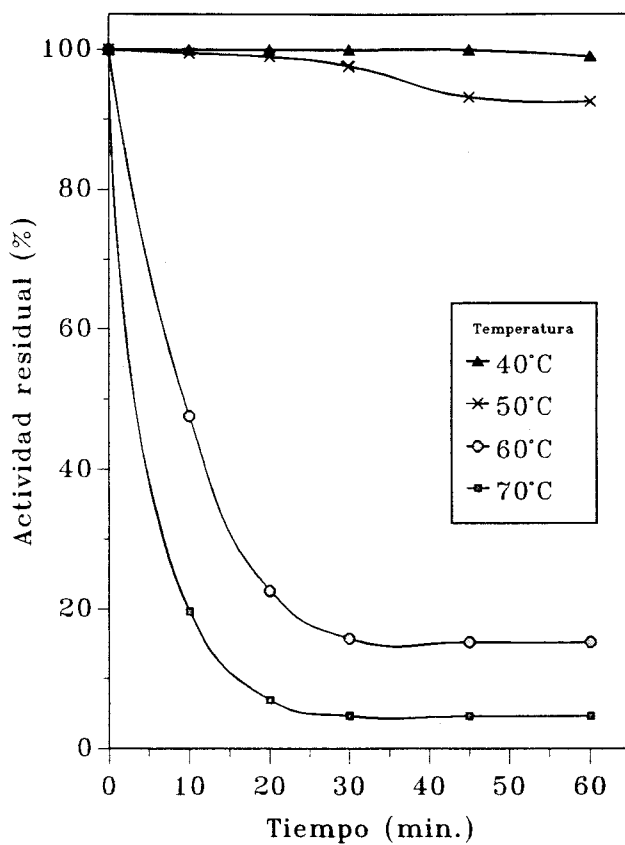


Figura 33: Cinética de desnaturalización térmica.

A 40°C la enzima se muestra estable durante el tiempo ensayado, mientras que a 50°C experimenta una pequeña degradación por desnaturalización a partir de los 40 minutos. Tanto a 60 como 70°C la enzima se degrada rápidamente, perdiéndose el 50 y 20% de la actividad respectivamente a los 10 minutos, y el 80 y 95% de la actividad a los 20 minutos.

Los resultados obtenidos a 40°C sugieren que la enzima debe presentar una buena estabilidad a temperatura ambiente (25°C), por lo cual la manipulación de la misma durante el estudio de la proteína no debe presentar problemas de desnaturalización por efectos térmicos. No obstante, el estudio de una proteína requiere conocer como influyen sobre la misma las condiciones de almacenamiento, siendo numerosos los casos en que es necesario añadir sustancias protectoras de grupos sulfhidrilos, antioxidantes, detergentes, sales inorgánicas, inhibidores de enzimas proteolíticas, etc. En el caso de la enzima clorofilasa el estudio se limita a conocer el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la actividad de la misma.

Como temperaturas de almacenamiento se han ensayado -20, 4 y 25°C, midiéndose la actividad inicialmente en intervalos de un día, y posteriormente a intervalos de un mes en el caso de la temperatura más baja. Se comprueba como a 25°C la enzima pierde un 50% de su actividad en 6 días, mientras que a 4°C lo hace en 18 días. Cuando se almacena congelada a -20°C la actividad se mantiene inalterada durante mas de doce meses que es el tiempo en que se ha controlado.

- *Especificidad por sustratos.*

Hoy en día resulta casi indiscutible el importante papel de la enzima clorofilasa en el catabolismo de clorofilas. Aunque observaciones como las de Amir-Shapira et al., (1987) en hojas senescentes de perejil sugieren que el catabolismo de estos compuestos se inicia con la retirada del ión Mg generando feofitinas, derivados en los cuales el ión magnesio ha sido reemplazado por dos protones del medio mediante un mecanismo puramente químico en la mayoría de los casos. No obstante, se tiene cada vez más certeza de que la reacción de retirada de Mg *in vivo*, tanto antes como después de la defitilación de clorofila por clorofilasa, involucra a otro enzima llamado Mg-dequelatasa, cuyo papel en el catabolismo de clorofilas ha sido convincentemente demostrado por Ziegler et al. (1988) en estudio con

Chlorella fusca, y más recientemente por Langmeier et al., (1993) en hojas senescentes. Resulta por lo tanto interesante investigar la mayor o menor afinidad de clorofilasa por diferentes sustratos. Aunque en el presente trabajo no se ha estudiado la posible intervención de Mg-dequelatasa, podemos afirmar que no se han detectado derivados libres de Mg durante la maduración, lo cual no quiere decir que dicha enzima no intervenga, ya que pudiera ocurrir, que conforme se vayan formando estos compuestos, sean a su vez defitilados por clorofilasa y a continuación catabolizados en mayor extensión.

La especificidad por sustrato se estudia tanto para clorofilas *a* y *b*, como para feofitinas *a* y *b*, determinándose en cada caso la cantidad de producto formado, clorofilidas y feoforbidas respectivamente. A tal fin se realizan incubaciones de alícuotas del extracto purificado con cantidades crecientes de cada sustrato en el rango de concentraciones de 2 a 60 μM , mostrándose en la Figura 34 las curvas de cinética obtenidas. Como se observa, en todos los casos la cinética de la reacción se ajusta a un comportamiento de Michaelis-Menten mostrando un fenómeno de saturación a partir de una determinada concentración de sustrato. Concentraciones crecientes no modifican la velocidad de reacción, que se hace de orden cero. En el caso de feofitina *b* se encuentra una curiosa respuesta de inhibición por sustrato a concentraciones superiores a 5 μM . A fin de calcular los parámetros característicos para cada sustrato, K_m y V_{max} , en la Figura 35 se representan la transformación de Lineweaver-Burk para dichas cinéticas. Los valores encontrados se recogen en la Tabla VIII. Como puede observarse, éstos son similares a los suministrados por otros autores para otros vegetales y algas, así K_m para clorofila *a* vale 10 μM en hojas de té (Kuroki et al., 1981) y 7.0 μM en *Chlorella regularis* (Nishiyama et al., 1994).

Para establecer la afinidad de clorofilasa por los diferentes sustratos se analizan tanto los valores de K_m como los de V_{max} , ya que la información que suministran ambos parámetros es complementaria. Según los valores de K_m , la enzima muestra mayor afinidad por clorofila *b* que por clorofila *a*, mientras que su velocidad máxima es superior para clorofila *a*, lo cual conlleva una más rápida transformación de este sustrato. No obstante, la afinidad máxima de la enzima se muestra para el sustrato feofitina *a*, aunque con una V_{max} inferior que clorofila *a*. Esto explicaría como en el caso de existir actividad tipo Mg-dequelatasa no detectemos estos derivados libres de Mg, puesto que según se fuesen formando serían degradados por clorofilasa en mayor extensión.

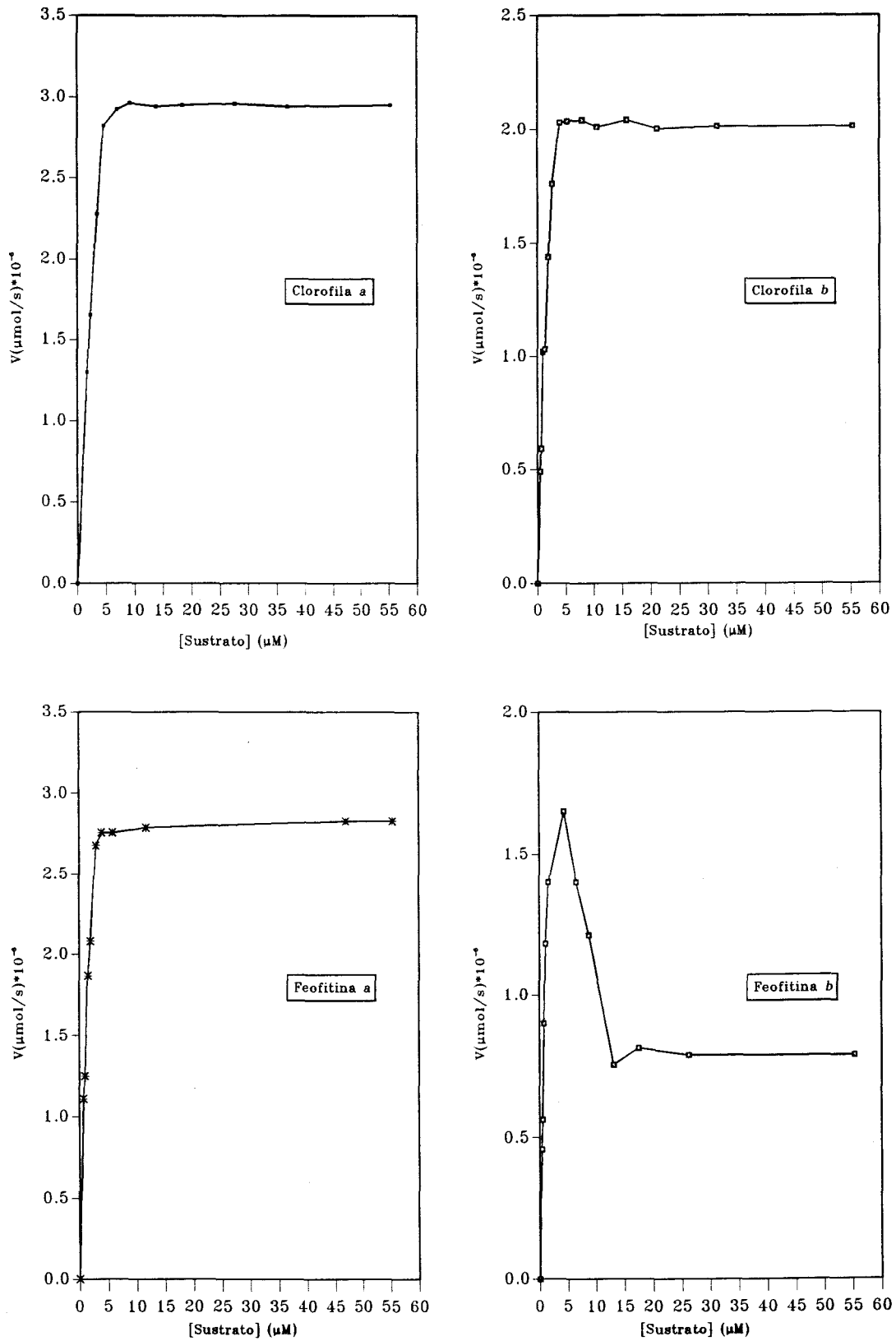


Figura 34: Cinéticas de actuación enzimática de clorofilasa frente a clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* y feofitina *b*.

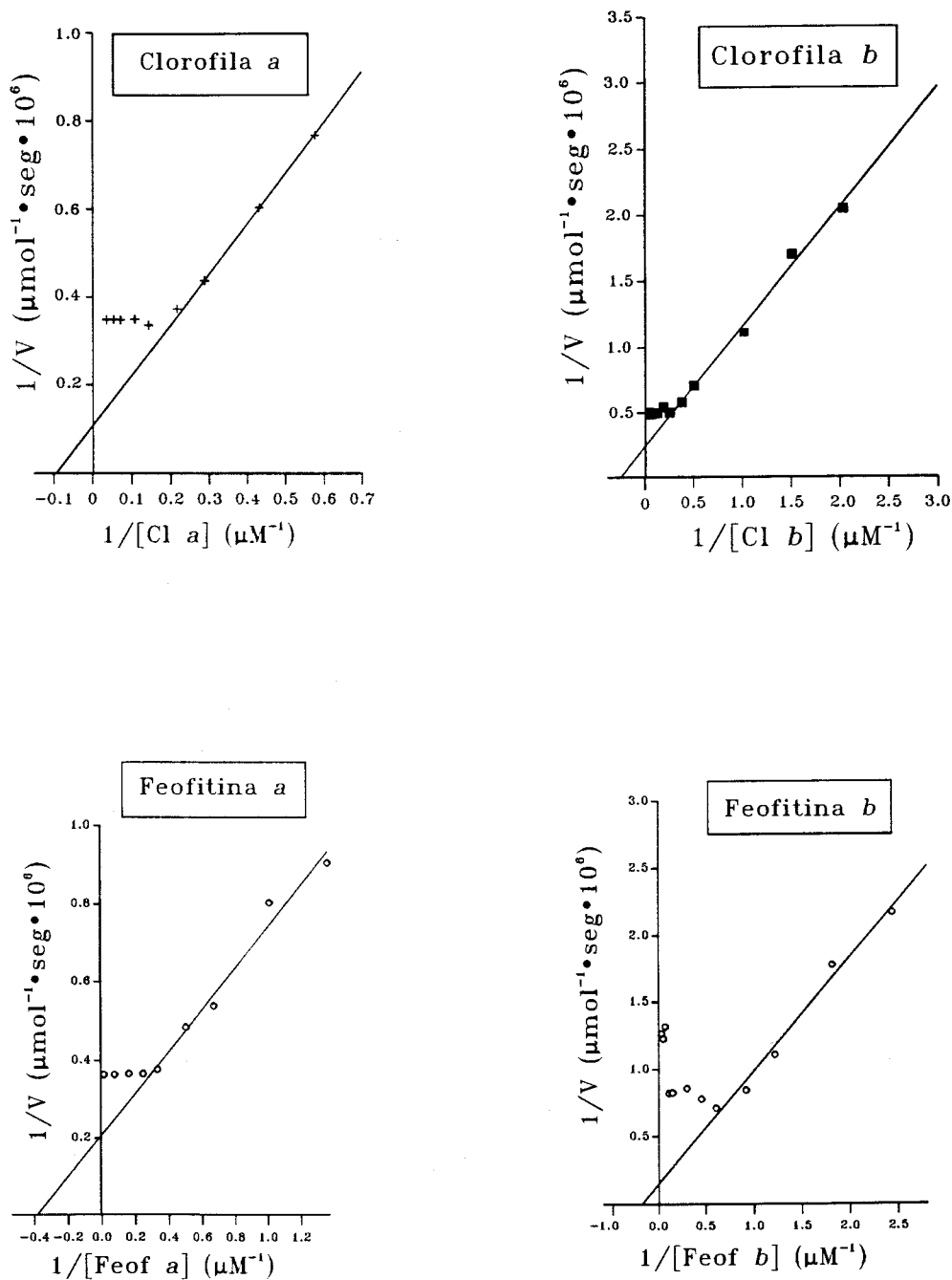


Figura 35: Representaciones de Lineweaver-Burk de las curvas de cinética enzimática de clorofilasa para el cálculo de K_m y V_{max} en función de cada sustrato.

Tabla VIII: Valores de Km y Vmax para la enzima clorofilasa de pimiento en función del sustrato.

Sustrato	Km (μM)	Vmax ($\mu\text{mol}\cdot\text{seg}^{-1}$)
Clorofila <i>a</i>	10.70	$9.33 \cdot 10^{-6}$
Clorofila <i>b</i>	4.04	$4.48 \cdot 10^{-6}$
Feofitina <i>a</i>	2.67	$5.01 \cdot 10^{-6}$
Feofitina <i>b</i>	6.37	$7.49 \cdot 10^{-6}$

En el caso de feofitina *b*, debido al fenómeno de inhibición por sustrato que muestra la enzima, los parámetros que se obtienen sólo deben considerarse como constantes aparentes.

Como observación interesante, cabe destacar que durante el curso de este estudio se ha podido comprobar que cuando los patrones de clorofilas *a* y *b* están mezclados con sus correspondientes epímeros en C13², clorofilas *a'* y *b'* respectivamente, se observa una actuación preferente de la enzima sobre clorofila *a* y *b*. Este hecho ha sido también observado muy recientemente por Nishiyama et al. (1994) estudiando clorofilasa de *Chlorella regularis*, llegándose a la conclusión de que la enzima clorofilasa reconoce la estereoquímica del C13², hidrolizando las formas *a* y *b* cuya estereoquímica es 13²R.

- Efecto de metales sobre la actividad clorofilasa.

Se sabe desde hace tiempo que multitud de proteínas, sobre todo enzimáticas, necesitan de la presencia de ciertos iones metálicos, la mayoría oligoelementos, para su correcta actuación, siendo en muchos casos su ausencia causa de inhibición total de la actividad enzimática. Generalmente, el ión metálico simplemente actúa como cofactor, pero en algunos casos forma parte de la proteína, denominándose entonces metaloproteína.

En nuestro caso se realizaron incubaciones de la enzima clorofilasa parcialmente purificada en presencia de diversos iones metálicos. Para ello se colocaron por triplicado alícuotas de 0.5 ml de extracto enzimático purificado, y disuelto en tampón fosfato 5 mM pH=7.0 KCl 50 mM 0.24% Tritón X-100, en presencia de 0.5 ml de tampón tris-HCl 50 mM pH=8.5 conteniendo el metal en concentración 1 mM. La mezcla se incubó durante 24 horas a 4°C en la oscuridad. En paralelo se mantuvo un testigo en las mismas condiciones. Pasado ese tiempo, y con la finalidad de conocer el efecto inhibitor o activador de cada metal ensayado, se midió la actividad mostrada por la enzima en cada muestra. En la Tabla IX se muestran los resultados encontrados.

Como se observa en todos los casos se ha encontrado un efecto inhibitor, si bien éste es mínimo para Mg y Fe(III), mostrando niveles que son desestimados en estudios similares (Kuroki et al., 1981). Esta observación es esperable puesto que ambos metales están íntimamente relacionados con el proceso biosintético de clorofilas y por tanto deben estar

Tabla IX: Efecto de la presencia de metales sobre la actividad de la enzima clorofilasa de pimiento.

	Variación en Actividad (%)
Testigo	0.00
Mg ²⁺	11.48 (I)
Mn ²⁺	67.14 (I)
Hg ²⁺	84.72 (I)
Cu ²⁺	55.12 (I)
Zn ²⁺	60.03 (I)
Co ²⁺	56.03 (I)
Fe ²⁺	88.97 (I)
Fe ³⁺	13.38 (I)

I: Inhibición

presentes *in vivo* en su entorno. Así Mg forma parte de la molécula de clorofila y es cofactor de diversas enzimas. Por otro lado Fe afecta tanto a la síntesis de ácido δ -aminolevulínico, porfirinas y clorofilas, como al desarrollo de las membranas tilacoidales y del fotosistema I (Hooper, 1984).

Metales como Mn, Cu, Zn y Co inhiben la actividad enzimática reduciéndola entre un 55 a 65%. Muy seguramente estos metales reaccionen con grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína, puesto que como es sabido los sulfuros de estos metales son bastante reactivos, lo cual indica la necesidad de dichos grupos en el mecanismo de actuación. Esto parece apoyarse cuando se analiza el efecto de los dos metales restantes, Hg y Fe(II), altamente reactivos con grupos sulfuros explicándose así su gran efecto inhibitorio.

In vivo, la mayoría de estos metales son necesarios a nivel de oligoelementos realizando en muchos casos funciones catalíticas. La deficiencia de alguno de estos elementos provoca en la planta síntomas externos indicativos de la misma (Wallace, 1961). Uno de esos síntomas suele ser una clorosis o amarilleamiento de hojas y frutos, pudiendo indicar que ante la deficiencia de alguno de estos elementos la enzima clorofilasa se vea activada y actúe a mayor rendimiento provocando la clorosis.

3.- Implicación de grupos funcionales en la actividad enzimática.

Resulta interesante estudiar la implicación de diversos grupos funcionales en la actividad de la enzima, bien porque éstos sean necesarios para mantener la estructura funcional de la proteína, o bien porque sean necesarios en el sitio activo para la interacción con los sustratos (Shaw, 1970). Para abordar este tipo de estudio se suelen emplear reactivos específicos que modifican o bloquean un grupo funcional concreto, tras lo cual se mide la actividad de la enzima referida a un testigo que no ha sido tratado. Los grupos funcionales que más interesan desde el punto de vista del mantenimiento de la estructura conformacional de la proteína son los grupos disulfuros y sulfhidrilos, así como grupos aminos pero en estos últimos normalmente las interacciones son más débiles, tipo puentes de hidrógeno.

* Grupos sulfhidrilos

La involucración de estos grupos en la actividad enzimática puede ser investigado haciendo uso de reactivos específicos que se unen covalentemente a dichos grupos, modificando la estructura protéica, siendo mayor el efecto inhibitorio cuanto mayor es la participación de dicho grupo en la conformación del sitio activo de la enzima. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla X.

Tabla X: Efecto de reactivos de grupos sulfhidrilo sobre la actividad enzimática de clorofilasa de pimiento.

	Variación en Actividad (%)
Testigo	0.00
IAA	6.70 (I)
NEM	13.29 (I)
p-HMB	83.03 (I)
MMTS	2.43 (I)

I: Inhibición

El efecto encontrado para iodoacetamida (IAA), N-etilmalenimida (NEM) y metilmetanotiosulfonato (MMTS) es pequeño aunque siempre inhibitorio. Sin embargo, al utilizar p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), potente reactivo de grupos sulfhidrilos, se consigue casi la inhibición completa de la enzima. Estos resultados, además de mostrar la existencia de grupos sulfhidrilos en la enzima activa, muy posiblemente indican que algunos de estos deben estar situados lejos del sitio activo, y por lo tanto con fácil accesibilidad a reactivos poco agresivos. Por otro lado, en el sitio activo, menos accesible, también debe encontrarse algún grupo sulfhidrilo que intervenga en la reacción enzimática, como se deduce con el tratamiento con p-HMB que desactiva casi totalmente a la enzima. Los resultados obtenidos están en consonancia con los aportados por Kuroki et al. (1981) para clorofilasa en

hojas de té. No obstante, en contraposición a estos resultados cabe resaltar los trabajos de McFeeters et al. (1971) con clorofilasa de *Ailanthus altissima*, en los cuales concluyen la ausencia de estos grupos en la proteína.

* Puentes disulfuro.

La implicación que tienen los puentes disulfuro de una enzima en mantener la conformación enzimática activa se puede conocer haciendo uso de reactivos reductores que provoquen la reducción y por tanto rotura de dichos puentes. Para ello se realizan incubaciones de extractos purificados de enzima en presencia de ditioneitol (DTT) y β -mercaptoetanol (β -ME) a 1mM de concentración, manteniendo la mezcla 24 horas a 4°C en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo se mide la actividad relativa referida a un testigo. Los resultados obtenidos indican para ambos reactivos un efecto de activación enzimática como consecuencia de la reducción de los puentes -S-S- a grupos -SH. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla XI. Como se ha comprobado previamente el bloqueo de estos grupos produce un efecto inhibitorio, variable según el reactivo empleado, que indica la necesidad de algunos de estos grupos en la acción enzimática, muy posiblemente a nivel del sitio activo. No obstante en este caso al tratarse de grupos puentes -S-S- su reducción implica una variación de la conformación activa, que en este caso se traduce en una aparente activación muy probablemente debido a una mayor accesibilidad al centro activo por parte del sustrato, aunque muy seguramente a costa de pérdida de especificidad por el mismo.

Tabla XI: Efecto de la actuación de reactivos reductores de puentes disulfuro sobre la actividad de la enzima clorofilasa de pimiento.

	Variación en Actividad (%)
Testigo	0.00
DDT	12.67 (A)
β -ME	14.71 (A)

A: Activación

*** Grupos amino.**

Para investigar la implicación de grupos aminos de aminoácidos básicos en la actividad enzimática se suele emplear el ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS). Como resultado de la actuación de este reactivo se observa una inhibición del 20% (Tabla XII).

Tabla XII: Efecto de la actuación de reactivos específicos de grupos amino sobre la actividad de la enzima clorofilasa de pimiento.

	Variación en Actividad (%)
Testigo	0.00
TNBS	20.25 (I)

I: Inhibición

En toda proteína existe al menos un grupo amino, denominado terminal, y que pertenece al aminoácido situado en el extremo final de la cadena polipéptica. Adicionalmente la presencia habitual de aminoácidos que contienen más de un grupo amino, como asparragina, glutamina, lisina y arginina, provoca que la proteína presente tales grupos distribuidos por su estructura. Los grupos amino suelen interaccionar con otros similares e hidroxilos mediante puentes de hidrógeno, contribuyendo en cierta medida a mantener una adecuada

estructura conformacional en la proteína. A ser estas interacciones de carácter débil, su rotura no suele ocasionar una gran inactivación de la proteína, salvo en el caso de participación de estos grupos en el centro activo. En el presente estudio, la inactivación experimentada por la enzima es sólo de un 20%, sugiriendo que estos grupos no participan en el mecanismo de acción de la enzima, mientras que lo si hacen en cierta medida en el mantenimiento de la estructura terciaria de la misma.

4.- Optimización del procedimiento de medida de actividad clorofilasa.

Las características encontradas para clorofilasa de pimiento permiten optimizar las condiciones para la de medida de su actividad. La concentración de sustrato se fija en 100 μM , o lo que es igual añadir 0.1 μmol de sustrato en los 1.1 ml de volumen de la mezcla de ensayo. Con esta concentración se garantizan las condiciones de saturación que permiten realizar la medida de la actividad enzimática de forma independiente con respecto a la concentración de sustrato.

El valor de pH de medida se fija en 8.5, que es el óptimo encontrado y cuyo valor se consigue utilizando tampón Tris-HCl 50mM. La temperatura de incubación se fija en 50°C, por ser éste el valor al cual la enzima muestra el óptimo de actividad.

El tiempo de incubación se fijó inicialmente en 30 minutos, sin embargo en aquellos casos en que la concentración de enzima sea baja la transformación del sustrato es pequeña por lo que debe aumentarse dicho tiempo para permitir una medida mas precisa del producto formado. Para ello se mide el porcentaje de transformación de sustrato a diferentes tiempos utilizando las condiciones óptimas de medida. Los valores encontrados definen una recta, lo cual es indicativo de que se está en condiciones de saturación por sustrato, encontrándose que a los 60 minutos hay una transformación del 72% del sustrato, lo que permite una medida muy precisa del producto formado, y al mismo tiempo el 28% restante de sustrato mantiene aún las condiciones de saturación.

En cuanto a la extracción de la enzima esta se realiza partiendo de 10 gramos de fruto para obtener el precipitado proteínico o polvo acetónico. Seguidamente 0.1 gramos del mismo se extraen con 10 mL de tampón fosfato 5 mM pH=7.0 KCl 50 mM 0.24% Tritón X-100

durante una hora a temperatura ambiente. El extracto obtenido se filtra y centrifuga a 15000 g durante 15 minutos, y seguidamente se añade, lentamente y en frío, sulfato amónico hasta 30% de saturación desechando el precipitado obtenido al centrifugar a 20000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se satura nuevamente hasta 60% de sulfato amónico, y el precipitado recogido tras la centrifugación se redisuelve en 5 mL del tampón utilizado para la extracción constituyendo esta solución el extracto activo y purificado de la enzima y sobre el cual se realiza la medida de actividad.

IV. CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE PIGMENTOS DURANTE LA MADURACION DE LOS FRUTOS.

Al objeto de conocer como influye el proceso de maduración sobre el contenido y clase de pigmentos en frutos de las variedades de pimiento *Bola* y *Agridulce*, se seleccionan tres estados de maduración consecutivos, que según su color aparente se denominan: verde, cambiante y rojo. En las Figuras 36 y 37 se muestran los resultados encontrados, los cuales evidencian claramente como el proceso de maduración implica una variación muy brusca en la composición de pigmentos para ambas variedades, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

En líneas generales, puede deducirse que el cambio de color que implica la maduración conlleva tanto la desaparición de clorofilas como la aparición de nuevos carotenoides los cuales incrementan en concentración a medida que progresa dicho proceso. Este hecho pone de manifiesto, que durante este proceso se produce una síntesis neta de estos pigmentos, cuya extensión presenta una gran dependencia varietal. Así, en la variedad *Agridulce* el contenido carotenoide aumenta unas 35 veces en el fruto rojo maduro, mientras en la variedad *Bola* el aumento detectado es de 16 veces el inicial. Así mismo, la posible participación del fitol liberado por acción de clorofilasa, durante el catabolismo de ésta, en la biosíntesis de los carotenoides, como apuntan Ramírez y Tomes (1964), es un tanto difícil de establecer, ya que el grado de síntesis *de novo* para carotenoides supera con creces al que tendría lugar por el simple concurso del fitol, aunque no se descarte su participación.

Con los datos correspondientes a los estados de maduración controlados, al ser la desaparición de clorofilas y la síntesis de carotenoides demasiado brusca, resulta imposible estudiar de forma individualizada el curso de las transformaciones biosintéticas que se dan para cada pigmento durante el proceso de maduración. En consecuencia para poder realizar un adecuado seguimiento en la evolución de pigmentos, en el siguiente año el estudio se realiza abarcando cinco estados de madurez sucesivos y bien diferenciados: verde, cambiante I, cambiante II, rojo I y rojo II.

Por otro lado, y puesto que la planta del pimiento presenta varias floraciones consecutivas, en un mismo de pie planta los frutos maduran de forma escalonada, siendo necesario que el agricultor realice hasta tres recolecciones. En este sentido, y con la finalidad

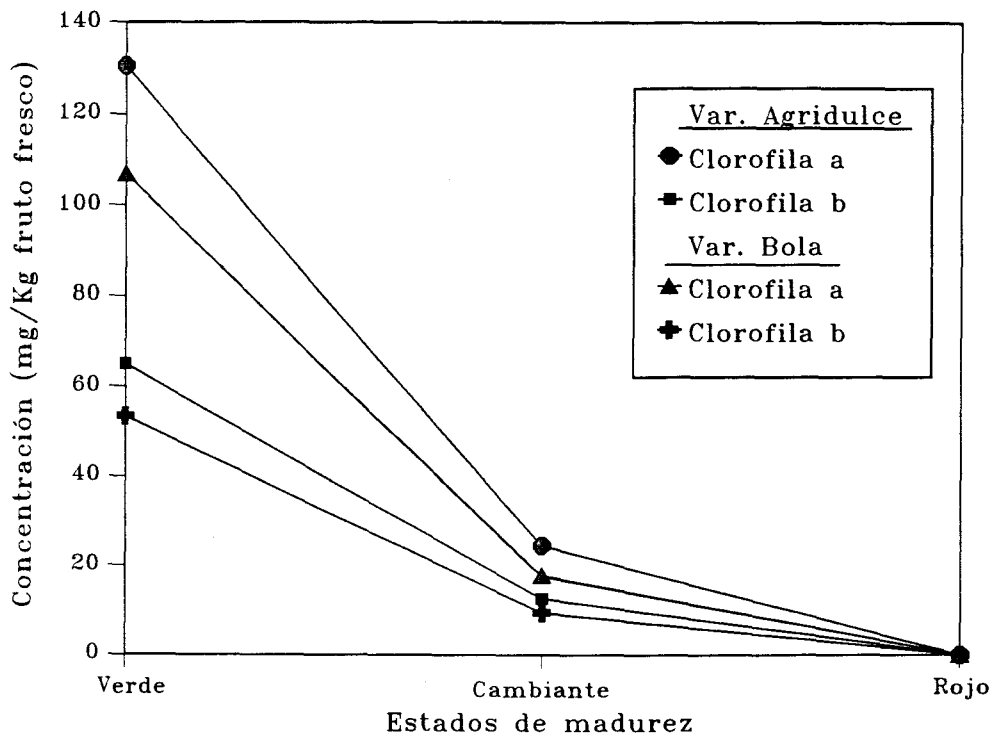


Figura 36: Evolución de la composición clorofílica durante la maduración de frutos de pimiento de la variedades *Bola* y *Agridulce*. Estados de madurez: verde, cambiante y rojo.

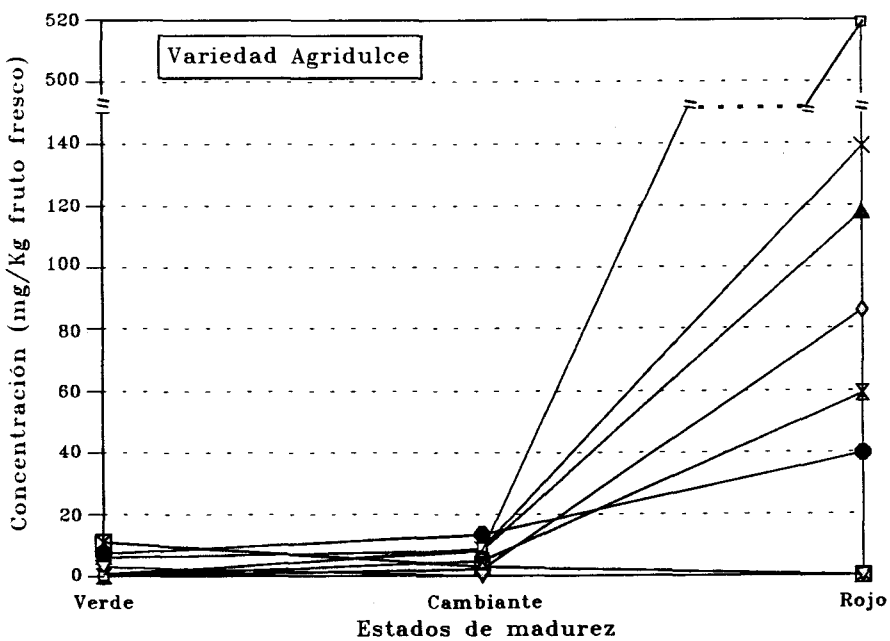
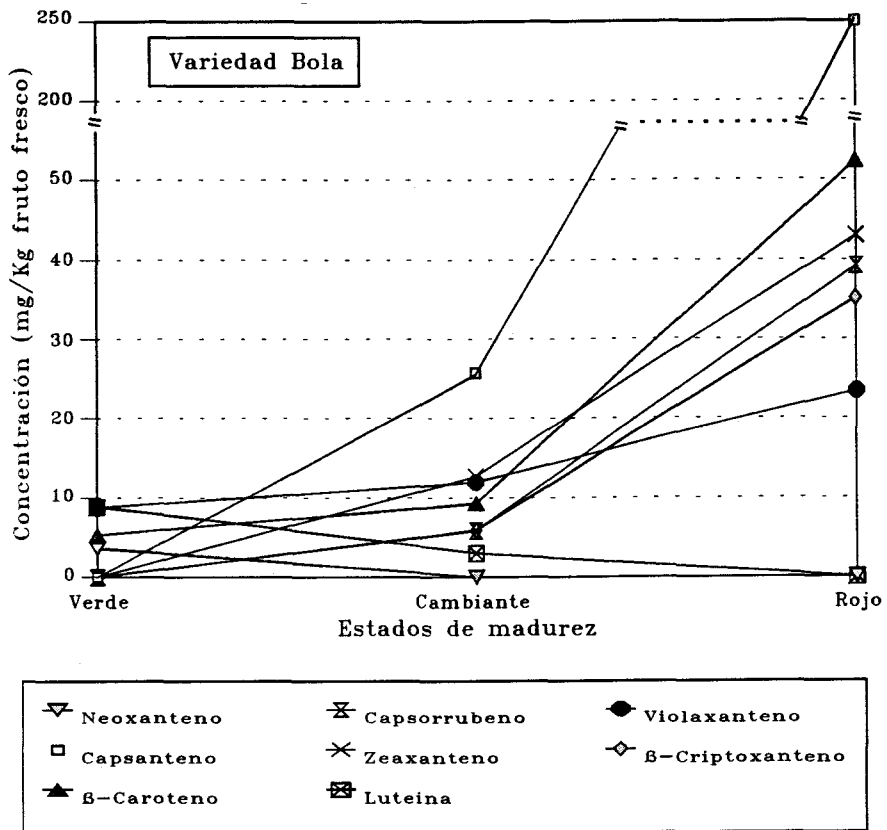


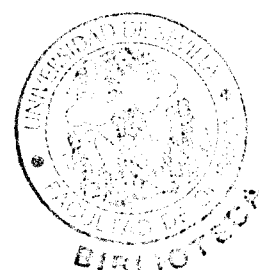
Figura 37: Evolución de la composición carotenoides durante la maduración de frutos de pimiento de las variedades *Bola* y *Agridulce*. Estados de madurez: verde, cambiante y rojo.

de conocer la influencia del momento de recolección sobre el contenido en pigmentos de los frutos en el presente estudio se contempla este factor y se distingue entre frutos correspondientes al principio y final de campaña. El tiempo que separó ambas tomas de muestra, primera y tercera recolección, fue de aproximadamente un mes.

Así mismo, y ante la rápida desaparición de clorofilas durante la maduración de los frutos, se planteó el estudio de los niveles de actividad de la enzima clorofilasa, implicada en dicho cambio y cuya actuación en numerosos frutos está íntimamente ligada con los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en la planta durante el proceso de maduración.

En las Figuras 38 y 39 se muestran los espectros de absorción electrónica UV-visible correspondientes al extracto global de pigmentos obtenido para cada estado de madurez en ambas variedades. Como se puede observar el espectro cambia espectacularmente como consecuencia de la desaparición de los pigmentos clorofílicos y la aparición progresiva de carotenoides cetónicos de coloración roja. En todos los casos los espectros están realizados en condiciones idénticas por lo que la escala de absorbancia nos indica el incremento en el contenido de pigmentos.

Aunque tanto el proceso de desaparición de clorofilas como el de síntesis *de novo* de carotenoides son paralelos, al tratarse de compuestos de distinta naturaleza, su estudio se realiza de forma separada. No obstante, en ningún momento hay que olvidar que ambos procesos ocurren dentro del cloroplasto, y que por lo general en los frutos ocurren al unísono y de forma más o menos coordinada, poniéndose en juego complejos mecanismos enzimáticos, que activados a nivel fisiológico, controlan tanto procesos anabólicos como catabólicos.



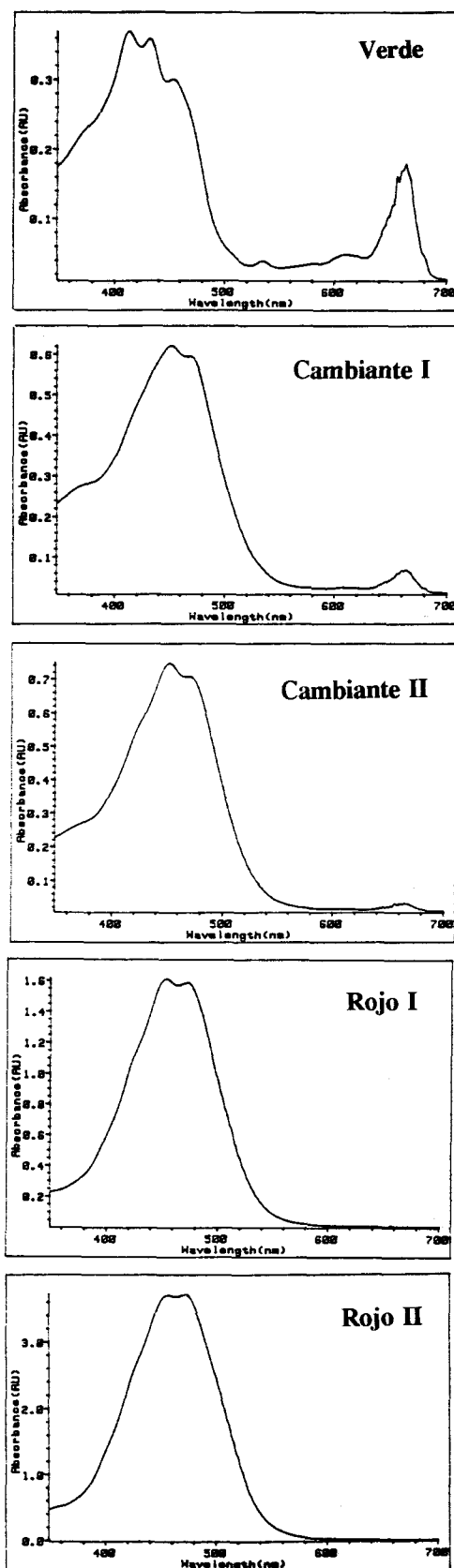


Figura 38: Cambios en el espectro de absorción electrónica del extracto global de pigmentos durante la maduración de frutos de pimiento de la variedad *Bola*.

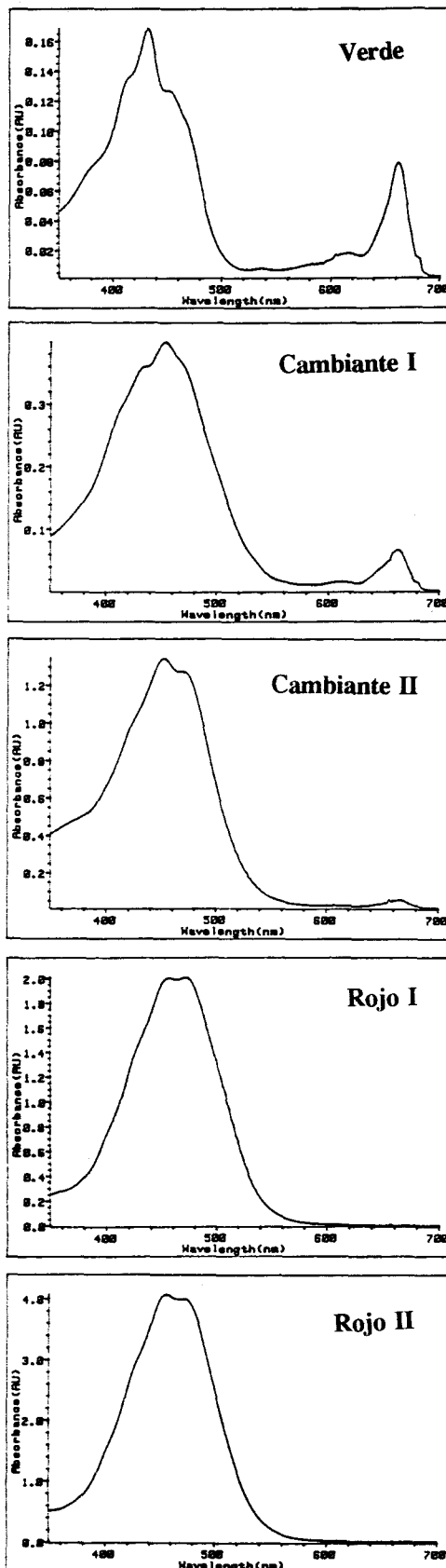


Figura 39: Cambios en el espectro de absorción electrónica del extracto global de pigmentos durante la maduración de frutos de pimienta de la variedad *Agridulce*.

1.- PIGMENTOS CLOROFILICOS.

- Desaparición de clorofilas.

Como puede observarse en las Tablas XIII y XIV la concentración inicial de clorofila *a* y clorofila *b* en el fruto verde va decreciendo a medida que avanza la maduración, llegando a desaparecer en el estado de rojo. La aparición de clorofilidas en el estado de verde y cambiante durante la 1ª recolección es indicativo de la presencia activa en los frutos de la enzima clorofilasa en ambos estados de madurez. El hecho de detectar los derivados defitilados en mayor proporción en frutos verdes, parece indicar que la enzima está actuando en el sentido biosintético de formación de clorofilas. La ausencia de estos metabolitos en los restantes estados de maduración como resultado del catabolismo de clorofilas, probablemente sea debido a que según sean formados por la actuación de clorofilasa en sentido degradativo, éstos sean transformados por otras enzimas en productos incoloros no detectables. El hecho de que en la variedad *Bola*, la proporción encontrada de clorofilida *a* respecto al contenido en clorofila *a* en el estado verde sea del 4.5%, frente al 1.7% en que se encuentra dicho compuesto en la variedad *Agridulce*, es indicativo de una mayor actividad clorofilasa en sentido biosintético en la variedad *Bola*.

La relación entre clorofila *a* y *b* es la propia de tejidos vegetales verdes, alrededor de 2.5. No obstante, dicha relación tiende a disminuir ligeramente al avanzar la maduración lo cual se traduce en una más rápida desaparición de clorofila *a* frente a clorofila *b*, pudiendo ser el resultado de una mayor eficiencia de actuación de la enzima clorofilasa sobre la primera, lo cual está en total concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de K_m y V_{max} anteriormente discutido.

El contenido clorofílico de la variedad *Agridulce* duplica al encontrado para la variedad *Bola* en el estado de verde y para la primera recolección, estado inicial que fijaremos como referencia, y que es indicativo de una clara influencia varietal.

La variedad *Agridulce*, debido a sus características morfológicas, experimenta una maduración homogénea en todo el fruto, lo cual hace que en los frutos de las dos recolecciones estudiadas la relación entre clorofila *a* y clorofila *b* evolucione de modo similar.

Tabla XIII: Cambios en la concentración de pigmentos clorofílicos (mg/Kg fruto fresco) durante el proceso de maduración de frutos de pimiento de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Pigmento	Estado de madurez del fruto									
	Verde		Cambiante I		Cambiante II		Rojo I		Rojo II	
	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.
<i>Variedad Agridulce</i>										
Clorofila <i>a</i>	137.62	121.30	97.07	61.04	54.72	11.07	nd	nd	nd	nd
Clorofila <i>b</i>	57.52	50.98	41.43	25.83	23.27	5.91	nd	nd	nd	nd
Clorofilida <i>a</i>	2.35	tr	0.90	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clorofilida <i>b</i>	tr	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	2.39	2.38	2.34	2.36	2.35	1.89	nd	nd	nd	nd
<i>Variedad Bola</i>										
Clorofila <i>a</i>	69.97	89.88	61.00	86.95	25.76	35.91	nd	nd	nd	nd
Clorofila <i>b</i>	28.28	35.68	27.82	33.77	11.66	14.14	nd	nd	nd	nd
Clorofilida <i>a</i>	3.30	tr	0.86	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clorofilida <i>b</i>	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	2.59	2.52	2.22	2.57	2.20	2.54	nd	nd	nd	nd

tr= trazas, nd= no detectado.

Tabla XIV: Desaparición porcentual de pigmentos clorofílicos entre estados sucesivos de maduración.

	Variedad Agridulce					
	1ª Recolección			3ª Recolección		
	V ---> CI	CI ---> CII	CII ---> RI,II	V ---> CI	CI ---> CII	CII ---> RI,II
Clorofila <i>a</i>	26.46	43.63	100	49.68	81.86	100
Clorofila <i>b</i>	27.94	43.83	100	49.33	77.12	100

	Variedad Bola					
	1ª Recolección			3ª Recolección		
	V ---> CI	CI ---> CII	CII ---> RI,II	V ---> CI	CI ---> CII	CII ---> RI,II
Clorofila <i>a</i>	12.82	57.80	100	3.26	58.70	100
Clorofila <i>b</i>	1.62	58.09	100	5.35	58.13	100

En cambio, al comparar el descenso que experimenta la concentración de ambos pigmentos al pasar de frutos en el estado de verde a cambiante (I y II) se observa, que para la primera recolección las pérdidas se sitúan en un 28 y 43% para ambas clorofilas respectivamente, mientras que en la segunda recolección el descenso que experimentan duplica su magnitud, alcanzando valores del 49 y 80% respectivamente.

Este hecho denota una desaparición más rápida de los pigmentos clorofílicos en los frutos correspondientes a la última recolección, siendo esta muy acusada en el estado cambiante II en el cual la relación entre clorofila *a* y clorofila *b* cambia bruscamente, descendiendo hasta un valor de 1.89, lo que conlleva una degradación preferente para clorofila *b*. Estas diferencias pueden ser debidas a varias causas: Por un lado, según el momento de la recolección la planta del pimiento habrá experimentado una serie de floraciones sucesivas mostrando los consiguientes y claros síntomas de estrés nutricional lo cual pudiera traducirse en un menor control del proceso degradativo de clorofilas. Por otro lado, se sabe que durante la floración y posterior desarrollo y maduración de los frutos entran en juego diferentes hormonas vegetales, sintetizadas de forma masiva en estas etapas. Estas hormonas aceleran el proceso de floración y maduración, y con ello la desaparición de clorofilas. En la primera recolección la síntesis de estas hormonas ha tenido que ser activada por primera vez, mientras que en la última recolección ya están presentes en la planta acelerando el proceso.

Las distintas características morfológicas de los frutos de la variedad *Bola* hacen que los mismos se comporten de forma distinta, y como consecuencia experimenten una maduración no homogénea. La principal causa de este fenómeno parece residir en el grosor de la pulpa, de forma que frutos que aparentemente por su color externo se consideran maduros no lo están en su interior, mostrando la placenta un color naranja que en el fruto totalmente maduro torna a roja. La pequeña desaparición de clorofilas entre los estados verde y cambiante I para ambas recolecciones en la variedad *Bola*, parece indicar que durante esta etapa aún prevalece la síntesis de clorofila sobre el catabolismo de la misma, efecto que desaparece una vez avanzado el proceso de maduración entre los estados cambiante I y II. Este hecho está en consonancia con la mayor detección de clorofilidas y la interpretación de actividad clorofilasa en sentido biosintético en el estado de verde. Además, el contenido clorofílico durante la última recolección es siempre superior al encontrado para la primera, mostrando así mismo valores de relación Cl_a/b superiores. Esto indica que el efecto de las sucesivas

fructificaciones y recolecciones sobre esta variedad es contrario a lo observado para *Agridulce*, de modo que se retarda la desaparición de clorofilas sin disminuir la síntesis de las mismas, con lo cual el contenido en clorofilas es mayor en la última recolección.

- Actividad clorofilasa.

Paralelamente al control de pigmentos clorofílicos se ha seguido la evolución de los niveles de actividad clorofilasa en cada uno de los estados de madurez para ambas variedades. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 40.

En todo momento la variedad *Agridulce* mostró una mayor actividad clorofilasa que la variedad *Bola*, siendo de nuevo ésta una clara diferencia varietal. Se observa como la actividad enzimática muestra una tendencia a disminuir, sin embargo, sorprendentemente, y en contra de lo que cabría esperar, en el fruto maduro de ambas variedades la enzima clorofilasa está presente, aunque por el contrario su sustrato, clorofila, haya desaparecido, experimentando su actividad un descenso del 29% en la variedad *Agridulce* y del 32% en la variedad *Bola*.

Al comparar los resultados de actividad clorofilasa en los frutos según las dos recolecciones efectuadas, se observa claramente un descenso en la actividad enzimática en ambas variedades en la última recolección, lo que indica de nuevo una situación de estrés nutricional en la planta al final de la fructificación.

Cabe señalar, que mediante la medida *in vitro* de la actividad enzimática estamos estimando indirectamente los niveles de dicha enzima, pero no que proporción de la misma se encuentra actuando *in vivo*. Así en los frutos de la variedad *Bola* se encuentra un contenido de enzima clorofilasa, expresado como actividad medida, siempre inferior a los frutos de la variedad *Agridulce*, pero por el contrario el contenido en clorofilida *a* es mayor en la variedad *Bola*, sugiriendo que la proporción de enzima activa en los frutos de esta variedad puede ser superior. Además, como se ha puesto de manifiesto anteriormente, las propiedades catalíticas de la enzima se inhiben por la presencia de metales, y en condiciones de estrés nutricional puede haber una deficiencia de los mismos incrementando la funcionalidad de la enzima. Esto explicaría como en la variedad *Agridulce* durante la maduración de los frutos de la última fructificación, fisiológicamente más agotada, las clorofilas desaparecen más

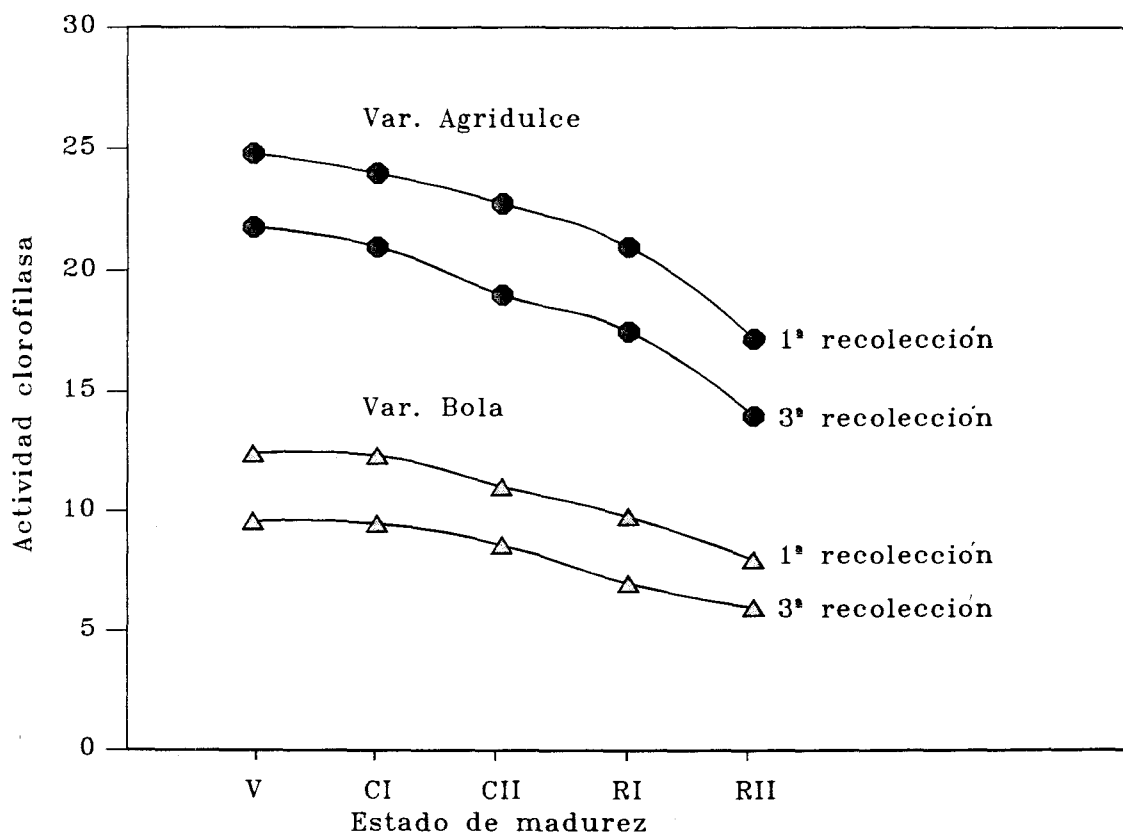


Figura 40: Evolución de la actividad clorofilasa durante la maduración de frutos de pimiento de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

rápidamente, aunque los niveles de actividad clorofilasa medidos sean inferiores a los correspondientes a la primera fructificación.

Por otro lado, la explicación al curioso hecho de encontrar la enzima clorofilasa en frutos maduros pudiera residir en que cuando ocurre la transformación del cloroplasto en cromoplasto por degeneración de los primeros, gran parte de las membranas tilacoidales inicialmente presentes en éstos se utilicen para la formación del nuevo sistema de membranas del cromoplasto al tiempo que pierden las clorofilas. De este modo como la enzima clorofilasa resulta ser intrínseca de las membranas tilacoidales quedaría incluida en las mismas. La ausencia del sustrato, debe actuar controlando la síntesis de la enzima, quizás a nivel de transcripción genética mediante algún mecanismo de control activado durante la maduración.

2.- PIGMENTOS CAROTENOIDES.

- Síntesis de carotenoides.

Paralelamente al estudio realizado sobre la fracción de pigmentos clorofílicos se han controlado individualmente los pigmentos que constituyen la fracción carotenoides. Los resultados obtenidos se muestran las Tablas XV y XVI, donde las concentraciones se expresan como miligramos de pigmento por kilogramo de fruto fresco. Globalmente, se puede destacar que mientras unos pigmentos (luteína y neoxanteno) desaparecen, otros aumentan en concentración (β -caroteno y violaxanteno), y otros son de nueva formación (zeaxanteno, capsanteno, capsorrubeno, β -criptoxanteno, capsoluteína). Al igual que lo observado por Cámara y Monéger (1978) y Simpson et al., (1974), las variedades españolas de pimiento, *Bola* y *Agridulce*, muestran un bajo contenido en criptocapsin.

Para interpretar el incremento total de carotenoides, así como la transformación de los mismos durante el proceso de maduración, se tendrán en cuenta las distintas hipótesis propuestas en la bibliografía, principalmente la Ruta de Porter y Lincoln (1950), así como las revisiones realizadas por Weedon (1971). Como se muestra en la Figura 41, las posibles rutas de carotenogénesis a partir de precursores comunes, conducen a tres familias principales de carotenoides: aquellos que poseen dos anillos de β -ionona, originando la serie β de

Tabla XV: Evolución de la concentración de pigmentos carotenoides (mg/Kg fruto fresco) durante el proceso de maduración de frutos de pimiento de la variedad *Agridulce*.

Pigmento	Verde		Cambiante I		Cambiante II		Rojo I		Rojo II	
	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.
Neoxanteno	8.48	10.10	3.37	1.08	—	—	—	—	—	—
Capsorrubeno	—	—	8.87	5.06	11.14	7.11	12.92	11.50	76.74	51.84
Violaxanteno	9.31	9.76	12.82	14.99	14.72	18.27	20.10	31.08	80.21	71.03
Capsanteno 5,6-epóxido	—	—	5.43	5.69	8.82	6.45	5.71	11.24	51.20	35.26
Capsanteno	—	—	26.49	18.53	49.73	34.18	140.69	59.16	635.78	360.44
Anteraxanteno	0.49	tr	10.12	5.87	10.17	7.03	14.57	8.48	47.48	24.38
<i>cis</i> -Capsanteno	—	—	2.65	2.82	7.64	3.68	19.94	7.23	69.83	30.04
Capsoluteina	—	—	3.46	2.81	8.34	5.47	23.97	8.83	86.11	45.44
Zeaxanteno	—	—	6.51	4.54	29.18	11.94	87.71	15.59	98.54	86.53
<i>cis</i> -Zeaxanteno	—	—	3.79	3.21	5.48	5.32	9.71	5.57	7.41	4.48
Luteina	14.13	9.50	7.53	5.55	0.91	0.37	—	—	—	—
<i>cis</i> -Luteina	1.61	2.57	tr	tr	tr	tr	—	—	—	—
Criptocapsin	—	—	—	—	tr	tr	0.11	0.09	0.46	0.38
β -Criptoxanteno	—	—	7.74	4.33	12.25	9.35	45.73	23.45	78.34	75.77
β -Caroteno	8.03	4.72	11.26	10.70	17.74	14.32	45.47	30.49	98.60	105.90
Carotenoides Totales	41.56	36.65	110.74	85.18	176.12	123.49	426.52	212.62	1329.74	891.47
Pigmentos Amarillos (%)	100.00	100.00	60.77	62.32	56.09	58.36	57.97	58.08	37.35	46.43
Pigmentos Rojos (%)	0.00	0.00	39.23	37.68	43.91	41.64	42.03	41.92	62.65	53.57

tr= trazas

Tabla XVI: Evolución de la concentración de pigmentos carotenoides (mg/Kg fruto fresco) durante el proceso de maduración de frutos de pimiento de la variedad *Bola*.

Pigmento	Verde		Cambiante I		Cambiante II		Rojo I		Rojo II	
	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.
Neoxanteno	7.51	6.25	tr	0.26	—	—	—	—	—	—
Capsorrubeno	—	—	4.56	2.81	11.81	10.90	25.46	14.22	56.74	74.19
Violaxanteno	9.82	8.29	10.34	24.92	12.22	24.13	23.49	37.02	54.98	68.28
Capsanteno 5,6-epóxido	—	—	3.24	2.48	7.36	4.67	17.98	13.13	42.25	41.57
Capsanteno	—	—	18.63	27.90	49.27	41.23	188.22	53.07	508.26	253.85
Anteraxanteno	0.49	tr	1.78	7.82	4.44	4.25	15.42	14.03	35.43	16.38
<i>cis</i> -Capsanteno	—	—	tr	2.31	5.02	3.89	23.63	2.29	61.21	26.17
Capsoluteina	—	—	2.31	3.57	7.68	5.62	29.51	4.00	68.09	33.25
Zeaxanteno	—	—	6.21	7.73	14.65	9.17	37.83	10.81	41.05	32.50
<i>cis</i> -Zeaxanteno	—	—	1.53	1.83	2.72	3.07	3.62	6.00	5.53	3.35
Luteina	9.09	6.79	2.66	2.58	1.10	0.69	—	—	—	—
<i>cis</i> -Luteina	1.49	1.76	tr	tr	—	—	—	—	—	—
Criptocapsin	—	—	—	—	tr	tr	0.16	0.15	0.86	0.73
β -Criptoxanteno	—	—	3.21	5.94	7.69	9.07	27.62	19.00	37.29	26.06
β -Caroteno	6.36	6.03	7.02	11.58	8.29	16.67	35.26	28.14	51.97	70.59
Carotenoides Totales	34.76	29.12	61.49	101.73	132.25	133.36	428.04	201.71	962.50	646.19
Pigmentos Amarillos (%)	100.00	100.00	57.02	65.10	44.45	54.49	40.36	59.00	30.55	38.75
Pigmentos Rojos (%)	0.00	0.00	42.98	34.90	55.55	45.51	59.64	41.00	69.45	61.25

tr = trazas

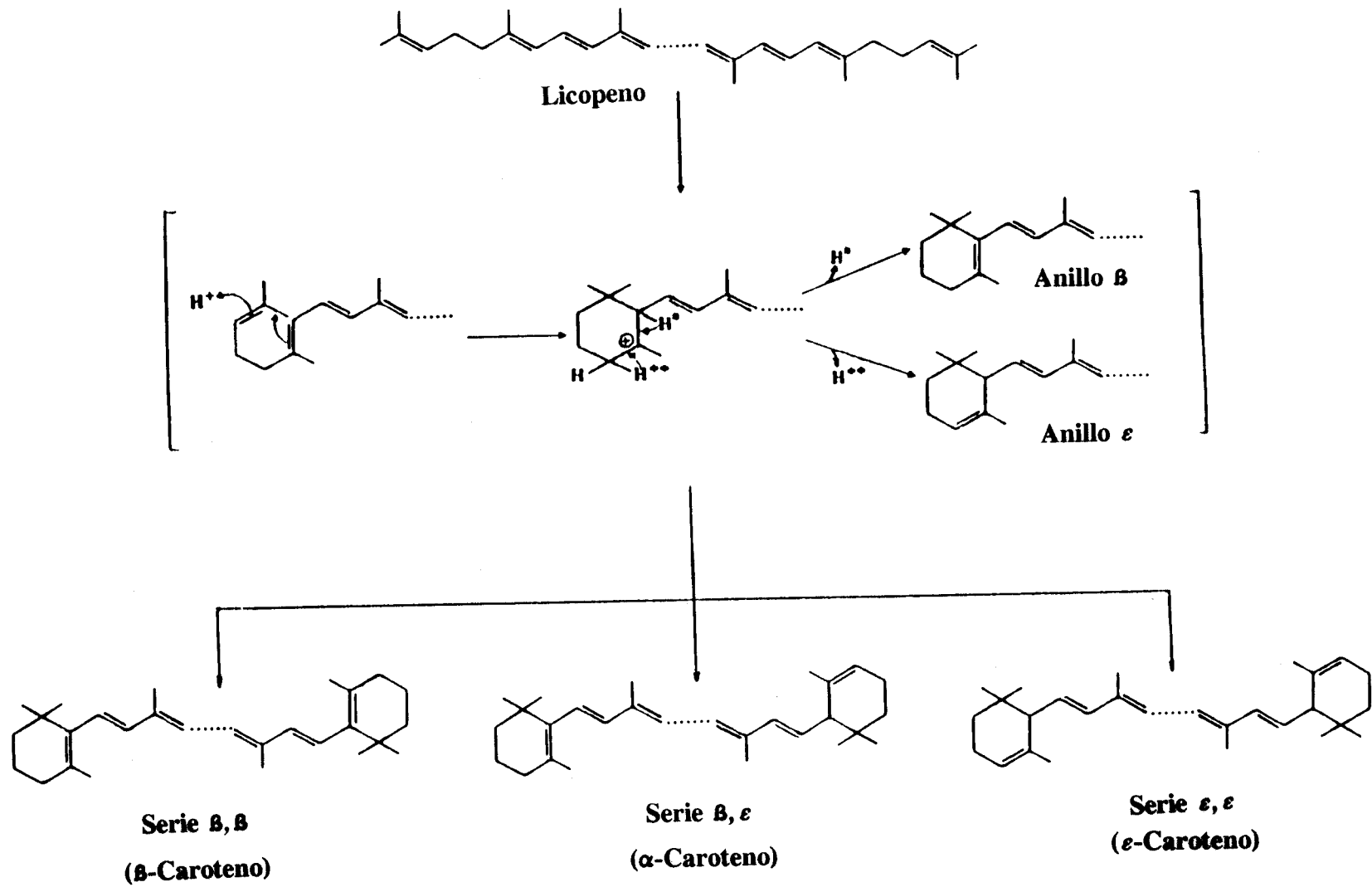


Figura 41: Esquema biosintético de la formación de anillos tipo β - y ϵ -, y de las series β, β y ϵ, ϵ de carotenos.

carotenos; los que poseen un anillo de β -ionona y otro de ϵ -ionona, originando la serie α de carotenos; y por último los carotenoides que al poseer dos anillos de ϵ -ionona, originan la serie ϵ de carotenos. La existencia de los anillos de ionona de un tipo u otro reside en el hecho de que cuando se produce la ciclación en el extremo de un caroteno lineal como licopeno (ψ , ψ -caroteno) por acción de la enzima licopeno ciclasa, se forma un carbocatión, el cual por liberación de un protón de lugar a un doble enlace cuya posición depende de la localización del átomo de hidrógeno que se libera, dando así anillos β o ϵ .

En base a éstas hipótesis, se pasa a interpretar los resultados obtenidos en el estudio de evolución de carotenoides en los frutos de pimiento durante el proceso de maduración en las variedades *Bola* y *Agridulce*. En primer lugar, destaca la presencia de luteína, único carotenoide representante de la serie α en los frutos verdes, y cuya concentración experimenta un descenso progresivo en los pimientos de estado de color cambiante y termina por desaparecer en el fruto maduro. Este hecho también ha sido puesto de manifiesto en las investigaciones realizadas por Cholnoky et al. (1955) en variedades de pimiento húngaras y Davies et al. (1970) en variedades ornamentales. A nuestro entender estas observaciones sugieren que no hay una exclusividad varietal para dicho fenómeno sino que más bien se trata de una característica de todo el género *Capsicum*. Parece ser, que en algún momento del proceso de maduración de las variedades de pimiento rojo, la ruta metabólica en la que está implicada la formación de éste pigmento queda interrumpida.

En este sentido cabe señalar que en estas variedades de pimiento pimentonero español, cuando se inicia la maduración, se observa la síntesis del pigmento llamado capsoluteína, nombre que le fue asignado originalmente por Curl al ser un pigmento con espectro de absorción similar a la luteína y que al aparecer en el pimiento maduro, se le denominó "Luteína del pimiento". No obstante, como se mostró en el apartado de identificación de pigmentos, la estructura de éste (3,6-epoxi-5,6-dihidro- β,β -caroteno-5,3'-diol) difícilmente puede provenir de luteína, debiendo ser su precursor de la serie β,β , muy posiblemente zeaxanteno mediante alguna ruta biosintética, desconocida hasta el momento, que introduzca el inusual grupo 3,6-epóxido. Hay que destacar, que en la variedad *Bola* el contenido en este pigmento llega incluso a ser mayor que zeaxanteno, mientras que en la variedad *Agridulce* toma valores semejantes a este último. Este interesante hecho podría ser utilizado para

propósitos quimiotaxonómicos, así como para conocer el origen varietal de productos procesados.

Posiblemente, la desaparición de luteína durante el proceso de maduración indique que ésta tiene un papel importante en el proceso fotosintético, ahora detenido, lo cual además estaría de acuerdo con la frecuencia con que se encuentra este pigmento en la mayoría de los vegetales verdes. En este sentido cabe mencionar que en los frutos de las variedades de pimiento cuyo color final es amarillo (*Capsicum annuum lycopersiciforme flavum*) el proceso biosintético está modificado (Davies et al. 1970; Cholnoky et al., 1958; Matus et al., 1991), de forma que luteína junto con otros carotenoides de la serie α y β , así como derivados 5,6-epóxidos, están presentes en concentraciones altas cuando el fruto madura. Parece ser que este fenómeno responde a algún tipo de mutación genética, puesto que dicho carácter es heredable, debiendo residir su efecto en la incapacidad de producir la enzima responsable de la formación de pigmentos cetónicos rojos, acumulándose los precursores de estos.

Así mismo, hay que destacar que en las dos variedades estudiadas por nosotros se da una mayor profusión de carotenoides de la serie β que de la serie α . Probablemente, este hecho resida en que justo en el momento de formación de los anillos de ionona, la reacción se decante hacia la formación de anillos de tipo β en mayor proporción que los de tipo ϵ , en cuyo caso podría sugerir que la enzima responsable de la ciclación (licopeno ciclasa) es aparentemente más activa para la formación de anillos β en detrimento de la formación de anillos ϵ (ver Figura 41).

En la serie β existe otro carotenoide, neoxanteno, que también desaparece cuando el fruto madura. En el proceso de biosíntesis, neoxanteno se sintetiza a partir de un 3-hidroxi-5,6-epóxido por reorganización del grupo epóxido para dar un grupo aleno, lo cual ocurre a partir de su precursor natural, violaxanteno (Figura 42). Este proceso parece ser el normal en los frutos verdes, en los cuales la composición carotenoide es la propia de cloroplastos.

En las variedades de pimiento rojo, durante el proceso de maduración, se da la síntesis de pigmentos cetónicos rojos con grupo acilciclopentanol, característicos y hasta el momento exclusivos del género *Capsicum*, los cuales se forman por una reorganización pinacólica del grupo 3-hidroxi-5,6-epóxido, de forma que a partir de zeaxanteno vía anteraxanteno (su derivado 5,6-epóxido) se forma capsanteno; del mismo modo violaxanteno (derivado

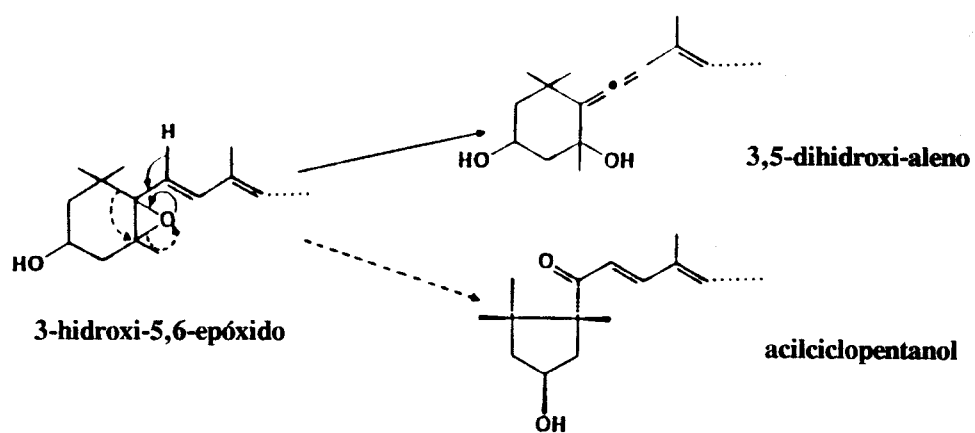


Figura 42: Esquema de la transformación por reorganización de grupos 3-hidroxi-5,6-epóxido en grupos 3,5-dihidroxi aleno (—) y grupos acilciclopentanol (....).

5,6,5',6'-diepóxido de zeaxanteno) da lugar a capsorrubeno vía el intermediario capsanteno 5,6-epóxido, y β -criptoxanteno pasando por un intermediario 5,6-monoepóxido origina criptocapsín. Esta doble vía a partir de un grupo 3-hidroxi-5,6-epóxido para dar un grupo aleno o un grupo acilciclopentanol parece ser que no actuaría simultáneamente, interrumpiéndose la de formación de neoxanteno en el momento de la maduración al ocurrir la degeneración de los cloroplastos y la formación de los cromoplastos. Esto se corrobora con la ausencia de este pigmento en frutos en el estado de madurez de color cambiante avanzado.

En frutos verdes, la enzima activa es la que controla el paso a neoxanteno y durante la maduración la enzima implicada es la que conduce a dar una reorganización a grupo acilciclopentanol, formando capsorrubeno en el caso de partir de violaxanteno, sustrato que antes conducía a neoxanteno por lo cual ya no hay mas síntesis de este pigmento. En variedades amarillas de pimiento cuando los frutos maduran se encuentra gran cantidad de neoxanteno, junto con otros carotenoides de las serie α y β . En este caso la segunda enzima probablemente esté ausente por causas genéticas o inhibida, como ya se apuntó antes, y por ello sigue sintetizándose neoxanteno, además de altas concentraciones de compuestos con grupo 3-hidroxi-5,6-epóxido.

La síntesis pues de carotenoides a lo largo de la maduración está gobernada por dos procesos: el que incluye la transformación de pigmentos amarillos, ya existentes, en pigmentos rojos según la vía descrita, y el que controla la síntesis neta de carotenoides. El incremento de concentración de estos compuestos debe responder a una síntesis *de novo*, lo cual conlleva nueva síntesis de carotenoides precursores: fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- ψ , ψ -caroteno), fitoflueno (7,8,11,12,7',8'-hexahidro- ψ , ψ -caroteno) y ζ -carotene (7,8,7',8'-tetrahydro- ψ , ψ -caroteno), así como la de intermediarios (violaxanteno, zeaxanteno, criptoxanteno, anteraxanteno, etc). Por esta razón se explica que aumente la síntesis de todos estos pigmentos durante la maduración.

Con objeto de comprobar cualitativamente este último punto, la síntesis *de novo*, se estudió la mayor o menor presencia de los precursores iniciales en la biosíntesis de los carotenoides. Para ello se controló la presencia de fitoflueno en los frutos de la variedad *Bola* correspondientes a los 5 estados de madurez ya mencionados, mediante su control por TLC (en placas de Silicagel GF₂₅₄ y desarrollando con éter de petróleo ligero 40-60°C) detectado por la intensidad de la fluorescencia amarilla-verde que presenta bajo luz ultravioleta su

mayor o menor presencia. En el fruto verde los pigmentos precursores no se detectan, posiblemente debido a que la tasa de síntesis es baja, de mantenimiento, y conforme se forman los precursores, estos son transformados. Sin embargo, en los frutos que empiezan a madurar ya se aprecia su presencia, la cual aumenta conforme avanza el estado de madurez de los frutos, siendo máxima en el estado de rojo en el cual se produce la mayor tasa de síntesis.

- Influencia de la variedad y momento de la recolección en el contenido carotenoide.

Dado que la planta del pimiento no es de fructificación simultánea, la recolección de los frutos se efectúa en distintas etapas, generalmente tres, ocurriendo un empeoramiento en la calidad y características del fruto que se desarrolla con posterioridad a cada uno de los procesos de recolección. En consecuencia, la evolución de pigmentos ha sido controlada en frutos correspondientes a dos momentos distintos del período de recolección, primero y último, para ambas variedades, *Bola* y *Agridulce*. Para la 1ª recolección, la variación del contenido global de carotenoides con la maduración es bastante semejante, en los estados de verde y cambiante (I y II), siendo en el estado Rojo I cuando ambas variedades experimentan un aumento brusco en el contenido carotenoide. La misma tónica ocurre al comparar la evolución de pigmentos correspondientes a la 3ª recolección (o última) para ambas variedades. Sin embargo, al comparar ambas recolecciones para una misma variedad, aunque en los estados iniciales (verde y cambiante) los valores en el contenido de pigmentos son parecidos, en los estados de rojo, los frutos correspondientes a la 1ª recolección alcanzan siempre niveles de concentración superiores a la última. Este comportamiento es similar para ambas variedades.

Este hecho, seguramente se debe a que la planta tras un mes de continua fructificación se encuentra en un estado de estrés nutricional, lo cual hace que precisamente las etapas que corresponden a la mayor tasa de síntesis de carotenoides, (Rojo I y II), sean las que más se vean influenciadas por el estado fisiológico de la planta. Esta observación está en total concordancia con lo señalado por Lease y Lease (1956), quienes hacen notar la fuerte implicación que en el contenido pigmentario de los frutos tiene el número de recolecciones que experimente la planta durante una misma cosecha, lo cual hace que el contenido pigmentario disminuya progresivamente.

El hecho, de que mientras los frutos están verdes o color cambiante la planta se comporte de forma similar tanto en una recolección como en otra, puede deberse a que en ese momento están activos todos los sistemas enzimáticos necesarios y en consecuencia la síntesis de pigmentos no demande un gran esfuerzo por la planta. Todo ello hace que el patrón en % de cada pigmento se modifique algo en el estado de total madurez entre una recolección y otra. En este sentido, se observa, como los pigmentos que son productos finales (pigmentos rojos) de la ruta biosintética representan un porcentaje menor en la última recolección frente a otros pigmentos como β -caroteno y violaxanteno, que al actuar como intermediarios en la síntesis de los anteriores, se encuentran en porcentajes algo superiores. Parece ser, que éstos se acumulan al no ser usados con la misma tasa de síntesis que en la 1ª recolección dado el estado fisiológico de la planta.

Como se puede observar en la Tabla XVII, en la variedad *Bola* capsanteno representa 13.52 % mas en la 1ª que en la última recolección, y en *Agridulce* es el 7.38 %. En la variedad *Bola* β -caroteno representa el 5.52 % mas en la última que en la 1ª recolección, y en *Agridulce* es el 4.48%. En la variedad *Bola* violaxanteno representa el 5.71 % en la 1ª rec. frente al 6.43 % en la última, y en *Agridulce* 6.03 % frente a 7.97 %. Si comparamos entre fracciones amarillas (Am) y rojas (R) en estado de madurez total, en *Bola* el % de Rojos es 69.45 % ($R/Am = 2.27$) en la 1ª rec. frente al 61.25 % ($R/Am = 1.58$) en la última recolección y en la var. *Agridulce* % de Rojos es 62.65 % ($R/Am = 1.67$) en la 1ª rec. frente a 53.57 % ($R/Am = 1.15$) en la última recolección.

- Valor de Provitamina A.

El valor de Provitamina A varía con el transcurso de la maduración en paralelo con los pigmentos que presentan la capacidad de dar lugar a ésta vitamina, como puede fácilmente deducirse de la Figura 43. En la variedad *Agridulce* el valor de Provitamina A es siempre mayor, alcanzando los niveles superiores en el estado de total madurez. Además de esta diferencia entre variedades, se observa un aspecto interesante al comparar, dentro de cada variedad, la dos recolecciones efectuadas con una diferencia de tiempo de un mes, de forma que en la última (3ª) recolección es cuando se encuentra el mayor contenido en provitamina A, a pesar de que en ambas variedades el contenido total de carotenoides en el estado de total madurez en la última recolección es inferior al encontrado en la 1ª. Esta diferencia es aún

Tabla XVII: Composición porcentual de pigmentos en frutos maduros de las variedades *Bola* y *Agridulce* en función del momento de la recolección.

Pigmento	Var. <i>Agridulce</i>		Var. <i>Bola</i>	
	1ª rec.	3ª rec.	1ª rec.	3ª rec.
Neoxanteno	0.00	0.00	0.00	0.00
Capsorrubeno	5.73	5.82	5.90	11.48
Violaxanteno	6.03	7.97	5.70	10.57
Capsanteno 5,6-epóxido	3.85	3.95	4.39	6.43
Capsanteno	47.81	40.43	52.81	39.29
Anteraxanteno	3.57	2.73	3.68	2.53
<i>cis</i> -Capsanteno	5.25	3.37	6.36	4.05
Capsoluteina	6.48	5.10	7.07	5.14
Zeaxanteno	7.41	9.71	4.26	5.03
<i>cis</i> -Zeaxanteno	0.56	0.54	0.57	0.52
Luteina	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>cis</i> -Luteina	0.00	0.00	0.00	0.00
β -Criptoxanteno	5.89	8.50	3.86	4.04
β -Caroteno	7.42	11.88	5.40	10.92
Pigmentos Amarillos	37.35	46.43	57.02	65.10
Pigmentos Rojos	62.65	53.57	42.98	34.90

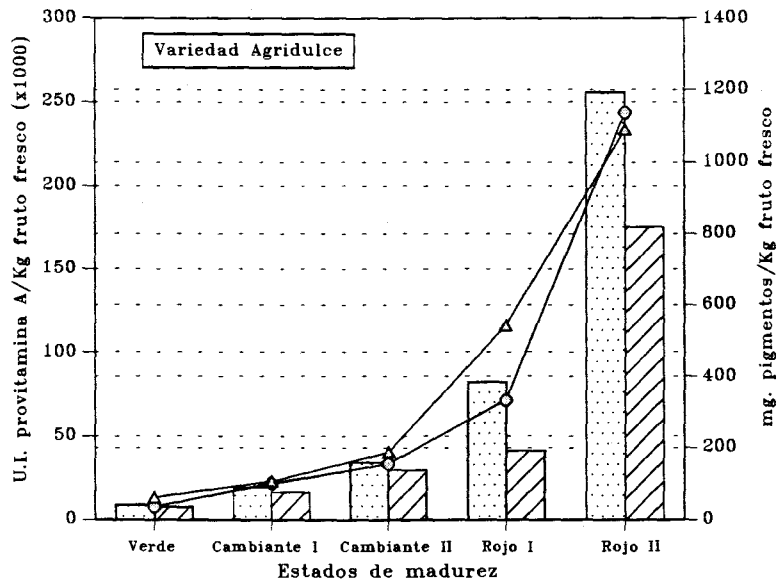
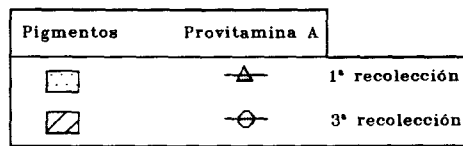
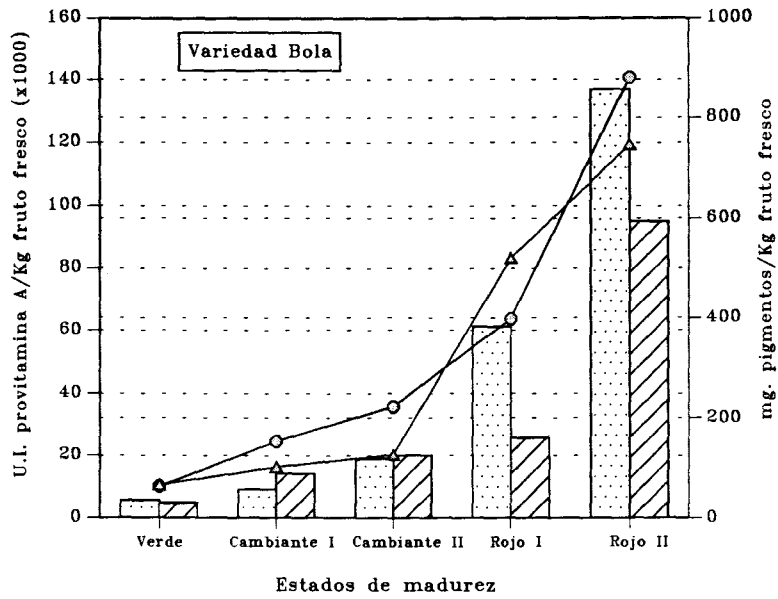


Figura 43: Cambios en el valor de provitamina A durante la maduración de frutos de pimientos de la variedades *Bola* y *Agridulce* en función de número de recolecciones.

mas notable en la variedad *Bola*, y en general este hecho puede ser atribuible a que los carotenoides con actividad en provitamina A (β -caroteno y β -criptoxanteno) se acumulan como ya se discutió anteriormente.

Dado que estas variedades de pimiento se destinan a la elaboración de pimentón, el valor potencial de provitamina A alcanza su máximo con el menor contenido en xantofilas cetónicas, pigmentos rojos responsables de la cotización del pimentón en el mercado. No obstante desde el punto de vista nutricional sería deseable que en la valoración del pimentón se tuviera presente la aportación de provitamina A. En este sentido sería oportuno potenciar la selección de variedades que al alcanzar el estado de total madurez mantengan un equilibrio entre el contenido en xantofilas rojas propio de un fruto de principio de campaña y el valor de provitamina A propio de un fruto de final de campaña.

De todas formas lo aconsejable sería realizar una selección de los frutos en función de su contenido carotenoide y valor de provitamina A para fines distintos. De esta manera un pimentón poco coloreado, como el obtenido de frutos de final de campaña, podría revalorizarse en función de su mayor contenido en provitamina A, y destinarse para proporcionar coloraciones naranjas y amarillas a otros productos.

Expertos de la FAO/WHO reunidos en 1988 recomiendan que el aporte óptimo de β -caroteno que una persona adulta debe incluir en su dieta diaria debe ser en torno a 3600 microgramos. Teniendo en cuenta esto, teóricamente este aporte se conseguiría consumiendo en torno a 35 gramos de pimiento maduro de la variedad *Agridulce* y aproximadamente el doble en la variedad *Bola*, lo cual hace que tanto el pimiento rojo, como los productos derivados del mismo sean considerados fuente importante de provitamina A.

V. ESTERIFICACION DE XANTOFILAS DURANTE LA MADURACION EN EL PIMIENTO ROJO.

Desde hace tiempo se sabe que al igual que en otros muchos frutos, en el pimiento maduro las xantofilas están esterificadas con ácidos grasos (Curl, 1962; Baranyai et al., 1982). Dado que la mayoría de los carotenoides presentes en el pimiento maduro poseen en su estructura uno o dos grupos hidroxilos susceptibles de ser esterificados, ello hace que un mismo pigmento pueda estar presente en distinto grado de esterificación, esto es, total, parcial o no esterificado. Si a este hecho se le añade la posibilidad adicional de esterificación con diversos ácidos grasos formando homo- y heteroésteres, no es difícil entender que su estudio cromatográfico sea un tanto complicado. Ciertamente los cromatogramas que se obtienen a partir de extractos de pigmentos no saponificados son bastante complejos, sobretodo en HPLC que por tener mejor poder de resolución que la TLC origina cromatogramas con mayor número de picos, cada uno de ellos correspondiente a una forma de esterificación concreta (Gregory et al. 1987; Khachik y Beecher, 1988; Philip y Chen, 1988).

1.- Grado de esterificación

A fin de determinar el grado de esterificación de cada uno de los pigmentos mayoritarios del pimiento rojo, se hace uso del desarrollo cromatográfico sobre silicagel 60G de un extracto directo de pigmentos utilizando la mezcla hexano/acetato de etilo/acetona/etanol (95:3:2:2) previamente descrito por Mínguez Mosquera et al. (1984), y para el cual ya se conoce la identidad de cada una de las bandas separadas, correspondientes a los pigmentos principales: β -caroteno (banda 1, $R_f=0.91$), β -criptoxanteno (banda 2, $R_f=0.85$), zeaxanteno (banda 3, $R_f=0.69$), capsanteno (banda 4, $R_f=0.37$) y capsorrubeno (banda 5, $R_f=0.21$). El resto de pigmentos quedan retenidos en una región de bajo R_f (igual o menor a 0.18) a la cual se le suele denominar "Base" del cromatograma.

Tras la cromatografía en TLC, cada xantofila separada (capsanteno, capsorrubeno, β -criptoxanteno y zeaxanteno) es individualmente raspada y eluida con acetona. La disolución de cada pigmento se divide en tres alícuotas: una de ellas, es sometida directamente a la prueba de acetilación a fin de determinar el grado de esterificación de cada pigmento. En los cuatro casos no se origina ningún cambio en sus propiedades cromatográficas cuando se

volvió a cromatografiar en las condiciones anteriormente utilizadas, por lo que se concluyó que todos correspondían a formas totalmente esterificadas, sin grupos hidroxilos libres en su molécula.

Una segunda alícuota es sometida a saponificación con KOH-MeOH 10% durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo los pigmentos se extraen con éter etílico y son vueltos a cromatografiar utilizando las mismas condiciones, tras lo cual todos ellos muestran un aumento en su polaridad al quedar todos ellos retenidos en la zona denominada "Base" del cromatograma. Este hecho vuelve de nuevo a demostrar la esterificación inicial de los pigmentos de partida, e indica que como consecuencia de la saponificación se obtienen las formas no esterificadas de cada pigmento. Tras realizar la prueba de acetilación a cada pigmento, los derivados acetilados se cromatografan en silicagel 60 G utilizando la mezcla acetato de etilo/benceno como eluyente. El desarrollo cromatográfico da como resultado dos bandas para los carotenoides monohidroxilo como β -criptoxanteno, tres para los carotenoides dihidroxilos simétricos como zeaxanteno y capsorrubeno, y cuatro bandas para los carotenoides dihidroxilo no simétricos como capsanteno.

La tercera alícuota es sometida a una saponificación parcial, lo cual se consigue reduciendo el tiempo de saponificación a treinta segundos. Cuando los pigmentos resultantes se cromatografían de nuevo en TLC utilizando la mezcla hexano/acetato de etilo/acetona/etanol (95:3:2:2) se obtienen varias bandas, la correspondiente al pigmento original es decir la forma totalmente esterificada, la correspondiente al pigmento libre o forma no esterificada retenida en la zona de Rf denominada "Base", y una banda de movilidad intermedia. Esta tercera banda se raspa y eluye con acetona y tras someterla a la prueba de acetilación se concluye que corresponde a formas parcialmente esterificadas, mas concretamente monoesterificadas. Hay que resaltar que obviamente β -criptoxanteno no presenta esta banda de movilidad intermedia puesto que al poseer un solo grupo hidroxilo en su molécula solo puede presentar formas de total esterificación y de no esterificación o libre. No obstante, en todos los casos tanto la forma no esterificada como la parcialmente esterificada quedan retenidas en la zona denominada "Base", es decir con Rf inferior a 0.18.

Estos resultados sugieren que la Base del cromatograma de TLC está constituida por una mezcla de formas parcial- y totalmente esterificadas de los mismos pigmentos. A fin de comprobar este punto se realiza la siguiente experiencia mediante el empleo de HPLC:

utilizando concentraciones equivalentes, se inyectan muestras correspondientes al extracto directo de pigmentos (Fig. 44A), a la solución que contiene los pigmentos que quedan retenidos en la "Base" del cromatograma tras el desarrollo del extracto directo en TLC (Fig. 44B), y las respectivas soluciones obtenidas tras la saponificación de la anteriores (Fig. 44C,D). Así mismo, se cromatografían por HPLC cada una de las principales bandas obtenidas en el desarrollo en TLC, tanto saponificadas como no, a fin de identificar cada componente en el desarrollo directo de HPLC. En la Tabla XVIII se muestra la correspondencia entre las bandas obtenidas en el desarrollo de TLC y los picos principales del cromatograma de HPLC.

Los resultados encontrados se pueden resumir en tres puntos principales: (1) En HPLC, las formas totalmente esterificadas: capsanteno diéster, capsorrubeno diéster, zeaxanteno diéster y β -criptoxanteno monoéster eluyen a tiempos de retención mayores que β -caroteno. (2) La formas parcialmente esterificadas: capsanteno monoéster, capsorrubeno monoéster y zeaxanteno monoéster eluyen en un estrecho intervalo de tiempos de retención comprendido entre la forma no esterificada de β -criptoxanteno (12.63 min) y β -caroteno (15.08 min). A menores tiempos de retención, 2.04-12.63 min, aparecen las formas libres, no esterificadas de los pigmentos. (3) La base del desarrollo cromatográfico en TLC comprende principalmente las formas monoesterificadas de capsanteno, capsorrubeno y zeaxanteno, así como pequeñas cantidades de las formas libres. Contiene así mismo una alta proporción de la forma no esterificada de β -criptoxanteno, siendo este por lo tanto el único de los pigmentos mayoritarios que no modifica su tiempo de retención tras la saponificación (ver pico 10 en los cromatogramas B y D de la Figura 44). Estos puntos están en total concordancia con los encontrados previamente por Fisher y Kocis (1987).

2.- Ácidos grasos responsables de la esterificación de las xantofilas.

La naturaleza de los principales ácidos grasos que esterifican a las xantofilas mayoritarias presentes en el pimiento maduro ha sido investigada mediante cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. En la Tabla XIX se muestran los resultados obtenidos para ambas variedades, *Bola* y *Agridulce*, expresados como composición porcentual. Se observa que no existe una diferencia clara entre variedades puesto que el patrón de esterificación de cada xantofila es prácticamente idéntico en las dos variedades. En

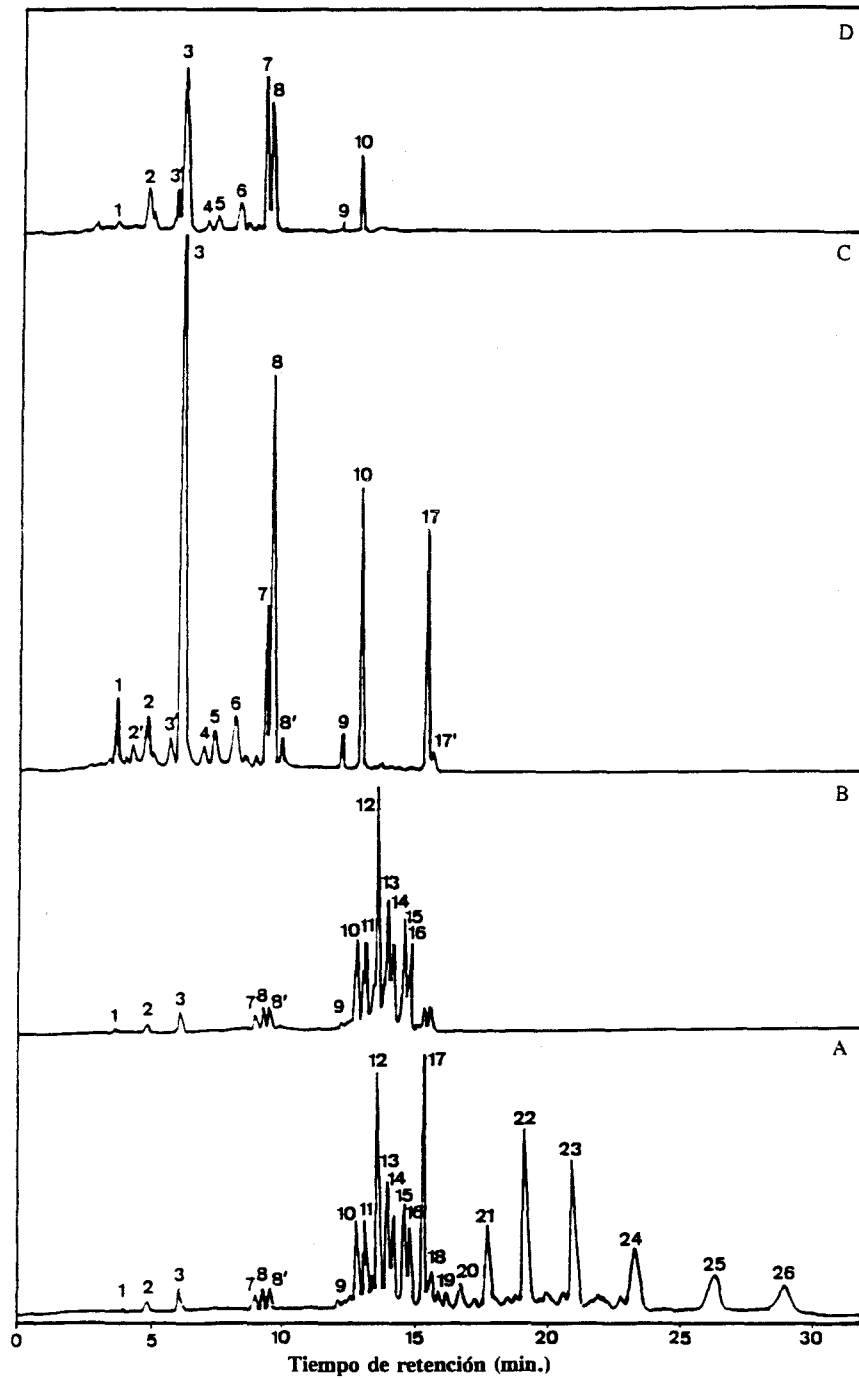


Figura 44: Cromatogramas de HPLC correspondientes a: A) extracto directo, B) extracto de pigmentos que conforman la "Base" del desarrollo cromatográfico en TLC de un extracto directo de pigmentos utilizando la mezcla hexano/acetato de etilo/etanol/acetona (95:3:2:2), C) Extracto directo saponificado, D) "Base" cromatografiada. Identidad de picos: 1: Capsorrubeno, 2: Violaxanteno, 2': Isómero de violaxanteno, 3: Capsanteno, 3': Capsanteno 5,6-epóxide, 4: Anteraxanteno, 5: *cis*-Capsanteno, 6: Mutatoxanteno, 7: Capsoluteína, 8: Zeaxanteno, 8': *cis*-Zeaxanteno, 9: Criptocapsin, 10: β -Criptoxanteno, 11: Capsanteno monoéster (coeluye Capsorrubeno monoéster), 12: Capsanteno monoéster (coeluye Capsorrubeno monoéster y Zeaxanteno monoéster), 13: Capsanteno monoéster, 14: Zeaxanteno monoéster, 15: Capsanteno monoéster, 16: Zeaxanteno monoéster, 17: β -Caroteno, 17': *cis*- β -Caroteno (coeluye β -Criptoxanteno monoéster), 18: β -Criptoxanteno monoéster, 19: Capsorrubeno diéster (coeluye β -Criptoxanteno monoéster), 20: Capsorrubeno diéster, 21: Capsanteno diéster (coeluye Capsorrubeno diéster), 22: Capsanteno diéster (coeluye Capsorrubeno diéster), 23: Capsanteno diéster, 24: Capsanteno diéster (coeluye Zeaxanteno diéster), 25: Zeaxanteno diéster, 26: Zeaxanteno diéster.

Tabla XVIII: Grado de esterificación y correspondencia entre las bandas obtenidas en TLC utilizando la mezcla hexano/acetato de etilo/acetona/etanol (95:3:2:2) como eluyente, y los picos obtenidos en HPLC para un extracto directo de pigmentos carotenoides de pimiento rojo maduro.

Pigmento	Grado de esterificación	Localización de pigmentos en	
		TLC (banda)	HPLC (picos)
β -Caroteno	–	1	17,17'
β -Criptoxanteno	Monoesterificado	2	18
	No esterificado	Base	10
Zeaxanteno	Diesterificado	3	25,26
	Monoesterificado	Base	14,16
	No esterificado	Base	8,8'
Capsanteno	Diesterificado	4	21,22,23,24
	Monoesterificado	Base	11,12,13,15
	No esterificado	Base	3
Capsorrubeno	Diesterificado	5	19,20
	Monoesterificado	Base	11,12
	No esterificado	Base	1

Tabla XIX: Naturaleza y composición de ácidos grasos que esterifican a las principales xantofilas rojas y amarillas de frutos de pimientos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Acido graso	Xantofila							
	Variedad Bola				Variedad Agridulce			
	Capsanteno	Capsorrubeno	Zeaxanteno	β -Criptoxanteno	Capsanteno	Capsorrubeno	Zeaxanteno	β -Criptoxanteno
Laurico	26.5	26.0	8.6	9.7	24.3	25.8	10.4	10.1
Mirístico	48.3	47.6	19.1	18.2	50.1	48.6	18.7	15.3
Palmítico	17.6	18.0	21.7	23.6	17.5	17.7	20.6	21.9
Palmitoleico	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Estearico	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Oleico	tr	tr	1.8	2.4	tr	tr	1.5	2.0
Linoleico	7.5	8.6	50.6	48.4	8.1	7.9	48.8	50.7
Linolénico	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr

ambos casos se encuentra que los ácidos grasos que esterifican a las xantofilas son mayoritariamente láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0) y linoléico (18:2^{A9,12}), hecho puesto de manifiesto en otras variedades (Philip et al., 1971; Camara y Monéger, 1978; Tsatsaronis y Kehayoglou, 1971), por lo que parece ser una característica propia del género *Capsicum*. Junto con estos ácidos grasos, se han encontrado otros en menor proporción, como palmitoléico (16:1^{A9}), oléico (18:1^{A9}), esteárico (18:0) y linolénico (18:3^{A9,12,15}), aunque no sobrepasan en ningún caso el 2% del contenido total de ácidos grasos y por lo que se consideran trazas.

Según se puede observar los pigmentos rojos, capsanteno y capsorrubeno, están esterificados con ácidos grasos de cadena corta y saturados (láurico, mirístico y palmítico, principalmente), mientras que en las xantofilas amarillas el ácido graso mayoritario, linoleico (aproximadamente un 50%) presenta en su estructura una doble insaturación. Esto apoya lo observado por otros autores (Daood y Biacs, 1986; Gross, 1991) en cuanto a la estabilidad de los pigmentos, siendo fácil comprender que los rojos tengan una mayor estabilidad frente a las xantofilas amarillas, ya que al contener en mayor proporción ácidos grasos saturados serán atacados preferentemente por agentes oxidantes. A la vez, la mayor estabilidad de los pigmentos esterificados parece estar relacionada con el mayor carácter lipófilo que adoptan y por tanto una mejor integración en las estructuras de membrana quedando más protegidos frente a los ataques del medio.

3.- Cambios en la esterificación durante la maduración de los frutos.

Como se acaba de comentar, en el fruto rojo maduro los carotenoides se encuentran esterificados con ácidos grasos en mayor o menor grado, originando formas no esterificadas, parcialmente esterificadas y totalmente esterificadas. Experimentos realizados con distintas formas esterificadas y no esterificadas de capsanteno han demostrado que las formas esterificadas son más estables que las no esterificadas (Biacs et al., 1989). La mayor estabilidad se asocia a los pigmentos totalmente esterificados, ya que al ser las formas más abundantes, la naturaleza no las esterificaría sin razón. Al mismo tiempo se ha observado que aquellos pigmentos esterificados con ácidos grasos saturados son a su vez más estables, al poder ser atacados más difícilmente en procesos foto- y termo-oxidativos, así como en los que pueda estar implicada la enzima lipoxigenasa.

Los cambios que se producen en las fracciones libres, parcial- y totalmente esterificadas de pigmentos carotenoides durante el proceso de maduración se observan claramente en la Figura 45. Los cromatogramas corresponden a los cinco estados de madurez sucesivos que se han estudiado para la variedad *Bola* y están obtenidos en condiciones directamente comparables. En el caso de la variedad *Agridulce* se obtienen resultados similares. En la Tabla XX, se muestran los resultados obtenidos, cuyo cálculo se ha hecho en base a el area de cada pico, expresando cada fracción como % del total de carotenoides.

Se puede deducir que, ya desde los primeros estadios de la maduración aproximadamente la mitad de los pigmentos carotenoides presentes están esterificados en su máximo grado y que conforme avanza la maduración esta tendencia se mantiene, creciendo la proporción de monoesterificados y decreciendo los carotenoides libres. A todo esto hay que añadir que al mismo tiempo se da una síntesis neta de pigmentos, los cuales van siendo esterificados. La relación porcentual en el fruto maduro entre pigmentos carotenoides libres y esterificados parcial y totalmente resulta ser 21.3%, 35.6% y 43.1% en la variedad *Bola*, y 26.30%, 32.10% y 41.60% en la variedad *Agridulce*. Ambos patrones de esterificación son muy semejantes, pudiendo ser utilizado en estudios posteriores como índice de madurez fisiológica del fruto, e incluso como parámetro de referencia para la mejora genética.

Adicionalmente se ha comprobado que violaxanteno y neoxanteno no se esterifican durante el proceso de maduración, aunque el último, como ya se ha explicado anteriormente, desaparece junto con luteína conforme avanza la maduración. Este hecho, el cual concuerda con lo observado por otros autores, apoya la teoría de que la esterificación de la xantofilas ocurre solamente a nivel de carotenoides de nueva formación en cromoplastos y no a nivel de cloroplastos (Cámara y Monéger, 1978). Esto sugiere que como los cromoplastos se forman a expensas de los cloroplastos, los carotenoides pasan al interior de los plastoglóbulos, en cuyo interior se lleva a cabo la esterificación de los mismos con los ácidos grasos allí presentes. En los frutos maduros del pimiento se han observado distintos tipos de cromoplastos, principalmente globulares, membranosos y fibrilares, siendo más abundantes los del primer tipo, los cuales pueden ser tanto esféricos como elipsoidales, conteniendo en su interior gran número de plastoglóbulos (Gross, 1991).

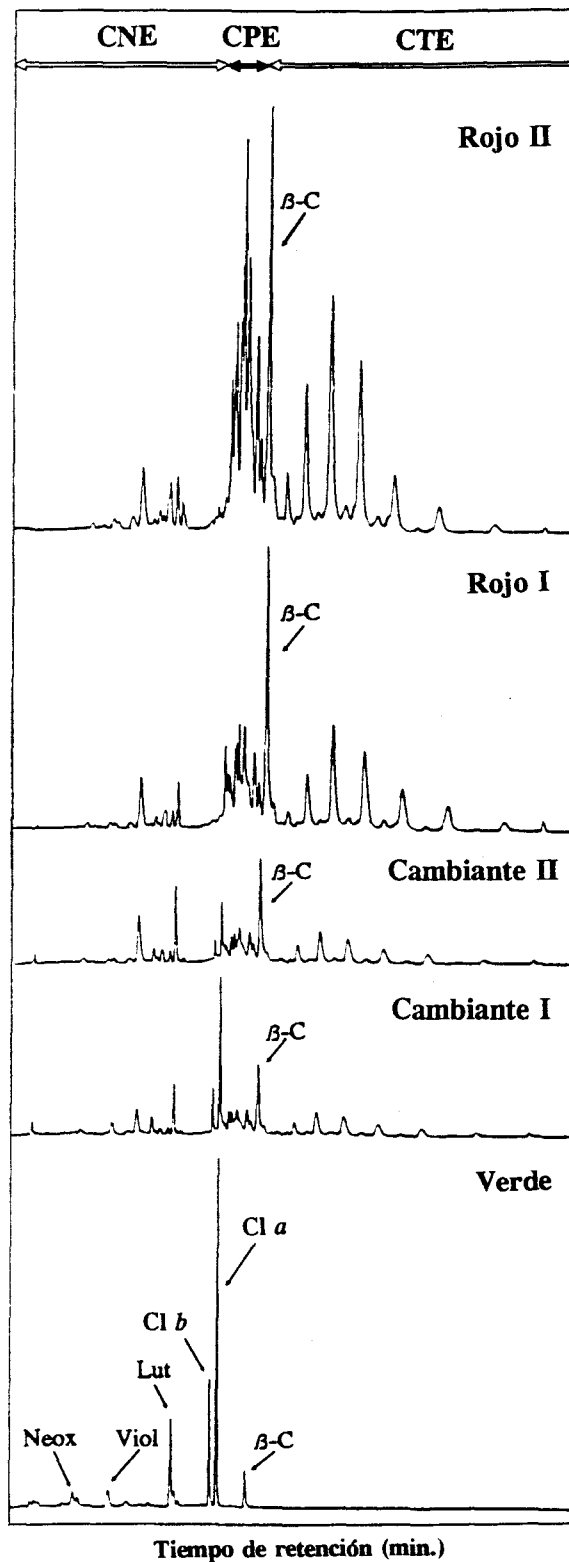


Figura 45: Cambios en la composición de pigmentos y xantofilas esterificadas durante la maduración del pimiento. CNE: Fracción de carotenoides no esterificados, CPE: Fracción de carotenoides parcialmente esterificados, CTE: Fracción de carotenoides totalmente esterificados. Identidad de picos como en la Figura 44, en el estado de madurez verde, Cl *a*: Clorofila *a*, Cl *b*: Clorofila *b*, Lut: Luteína, Viol: Violaxanteno, Neox: Neoxanteno, β -C: β -Caroteno.

Tabla XX: Evolución del grado de esterificación de pigmentos carotenoides durante la maduración de frutos de pimiento de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Variedad <i>Bola</i>					
Estado de maduración					
Fracción carotenoide	Verde	Cambiante I	Cambiante II	Rojo I	Rojo II
No esterificada	100.0	49.6	46.2	32.6	21.3
Parcial. esterificada	0.0	9.8	16.6	24.6	35.6
Total. esterificada	0.0	40.6	37.2	42.8	43.1

Variedad <i>Agridulce</i>					
Estado de maduración					
Fracción carotenoide	Verde	Cambiante I	Cambiante II	Rojo I	Rojo II
No esterificada	100.0	52.2	49.1	37.8	26.3
Parcial. esterificada	0.0	9.4	17.3	22.8	32.1
Total. esterificada	0.0	38.4	33.6	39.4	41.6

VI. EFECTO DEL PROCESADO DEL PIMENTON SOBRE LOS CAROTENOIDES DEL PIMIENTO.

En su ambiente natural, los carotenoides son bastante estables, pero cuando los alimentos son triturados, calentados o cuando estos pigmentos son extraídos con aceite o disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. Además, el calor en general aumenta la velocidad de todas las reacciones, siendo más rápidos los procesos degradativos de tipo termo-oxidativos principalmente.

El grado de destrucción del color depende, entre otros factores, de la presencia de agentes oxidantes en el medio (fundamentalmente oxígeno molecular) y de que se comunique energía suficiente para que la reacción de degradación tenga lugar. El aporte energético se realiza en forma de luz o calor. La causa principal del deterioro en los carotenoides es la oxidación, que es más acusada cuando se pierde la integridad celular. El alto grado de insaturación de estos compuestos los hace fácilmente oxidables, siendo especialmente sensibles a la luz, calor, y oxígeno (De la Mar y Francis, 1969; Kanner y Mendel, 1976; Carnevale et al., 1980; Malchev et al., 1982). Durante el almacenaje y procesado de alimentos, el tipo de pretratamiento y la temperatura empleada son variables significativas para controlar la estabilidad del color en los productos acabados (Hazarika y Mahanta, 1983).

En este sentido, el conjunto de todas las operaciones industriales que intervienen en la obtención del pimentón pueden provocar la destrucción de parte de los componentes inicialmente presentes en el fruto y afectar concretamente a la fracción que incluye los pigmentos carotenoides, responsables exclusivos de la calidad final del pimentón.

1.- Pigmentos controlados en el fruto fresco maduro, seco y pimentón.

En el presente apartado nos centraremos únicamente en el estudio de aquellos pigmentos que son los normalmente mayoritarios en el fruto maduro y que por lo tanto son los responsables del color en mayor medida. Mediante un estudio previo a nivel cualitativo se ha comprobado que la composición carotenoide en el fruto rojo maduro, en el pimiento seco y pimentón es básicamente la misma, no detectándose la formación de nuevos compuestos como consecuencia del procesado. Por ello, utilizando las condiciones de análisis por HPLC

expuestas anteriormente se controlan los siguientes pigmentos carotenoides en el extracto saponificado: β -caroteno, zeaxanteno, β -criptoxanteno, capsanteno, capsanteno 5,6-epóxido, capsorrubeno, capsoluteina, anteraxanteno y violaxanteno.

2.- Cambios en la composición carotenoide inicial de los frutos durante la transformación industrial de pimiento en pimentón.

Aunque la influencia del procesado del pimentón sobre el contenido carotenoide en frutos de las variedades *Bola* y *Agridulce* ha sido recientemente estudiado por Mínguez et al. (1993c), en dicho estudio la investigación se centró únicamente en el control de la fracción de xantofilas esterificadas y carotenos, que conjuntamente engloban aproximadamente el 65% del contenido carotenoide total de los frutos maduros del pimiento, no teniendo en cuenta la fracción de pigmentos en su forma libre o parcialmente esterificada. Como resultado de dicho estudio se encontró una clara diferencia del efecto del procesado sobre el contenido carotenoide de ambas variedades. Así mientras en la variedad *Agridulce* se produce un descenso en el contenido carotenoide, en la variedad *Bola* se observó sorprendentemente un efecto contrario. La explicación dada por los autores a este fenómeno postulaba dos posibles hipótesis: por un lado la existencia de esterificación de xantofilas libres, no controladas en dicho estudio, durante la etapa de secado provocando un aparente incremento de concentración, o por otro lado una síntesis *de novo*. Como quiera que dicho fenómeno no deja de ser muy interesante, y a fin de descartar hipótesis, en el presente estudio se intenta encontrar la explicación al mismo, para lo cual se hace totalmente necesario el seguimiento cuantitativo e individualizado de los pigmentos carotenoides presentes en el fruto fresco, seco y pimentón.

En la Tabla XXI se muestra la concentración carotenoide encontrada en el fruto fresco, seco y pimentón carotenoide agrupada según aportación roja y amarilla, y el contenido total. Adicionalmente se incluye la humedad del producto durante la diferentes etapas del procesado de pimentón, lo cual permite hacer comparaciones directas entre etapas al poder expresar todos los resultados en base al peso seco de producto. Así mismo, las pérdidas porcentuales que cada fracción carotenoide experimenta durante cada etapa del procesado, y en el proceso global se recogen en la Tabla XXII.

Tabla XXI: Evolución de la concentración (mg/Kg) de pigmentos rojos, amarillos y totales durante el procesado para pimentón de frutos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Pigmentos	Concentración					
	Fruto fresco		Fruto seco		Pimentón	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
	Variedad Bola					
Rojos	2627.93 ± 222.01	56.58	3748.19 ± 225.75	74.70	2109.71 ± 125.08	77.93
Amarillos	2051.22 ± 184.09	43.42	1262.47 ± 125.67	25.30	597.48 ± 60.27	22.07
Totales	4724.15 ± 406.10		5017.66 ± 351.42		2707.19 ± 185.35	
Humedad (%)		86		9		3
	Variedad Agridulce					
Rojos	4565.38 ± 220.80	63.74	4266.59 ± 254.32	63.80	2130.21 ± 90.91	67.14
Amarillos	2597.12 ± 172.92	36.26	2420.86 ± 167.78	36.20	1042.57 ± 53.70	32.86
Totales	7162.50 ± 393.72		6687.45 ± 422.10		3172.78 ± 144.61	
Humedad (%)		88		10		3

Tabla XXII: Cambios porcentuales en las fracciones roja y amarilla, y pigmentos totales durante el procesado para pimentón de frutos de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Pigmentos	Pérdidas porcentuales por etapas		
	Secado	Molienda	Proceso global
	Variedad Bola		
Rojos	-40.23	43.71	21.07
Amarillos	38.45	52.67	70.87
Totales	-6.21	46.05	42.69
	Variedad Agridulce		
Rojos	6.54	50.07	53.34
Amarillos	6.78	56.93	59.86
Totales	6.63	52.55	55.70

En todo momento, la variedad *Agridulce* muestra siempre un mayor contenido carotenoide que la variedad *Bola*, estando esta observación en consonancia con lo observado previamente durante la maduración de los frutos de ambas variedades. El estudio detallado de la citada tabla destaca de nuevo el hecho, en principio extraño, de que en la variedad *Bola* durante la etapa de secado se observe un aumento en la concentración de pigmentos cuando lo predecible sería todo lo contrario o, a lo sumo, una constancia. Esto apoya los estudios realizados por Mínguez et al. (1993c), descartando toda casualidad en el fenómeno inicialmente observado por estos autores, y remarcando de nuevo una gran dependencia varietal.

En el presente estudio, en el cual se han controlado los pigmentos individualmente, se ha observado que ocurre una síntesis de pigmentos en la variedad *Bola* durante la etapa de secado. No obstante, este incremento en pigmentos no debe atribuirse completamente a una síntesis *de novo*, ya que el contenido neto de pigmentos incrementa solo de 4724.15 a 5017.66 mg/kg (es decir un aumento del 6.21%), sino más bien a una transformación de parte de los pigmento amarillos existentes en pigmentos rojos mediante las mismas rutas biosintéticas que operan durante el proceso de maduración anteriormente discutido. Esto explicaría el incremento observado en la fracción roja de pigmentos (1120 mg/kg) a expensas de los pigmentos amarillos que lo acusan mediante un descenso de 789 mg/kg, indicando que los frutos no estaban completamente maduros y que consecuentemente han continuado madurando durante la etapa de secado lento (con humo) a la que han sido sometidos. Por el contrario, en la variedad *Agridulce* el contenido en pigmentos experimenta un descenso desde 7162.50 a 6687.45 mg/kg (un descenso del 6.63%), lo cual debe ser entendido como lo normal en condiciones suaves de secado.

Una vez comprobados los cambios que en la composición carotenoide origina el procesado del pimentón se pasa a estudiar de forma detallada el comportamiento individual de pigmentos en cada variedad. La composición carotenoide encontrada en cada fase del proceso para los frutos de las variedades *Bola* y *Agridulce* se muestra en las Tablas XXIII y XXIV respectivamente. Así mismo las pérdidas porcentuales que experimenta cada pigmento durante cada etapa del proceso se muestran en la Tabla XXV. En ambas variedades capsanteno es el pigmento que se encuentra en mayor concentración en todas las etapas del proceso. En el fruto fresco este pigmento es seguido en orden decreciente de concentración

Tabla XXIII: Cambios en la concentración individual de pigmentos carotenoides (mg/Kg) durante el procesado para pimentón de frutos de pimiento de la variedad *Bola*.

Pigmento	Concentración					
	Fruto fresco		Fruto seco		Pimentón	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
Capsorrubeno	313.07±8.90	6.63	362.48±31.22	7.27	176.64±20.58	6.53
Violaxanteno	295.43±36.49	6.25	189.13±26.81	3.77	112.20±12.71	4.15
Capsanteno 5,6-epóxido	233.07±23.68	4.93	238.10±18.37	4.75	123.35±10.08	4.56
Capsanteno	1885.73±167.89	39.92	2796.61±158.10	55.79	1602.36±83.22	59.20
Anteraxanteno	129.64±13.11	2.74	141.60±11.19	2.82	98.75±7.16	3.65
Capsoluteina	241.21±21.54	5.11	351.05±18.01	7.00	207.27±11.20	7.65
Zeaxanteno	528.29±58.38	11.18	312.39±33.69	6.23	178.03±14.21	6.58
β -Criptoxanteno	382.71±34.61	8.10	239.18±16.88	4.76	80.80±4.79	2.98
β -Caroteno	715.00±41.50	15.13	387.11±37.10	7.71	127.15±6.44	4.70

Tabla XXIV: Cambios en la concentración individual de pigmentos carotenoides (mg/Kg) durante el procesado para pimentón de frutos de pimiento de la variedad *Agridulce*.

Pigmento	Concentración					
	Fruto fresco		Fruto seco		Pimentón	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
Capsorrubeno	455.25±4.78	6.36	381.16±16.87	5.70	217.44±11.33	6.85
Violaxanteno	227.33±30.24	3.17	200.61±22.84	3.00	123.96±4.14	3.91
Capsanteno 5,6-epóxido	311.58±25.11	4.35	223.45±15.96	3.34	117.02±6.61	3.69
Capsanteno	3444.67±178.30	48.09	3242.16±198.26	48.48	1590.20±60.60	50.12
Anteraxanteno	145.08±20.76	2.03	147.67±25.46	2.21	97.80±8.93	3.08
Capsoluteina	353.83±12.61	4.94	420.02±23.23	6.28	205.40±12.37	6.47
Zeaxanteno	721.84±56.14	10.08	730.43±51.63	10.92	318.54±15.51	10.04
β -Criptoxanteno	578.83±28.97	8.08	629.40±40.82	9.42	199.95±13.71	6.30
β -Caroteno	924.08±36.81	12.90	712.54±27.12	10.65	302.47±11.41	9.54

Tabla XXV: Cambios porcentuales en la concentración individual de pigmentos carotenoides como consecuencia del procesado para pimentón de frutos de pimiento de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Pigmento	Pérdidas porcentuales por etapas					
	Variedad Bola			Variedad Agridulce		
	Secado	Molienda	Proceso global	Secado	Molienda	Proceso global
Capsorrubeno	-15.78	51.27	43.58	16.27	42.95	52.24
Violaxanteno	35.98	40.68	62.02	11.75	38.21	45.47
Capsanteno 5,6-epóxido	-2.16	48.19	47.08	28.28	47.63	62.44
Capsanteno	-48.30	42.70	15.03	5.88	50.95	53.84
Anteraxanteno	-9.23	30.26	23.83	-1.79	33.77	32.59
Capsoluteina	-45.54	40.96	14.07	-18.71	51.10	41.95
Zeaxanteno	40.87	43.02	66.31	-1.19	56.39	55.87
β -Criptoxanteno	37.50	66.22	78.89	-8.74	68.23	65.46
β -Caroteno	45.86	67.15	82.22	22.89	57.55	67.27

por β -caroteno, zeaxanteno, β -criptoxanteno y capsorrubeno independientemente de la variedad.

Durante el procesado de los frutos de la variedad *Bola*, se observa como la concentración de β -caroteno, β -criptoxanteno y zeaxanteno desciende en torno al 40% (lo cual englobará también la pérdida degradativa debida al secado), mientras que al mismo tiempo anteraxanteno, derivado 5,6 monoepóxido de zeaxanteno y precursor de capsanteno, aumenta en concentración junto con capsanteno y capsanteno 5,6-epóxido. De igual modo violaxanteno, precursor de capsorrubeno, decrece mientras que capsorrubeno aumenta.

Capsoluteína también experimenta un gran incremento en concentración, lo cual podría indicar que su síntesis está relacionada con las últimas etapas de la biosíntesis, o que se forma como producto final de alguna rama del proceso biosintético. Con respecto a este pigmento, ya se apuntó en el estudio de biosíntesis durante maduración que existe una clara diferencia varietal de forma que en la variedad *Bola* se encuentra en concentración similar e incluso superior que zeaxanteno, mientras que en la variedad *Agridulce* el contenido en zeaxanteno es siempre superior. Este hecho corrobora que durante la etapa de secado se ha producido una síntesis de pigmentos en la variedad *Bola*, puesto que en el fruto considerado como maduro capsoluteína se encuentra en concentración inferior a zeaxanteno, desapareciendo dicha diferencia durante el secado. Si atendemos a los valores porcentuales de las fracciones de pigmentos cuando el fruto está fresco, 56.58% de rojos y 43.42% de amarillos (Tabla XXI) y teniendo en cuenta que durante el estudio realizado durante la maduración de los frutos se estableció que la proporción de pigmentos para un fruto completamente maduro en 69.42% de pigmentos rojos y 30.58% de amarillos (Tabla XVII), esta diferencia apoya la idea de que los frutos de esta variedad no estaban totalmente maduros al comienzo del proceso de secado. Además al observar la proporción de pigmentos rojos (74.70%) para el fruto seco demuestra que la síntesis de estos pigmentos ha sido a expensas de los pigmentos precursores amarillos (25.30%), los cuales al no sintetizarse hacen que se rompa el equilibrio rojos/amarillos de un fruto fresco.

Con respecto a la variedad *Agridulce* durante el secado se observa que algunos pigmentos, β -criptoxanteno, zeaxanteno, anteraxanteno, y capsoluteína también experimentan un incremento de concentración aunque nunca tan acusado como en la otra variedad. Cabe destacar que es capsoluteína el pigmento que más aumenta en concentración lo cual sugiere

de nuevo que su síntesis debe ser compleja y situada en el extremo de alguna ruta biosintética, y por ello más tardía. En esta variedad se observa una constancia en los porcentajes de rojos y amarillos totales antes y después del secado, lo que indica que los pimientos secados estaban ya maduros.

La explicación de que los frutos de esta variedad, no se recolecten en estado de total madurez reside, en parte, en la preocupación del agricultor a que condiciones meteorológicas adversas inutilicen la cosecha. El gran grosor de la pulpa (5-8 mm) en la variedad *Bola* frente al que presente la variedad *Agridulce* (2-3 mm), hace que en la primera no se alcance la maduración por igual en todo el fruto, aunque externamente lo parezca, presentando en muchos casos la placenta de color blanquecino indicativo de su incompleta maduración. Esta situación no ocurre en la variedad *Agridulce*, la cual además de presentar un menor grosor de la pulpa, tiene una mayor superficie, lo que facilita que la madurez sea más rápida y homogénea en todo el fruto.

La interconversión de pigmentos detectada en la fase de secado en la variedad *Bola*, hace la deducción de conclusiones acerca de la influencia de dicha etapa sobre la estabilidad de los pigmentos en esta variedad. No obstante, se puede predecir en condiciones de total madurez le sea extensible lo que sucede en la variedad *Agridulce*, en donde durante el secado se da una disminución en la concentración de cada pigmento, pero se mantiene aproximadamente la misma composición porcentual, por lo que en principio puede concluirse que el secado no afecta de forma sensible a unos pigmentos más que a otros.

Durante la etapa de molienda, para ambas variedades se observa como hay un brusco descenso en la concentración de pigmentos, seguramente debido a dos causas. Por una parte a la adición, que habitualmente se realiza en esta etapa del proceso industrial, de una proporción alta de semilla (entre el 45-50% en peso). Esta adición se puede estimar de forma aproximada tomando como referencia capsanteno, que al ser el pigmento más estable se verá menos afectado por el proceso y permite hacer la aproximación de que su descenso se debe únicamente a la dilución por la adición de semilla. Según estas premisas se deduce que en la variedad *Agridulce* hay una adición de semilla del 51% y en *Bola* del 43%. Por otro lado la disminución en la concentración carotenoides se deberá a la influencia que el proceso de molturación tenga sobre la estabilidad de cada pigmento. Si observamos la composición porcentual en los estados de seco y molido, y sobretodo en la variedad *Agridulce*, se observa

como son los pigmentos amarillos los que principalmente decrecen frente al correspondiente crecimiento porcentual de los pigmentos rojos. Esto hace pensar que los pigmentos amarillos sean menos estables que los rojos y por lo tanto se afecten más durante el proceso de molienda, en el cual la temperatura alta que se alcanza por la fricción dentro del molino, así como el aumento de superficie específica y la destrucción de compartimentación celular facilitan enormemente las reacciones degradativas por oxidación.

3.- Estabilidad comparada de pigmentos.

Si examinamos lo que ocurre en el proceso global, también se observa que los pigmentos amarillos se degradan en mayor extensión que los rojos, y que entre los primeros β -caroteno es más inestable, seguido de β -criptoxanteno y posteriormente de zeaxanteno. Como ya han observado otros autores (Biacs et al., 1989), los pigmentos esterificados poseen mayor estabilidad con respecto a las formas libres, lo cual explica el orden de estabilidad observado, ya que β -caroteno no puede presentarse en forma esterificada, β -criptoxanteno puede estar en forma libre y monoesterificada, y zeaxanteno puede estar en forma libre, mono- y hasta diesterificada. Dentro de los pigmentos rojos, capsanteno y capsorrubeno parecen ser los más estables, los cuales también se encuentran en forma libre, mono- y mayoritariamente diesterificada. Estas conclusiones son fácilmente observables en la variedad *Agridulce*, pero no en *Bola* pues al partir de frutos de maduración incompleta no son una referencia adecuada para el proceso global, ya que además de la síntesis de pigmentos observada durante la etapa de secado muy posiblemente también se ha dado una esterificación de los pigmentos formados.

En la Tabla XXVI se muestran las principales relaciones entre los pigmentos estudiados en función de la etapa del proceso de fabricación para ambas variedades. Mediante el examen de los resultados podemos llegar a deducir la estabilidad comparada de unos pigmentos con respecto a otros en función de la incidencia de cada etapa del proceso de elaboración del pimentón, con independencia de las posibles diluciones por adición de semillas. En estudios previos (Mínguez et al., 1993c), éste control se ha realizado contabilizando de forma global las fracciones rojas y amarillas, así como sus relaciones. En el presente estudio, y debido a que se controlan los pigmentos individuales, es posible estudiar y analizar las relaciones que guardan entre sí cada uno de los pigmentos.

Tabla XXVI: Cambios en la relación entre pigmentos individuales y por fracciones rojas y amarillas durante el procesado para pimentón.

Relación de pigmentos	Variedad Bola			Variedad Agri dulce		
	Fruto fresco	Fruto seco	Pimentón	Fruto fresco	Fruto seco	Pimentón
β-Caroteno/						
β -Criptoxanteno	1.87	1.62	1.57	1.60	1.13	1.51
Zeaxanteno	1.37	1.24	0.71	1.28	0.98	0.95
Violaxanteno	2.42	2.05	1.13	4.06	3.55	2.44
Capsanteno	0.38	0.14	0.08	0.27	0.22	0.19
Capsorrubeno	2.28	1.07	0.72	2.03	1.87	1.39
Capsoluteina	2.96	1.10	0.61	2.61	1.70	1.47
β-Criptoxanteno/						
Zeaxanteno	0.72	0.77	0.45	0.80	0.86	0.63
Violaxanteno	1.30	1.26	0.72	2.55	3.14	1.61
Capsanteno	0.20	0.09	0.05	0.17	0.19	0.13
Capsorrubeno	1.22	0.66	0.46	1.27	1.65	0.92
Capsoluteina	1.59	0.68	0.39	1.64	1.50	0.97
Zeaxanteno/						
Violaxanteno	1.79	1.65	1.59	3.18	3.64	2.57
Capsanteno	0.28	0.11	0.11	0.21	0.23	0.20
Capsorrubeno	1.69	0.86	1.01	1.59	1.92	1.46
Capsoluteina	2.19	0.89	0.86	4.98	4.95	3.26
Violaxanteno/						
Capsanteno	0.07	0.06	0.08	0.16	0.07	0.07
Capsorrubeno	0.50	0.53	0.57	0.94	0.52	0.64
Capsoluteina	0.64	0.48	0.60	1.22	0.54	0.54
Capsanteno/						
Capsorrubeno	6.02	7.72	9.07	7.57	8.51	7.31
Capsoluteina	7.82	7.97	7.73	9.74	7.72	7.74
Capsorrubeno/						
Capsoluteina	1.30	1.03	0.85	1.29	0.91	1.06
Fig. Amarillos/						
β -Caroteno	2.87	3.28	4.69	2.81	3.39	3.44
β -Criptoxanteno	5.36	5.31	7.39	4.49	3.85	5.21
Zeaxanteno	3.88	4.06	3.35	3.60	3.31	3.27
Violaxanteno	6.94	6.71	5.32	11.42	12.07	8.41
Capsanteno	1.09	0.45	0.37	0.75	0.75	0.66
Capsorrubeno	6.55	3.50	3.38	5.70	6.35	4.80
Capsoluteina	8.50	3.62	2.88	7.34	5.76	5.08
Fig. Rojos/						
β -Caroteno	3.74	9.68	16.59	4.94	5.99	7.04
β -Criptoxanteno	6.98	15.67	26.11	7.89	6.78	10.66
Zeaxanteno	5.06	12.00	11.85	6.32	5.84	6.69
Violaxanteno	9.05	19.82	18.80	20.08	21.27	17.19
Capsanteno	1.42	1.34	1.32	1.33	1.32	1.34
Capsorrubeno	8.54	10.34	11.94	10.03	11.19	9.80
Capsoluteina	11.08	10.68	10.18	12.90	10.16	10.37
Fig. Amarillos	1.30	2.95	3.53	1.76	1.76	2.04

Se observa como durante el proceso completo de elaboración de pimentón la fracción de pigmentos amarillos decrece más que la fracción correspondiente a los pigmentos rojos. Mientras en la variedad *Agridulce* la relación pigmentos rojos/amarillos aumenta gradualmente, en la variedad *Bola* este incremento es muy acusado. Esta variación es en parte debida a la mayor estabilidad de los pigmentos rojos pero también al hecho de tener lugar una síntesis de pigmentos rojos a expensas de los amarillos precursores durante el secado, lo cual es muy patente en la variedad *Bola*. El hecho de que la relación de β -caroteno con respecto al resto de pigmentos decrece, global e individualmente, demuestra nuevamente que este es el menos estable de los pigmentos amarillos, seguido de β -criptoxanteno y de zeaxanteno en orden de mayor estabilidad. Capsanteno y capsorrubeno muestran estabilidades semejantes, y siempre superior a cualquier pigmentos de la fracción amarilla. Capsoluteina parece ser mas estable que los dos pigmentos antes mencionados, sin embargo tal afirmación está influenciada por el hecho de ser el pigmento que de forma común para ambas variedades se sintetiza durante la etapa de secado. Como resumen se puede concluir que los pigmentos de la fracción roja son mas estables que los correspondientes a la amarilla, siendo durante la etapa de molienda cuando esto se pone más de manifiesto.

4.- Incidencia del proceso de fabricación sobre el contenido en provitamina A.

Al presentar el fruto maduro del pimiento rojo alta concentración en β -caroteno y β -criptoxanteno, los cuales poseen actividad de provitamina A, hace que pueda ser considerado como un alimento rico en dicha provitamina. Como ya se dedujo durante el estudio durante la maduración, los frutos maduros de la variedad *Agridulce* exhiben un mayor contenido en provitamina A que la variedad *Bola*.

Debido a que durante el proceso de obtención del pimentón los pigmentos carotenoides se degradan y en mayor medida los amarillos, dentro de los cuales se engloban β -caroteno y β -criptoxanteno, el contenido en provitamina A disminuirá durante dicho proceso. Como se desprende de la Tabla XXVII, durante la etapa de secado en la variedad *Agridulce* se pierde un 15.01% de provitamina A frente al 44.01% en la variedad *Bola*. Esta notable diferencia se debe al hecho observado en la variedad *Bola*, de forma que al darse síntesis de pigmentos rojos a expensas de sus precursores amarillos origina un drástico descenso en la

Tabla XXVII: Evolución del valor de provitamina A (U.I./Kg) durante el procesado para pimentón de frutos maduros de las variedades *Bola* y *Agridulce*.

Variedad	Contenido de Provitamina A		
	Fruto fresco	Fruto seco	Pimentón
Bola	1529.84 ± 99.74	856.51 ± 76.75	283.31 ± 14.96
Agridulce	2051.55 ± 86.94	1743.56 ± 36.04	680.77 ± 31.12

Variedad	Pérdidas porcentuales por etapas		
	Secado	Molienda	Proceso global
Bola	44.01	66.92	81.48
Agridulce	15.01	60.96	66.82

concentración de β -criptoxanteno y fundamentalmente de β -caroteno, y por lo tanto en el contenido en provitamina A. Durante la etapa de molienda los descensos en el valor de provitamina A son similares en ambas variedades, 60.96% en la variedad *Agridulce* y 66.92% en la variedad *Bola*, lo cual explicable al darse descensos similares en dicha etapa para los carotenoides con actividad provitamínica en ambas variedades. Como resultados de ambas etapas, en el proceso global la variedad *Agridulce* pierde el 66.82% de su contenido inicial en provitamina A, frente al 81.48% en la variedad *Bola*.

Podemos concluir que los frutos de la variedad *Agridulce* son mas adecuados para la elaboración del pimentón, pues además de obtener un producto final con mayor concentración de pigmentos carotenoides y por lo tanto mas intenso su color, también es mayor el contenido de provitamina A en el producto acabado.

CONCLUSIONES

A.- CARACTERIZACION VARIETAL.

- 1.- Tanto la variedad *Bola* como *Agridulce* responden a la ruta biosintética de pigmentos establecida para el género *Capsicum*, no obstante la síntesis de carotenoides y el catabolismo de clorofilas establecen claras diferencias varietales, ya que el contenido clorofílico, carotenoide y valor de provitamina A es siempre notoriamente superior en la variedad *Agridulce*.
- 2.- Aunque la enzima clorofilasa está presente en los frutos durante todo el proceso de maduración, su función cambia según el momento concreto de dicho proceso.
 - En el estado de color verde el sentido de actuación de la enzima es biosintético, como lo demuestra la presencia de clorofilidas en el fruto verde.
 - Iniciada la maduración, en el estado de color cambiante, la ausencia de compuestos clorofílicos defitilados orienta su actuación, en coordinación con otras enzimas, en sentido catabólico, momento que coincide con la fase degradativa de clorofilas.
 - La presencia de la enzima clorofilasa en los frutos maduros de ambas variedades evidencia que la génesis de los cromoplastos se produce a partir de los cloroplastos preexistentes, utilizándose durante la misma las membranas tilacoidales en las cuales dicha enzima está intrínsecamente localizada.
- 3.- El patrón de composición carotenoide permite una clara diferenciación varietal, pudiendo utilizarse la relación capsoluteína/zeaxanteno como parámetro quimiotaxonómico diferenciador entre ambas variedades.
- 4.- El estrés nutricional que experimenta la planta del pimiento como consecuencia de las fructificaciones produce un claro efecto sobre el contenido de pigmentos.
 - La fracción de pigmentos clorofílicos evoluciona de forma diferente según la variedad. Mientras en la variedad *Agridulce* se acelera la desaparición de

clorofilas conforme aumenta el número de fructificaciones, en la variedad *Bola* se observa el efecto contrario.

- En la fracción de pigmentos carotenoides se aprecia un descenso en concentración para ambas variedades conforme aumentan las fructificaciones, provocando a su vez un desequilibrio del proceso biosintético de carotenoides, que se traduce en una acumulación de carotenoides amarillos en detrimento de la síntesis de carotenoides rojos.
 - Como consecuencia de lo anterior, el valor de provitamina A en los frutos de final de campaña se incrementa, revalorizándose con ello frutos que por su menor coloración roja son considerados de peor calidad.
- 5.- La esterificación de pigmentos que acontece durante la maduración de los frutos marca de inicio la estabilidad potencial de los mismos. En líneas generales, el progreso de la esterificación de xantofilas evoluciona de forma paralela en ambas variedades, no existiendo diferenciación varietal en cuanto a la naturaleza de los ácidos grasos implicados en dicho proceso, perfilándose el patrón de esterificación de pigmentos como un claro índice del estado de maduración del fruto.
- 6.- El sistema enzimático responsable de la esterificación de los pigmentos parece discriminar la estructura de los mismos, lo cual se evidencia por la esterificación selectiva de pigmentos con grupos 3-hidroxi- κ (capsanteno y capsorrubeno) con los ácidos grasos laúrico, mirístico y palmítico, mientras que los pigmentos con grupos 3-hidroxi- β son esterificados con los ácidos linoleico, palmítico y mirístico.

B.- INCIDENCIA DEL PROCESADO.

- 7.- El procesado de los frutos del pimiento para pimentón no implica modificación cualitativa en la composición de pigmentos carotenoides del fruto fresco, manteniéndose las diferencias varietales.

- 8.- La incidencia de la etapa de secado sobre la composición carotenoide inicial de los frutos marca claras diferencias varietales. Mientras en la variedad *Agridulce* se produce una pérdida generalizada de pigmentos, en la variedad *Bola* dicho tratamiento implica un aumento de la fracción de carotenoides rojos en detrimento de la inicialmente presente de pigmentos amarillos, permitiendo descartar una posible síntesis *de novo*, y evidenciando una transformación de los mismos, lo que se asocia a una recolección de los frutos cuando aún no han alcanzado la plena madurez.
- 9.- Como consecuencia, para la variedad *Bola* se deduce que durante la etapa de secado existe una superposición de procesos biosintéticos y degradativos, ambos favorecidos por la temperatura y por lo tanto modificables externamente. La preeminencia de un tipo de reacción u otra puede ser controlada en función de las condiciones de secado.
- 10.- Aunque la etapa de secado afecta por igual a la estabilidad de los pigmentos, las características varietales encontradas evidencian que el proceso de secado de los frutos debe ser adaptado en función de la variedad a fin de aprovechar al máximo las características de las mismas.
- 11.- La etapa de molienda implica la pérdida de compartimentación celular y el aumento de superficie específica, posibilitando la degradación oxidativa de carotenoides, siendo esta más acusada en la fracción amarilla que incluye a los carotenoides con valor potencial de provitamina A.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Baki, A.A., "Changes in chlorophyll and carotene contents of green and bleached lima bean seeds during development and maturation". *J.A. Soc. Hort. Sci.*, 96 (1971) 576.
- Almela, L.; López-Roca, J.M.; Candela, M.E. y Alcázar, M.D., " Separation and determination of individual carotenoids in a *Capsicum* cultivar by normal-phase high-performance liquid chromatography". *J. Chromatog.*, 302 (1990) 95.
- Altman, L.J.; Ash, L.; Kowerski, R.C.; Epstein, W.W.; Larsen, B.R.; Rilling, H.C.; Muscio, F. y Gregonis, D.E., "Prephytoene pyrophosphate, a new intermediate in the biosynthesis of carotenoids". *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 3257.
- Amir-Shapira, K.; Goldschmidt, E., y Altman, A., "Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: *in vivo* breakdown intermediates suggest different degradative pathways for citrus fruit and parsley leaves". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 (1987) 1901.
- Anderson, A.F.H. y Calvin, M., "An improved method for the separation and purification of chlorophyll *a*". *Nature*, 194 (1962) 285.
- Arkcoll, D.B. y Holden, M., "Changes in chloroplast pigments during the preparation of leaf protein". *J. Sci. Food Agric.*, 24 (1973) 1217.
- Aronoff, S., "Chlorophyllide *b*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102 (1981) 108.
- Bacon, M.F., "Separation of chlorophylls *a* and *b* related compounds by thin-layer chromatography on cellulose". *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 322.
- Bacon, M.F., "Artifacts from chromatography of chlorophylls". *Biochim. J.*, 101 (1966) 34.
- Bacon, M.F. y Holden, M., "Changes in chlorophylls resulting from various chemical and physical treatments of leaves and leaf extracts". *Phytochemistry*, 6 (1967) 193.
- Baranyai, M.; Matus, Z. y Szabolcs, J., "Determination, by HPLC, of carotenoids in paprika products". *Acta Aliment.*, 11 (1982) 309.
- Barber, M.S.; Jackman, C.M.; Warren, C.K. y Weedon, B.C.L., "The structures of paprika ketones". *Proc. Chem. Soc.*, (1960) 19.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. y Pandey, P.S., "Biosynthesis of natural porphyrins: specificity and action of cosynthetase on isomeric hydroxymethylbilanes". *Angew. Chem.*, 93 (1981) 290.
- Battle, A.M. del C.; Llambias, E.B.C.; Wider de Xifra, E.A. y Tigier, H.A. "Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. XV. The effect of growth conditions". *Indian J. Biochem.*, 6 (1975) 591.

- Bauernfeind, J.C., *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. (ed.), Academic Press, New York, (1981).
- Beale, S.I., " δ -Aminolevulinic acid in plants: its biosynthesis, regulation and role in plastid development". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29 (1978) 95.
- Beale, S.I. y Castelfranco, P.A., "The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in plants. II. Formation of ^{14}C - δ -aminolevulinic acid from labeled precursors in greening plant tissues". *Plant Physiol.*, 53 (1974) 297.
- Bendich, A., "Symposium conclusions: biological actions of carotenoids". *J. Nutr.*, 119 (1989) 135.
- Benz, Z. y Rüdiger, W., "Chlorophyll biosynthesis: various chlorophyllides as exogenous substrates for chlorophyll synthetase". *Z. Naturforsch.*, 36c (1981) 51.
- Berry, D.L.; Singh, B. y Salunkhe, O.K., "Incorporation of β -hydroxy- β -methylglutaric acid into carotenoids and other soluble compounds in maize seedlings". *Plant Cell Physiol.*, 13 (1972) 157.
- Biacs, P.A.; Daood, H.G.; Pavisa, A. y Hajdu, F., "Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L. var Sz-20)". *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 350.
- Bickel, H. y Schulz, G., "Biosynthesis of plastoquinone and β -carotene in isolated chloroplasts". *Phytochem.*, 15 (1976) 1253.
- Bjørnland, T.; Borch, G. y Liaaen-Jensen, S., *Phytochem.*, 25 (1986) 201.
- Block, M.A.; Joyard, J. y Douce, R., "Site of synthesis of geranylgeraniol in intact spinach chloroplast". *Biochim. Biophys. Acta*, 631 (1980) 210.
- Bogorad, L., "The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. I. Uroporphyrin I". *J. Biol. Chem.*, 233 (1958a) 501.
- Bogorad, L., "The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III". *J. Biol. Chem.*, 233 (1958b) 510.
- Bone, R.A.; Landrum, J.T. y Tarsis, S.L., "Preliminary identification of the human macular pigment". *Vision Res.*, 25 (1985) 1531.
- Braithwaite, G.D. y Goodwin, T.W., "Studies in carotenogenesis. XXV. The incorporation of $[1-^{14}\text{C}]$ acetate and $[2-^{14}\text{C}]$ acetate and $^{14}\text{CO}_2$ into carrot root preparations". *Biochem. J.*, 76 (1960a) 1.
- Braithwaite, G.D. y Goodwin, T.W., "Studies in carotenogenesis. XXVII. Incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate, DL $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonate and $^{14}\text{CO}_2$ into carrot root preparations". *Biochem. J.*, 76 (1960b) 194.

- Bramley, P.M., "The *in vitro* biosynthesis of carotenoids". En *Advances in Lipid Research*, vol. 21, R. Paoletti y D. Kritchevsky, eds. Academic Press, New York (1985).
- Braumann, T. y Grimme, L.H., "Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 170 (1979) 264.
- Britton, G., *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press, Cambridge (1983).
- Brown, L.M.; Hargrave, B.T. y MacKinnon, M.D., "Analysis of chlorophyll a in sediments by high-pressure liquid chromatography". *Can. J. Fish. Aquat.*, 38 (1981) 205.
- Buckle, K.A. y Rahman, F.M.M., "Separation of chlorophyll and carotenoid pigments of capsicum cultivars". *J. Chromatogr.*, 171 (1979) 385.
- Bureau, J.L. y Bushway, R.J., "HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States". *J. Food Sci.*, 51 (1986) 128.
- Burke, S. y Aronoff, S. "Semiquantitative paper chromatography of chlorophylls *a* and *b*". *Anal. Biochem.*, 101 (1980) 103.
- Bushway, R.J., "Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography". *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 409.
- Bushway, R.J. y Wilson, A.M., "Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography". *Can. Inst. Food Sci. technol.*, 15 (1982) 165.
- Camara, B., "*In vitro* conversion of violaxanthin to capsorubin by chromatoplast enriched fraction of *Capsicum annuum*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93 (1980) 113.
- Camara, B. y Dogbo, O., "Demonstration and solubilization of lycopene cyclase from *Capsicum* chromoplast membranes". *Plant Physiol.*, 80 (1986) 172.
- Camara, B. y Monéger, R., "Free and esterified carotenoid in green and red fruits of *Capsicum Annuum*". *Phytochemistry*, 17 (1978) 91.
- Camara, B. y Monéger, R., "*In vivo* conversion of antheraxanthin to capsanthin by chromatoplast enriched fraction of *Capsicum annuum*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99 (1981) 1117.
- Camara, B. y Monéger, R., "Biosynthetic capabilities and localization of enzymatic activities in carotenoid metabolism of *Capsicum annuum* isolated chromoplasts". *Physiol. Veg.*, 20 (1982) 757.

- Camara, B.; Bardat, F. y Monéger, R., "Nature du premier précurseur en C40 des caroténoïdes dans les chromoplastes de fruit de poivron (*Capsicum annuum* L.). *C.R. Acad. Sci.*, 294 (1982) 549.
- Camara, B.; Dogbo, O.; d'Harlingue, A.; Kleinig, H. y Monéger, R., "Metabolism of plastid terpenoids: lycopene cyclation by *Capsicum* chromoplast membranes". *Biochem. Biophys. Acta*, 836 (1985b) 262.
- Carnevale, J.; Cole, E.R. y Crank, G., "Photocatalyzed oxidation of paprika pigments". *J. Agric. Food Chem.*, 28 (1980) 953.
- Castelfranco, P.A.; Weinstein, J.D.; Schwarcz, S.; Pardo, A.D. y Wezelman, B.E., "The Mg insertion step in chlorophyll biosynthesis". *Arch. Biochem. Biophys.*, 192 (1979) 592.
- Chandler, A.L. y Schwartz, S.J., "HPLC separation of Cis-Trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables". *J. Food Sci.*, 52 (1987) 669.
- Chen, T.C. y Miller, G.W., "Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves". *Plant Cell Physiol.*, 15 (1974) 993.
- Chiba, Y.; Aiga, I.; Idemori, M.; Satoh, Y.; Matsushita, K. y Sasa, T., "Studies on chlorophyllase of *Chlorella protothecoides* I. Enzymatic phytylation of methyl chlorophyllide". *Plant & Cell Physiol.*, 8 (1967) 623.
- Cholnoky, L., "The pigment components of paprika and their vitamin A effect". *Kísérletügyi Közlemények*, 40 (1937) 173.
- Cholnoky, L. y Szabolcs, J., "Bemerkungen zur struktur des capsorubins". *Experientia*, 16 (1960) 483.
- Cholnoky, L.; Györgyfy, K.; Nagy, E. y Pánczél, M., "Investigations of carotenoid pigments. I. Pigments of red paprika". *Acta Chim. Hung.* 6 (1955) 143.
- Cholnoky, L.; Györgyfy, K.; Nagy, E. y Panczel, M., "Function of carotenoids in chlorophyll-containing organs". *Nature (London)*, 178 (1956) 410.
- Cholnoky, L.; Györgyfy, K.; Nagy, E. y Pánczél, M., "Investigations of carotenoid pigments. III. Pigments of the yellow paprika". *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 16 (1958) 227.
- Cholnoky, L.; Györgyfy, K.; Ronai, A.; Szabolcs, J.; Toth, G.; Galesco, G.; Mallams, A.K.; Waight, E.S. y Weedon, B.C.L., *J. Chem. Soc.*, (1969) 1256.
- Clough, J.M. y Pattenden, G., "Stereochemical assignment of polycopene and other poly-Z-isomeric carotenoids in fruits of the Tangerine tomato *Lycopersicon esculentum* var. *Tangella*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I (1983) 3011.

- Clydesdale, F.M. y Francis, F.J., "Chlorophylls". En *Principles of Food Science*, Vol. 1. O.R. Fennema, (Ed.), Marcel Dekker, New York (1976) 386.
- Clydesdale, F.M. y Francis, F.J., "Pigmentos". En *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. O.R. Fennema (Ed.) Reverté S.A. Barcelona (1982) 449.
- Comar, C.L. y Zscheile, F.P., "Analysis of plant extracts for chlorophylls *a* and *b* by a photoelectric spectrophotometric method". *Plant Physiol.*, 17 (1942) 198.
- Costes, C., "Biosynthèse du phytol des chlorophylles et du squelette tetraterpenique des caroténoïdes dans les feuilles vertes". *Phytochemistry*, 5 (1966) 311.
- Coultate, T.P., "Pigmentos". En *Alimentos: química de sus componentes*. Acribia, S.A. Zaragoza (1984) 101.
- Craft, N.E.; Wise, S.A. y Soares, J.H., "Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotenoids" *J. Chromatogr.*, 589 (1992) 171.
- Curl, A.L., "The carotenoids of red bell peppers". *J. Agric. Food Chem.*, 10 (1962) 504.
- Curl, A.L., "The carotenoids of green bell peppers". *J. Agric. Food Chem.*, 12 (1964) 522.
- Daood, H.G. y Biacs, P.A., "Evidence for the presence of lipoxygenase and hydroperoxyde-decomposing enzyme in red pepper seeds". *Acta Aliment.*, 15 (1986) 307.
- Davies, B.H., "Carotenoids". En *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol. 2, Goodwin T.W. (ed.), Academic Press. London, New York, San Francisco (1976) 38.
- Davies, D. y Holdsworth, E.S., "The use of high pressure liquid chromatography for the identification and preparation of pigments concerned in photosynthesis". *J. Liq. Chromatogr.*, 3 (1980) 123.
- Davies, B.H. y Köst, H.P., "Carotenoids", En *Handbook of Chromatography*. Vol. 1, Köst, H.P. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL (1988).
- Davies, B.H.; Matthews, S. y Kirk, J.T.O., "The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *capsicum annuum*". *Phytochemistry*, 9 (1970) 797.
- De la Mar, R.R. y Francis, F.J., "Carotenoids degradation in bleached paprika". *J. Food Sci.*, 34 (1969) 287.
- Deli, J.; Matus, Z. y Szabolcs, J., "Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annuum* variety *longum nigrum*) during ripening". *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 2072.

- Deulin, R.M., *Fisiología vegetal.*, Ed., Omega. Barcelona (1975).
- Dogbo, O.; Bardat, F. y Camara, B., "Terpenoid metabolism in plastids: activity, localization and substrate specificity of chlorophyll synthetase in *Capsicum annuum* plastids". *Physiol. Vég.*, 22 (1984) 75.
- Egger, K., "Die farbwachse roter paprikaschoten". *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 81 (1968) 153.
- Ellsworth, R.K., "Chlorophyll biosynthesis", En *The Chemistry of Plant Pigments*, Chichester, C.O., Ed., Academic Press, New York, (1972) 85.
- Ellsworth, R.K.; Perkins, H.J.; Detwiler, S.P. y Liu, K., "On the enzymatic conversion of ¹⁴C-labeled chlorophyll *a* to ¹⁴C-labeled chlorophyll *b*". *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 275.
- Entschel, R. y Karrer, P., "Zur konstitution des capsanthins and capsorubins"., *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 89.
- Eskins, K. y Dutton, H.J., "Sample preparation for high-performance liquid chromatography of higher plant pigments". *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1885.
- Eskins, K. y Harris, L., "High-performance liquid chromatography of etioplast pigments in red kidney bean leaves". *Photochem. Photobiol.*, 33 (1981) 131.
- Evans, N.; Games, D.E.; Jacson, A.H. y Matlin, S.A., "Applications of high-pressure liquid chromatography and fiels desoprtion mass spectrometry in studies of natural porphyrins and chlorophyll derivatives", *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 325.
- Faigle, H. y Karrer, P., "Konstitution und konfiguration von capsanthin und capsorubin". *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 155.
- Falk, J.E., *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, Amsterdam, (1964).
- Fenna, R.E. y Matthews, B.W., "Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*". *Nature*, 258 (1975) 573.
- Fiksdahl, A.; Bjørnland, T. y Liaaen-Jensen, S., "Algal carotenoids with novel end groups". *Phytochem.*, 23 (1984) 649
- Fischbach, H. "Microdeterminations for organically combined metals in pigment of okra". *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 26 (1943) 139.
- Fischbach, H. y Newburger, S.H. "Spectrophotometric study of the green color in okra". *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 26 (1943) 134.

-
- Fisher, C. y Kocis, J.A., "Separation of paprika pigment by HPLC". *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 55.
 - Food and Agriculture Organization. "Requeriments of vitamin A, iron, folate and vitamin B₁₂". *FAO Food and Nutrition Series*, 23, Roma, Italia. FAO Press, 1988, 1-107.
 - Foppen, F.H., "Tables for identification of carotenoid pigments". *Chromatographic Reviews*, 14 (1971) 133.
 - Frydman, R.B. y Frydman, B. "Purification and properties of porphobilinogen deaminase from wheat germ". *Arch. Biochem. Biophys.*, 136 (1970) 193.
 - Fuesler, T.P.; Wright, L.A. y Castelfranco, P.A., "Properties of magnesium chelatase in greening etioplasts". *Plant Physiol.*, 67 (1981) 246.
 - Fuesler, T.P.; Hanomoto, C.M. y Castelfranco, P.A., "Separation of Mg-protoporphyrin IX and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester synthesized de novo by developing cucumber etioplasts". *Plant Physiol.*, 69 (1982) 421.
 - Fuesler, T.P.; Wong, Y.S. y Castelfranco, P.A., "Localization of Mg-chelatase and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase within isolated developing cucumber chloroplasts". *Plant Physiol.*, 75 (1984) 662.
 - Gibson, K.D.; Neuberger, A. y Scott, J.J., "The purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydrase". *Biochem. J.* 61 (1955) 618.
 - Gold, H.J. y Weckel, K.G., "Degradation of chlorophyll to pheophytin during sterilization of canned peas by heat". *Food Technol.*, 13 (1959) 281.
 - Goodwin, T.W., *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall, London (1952).
 - Goodwin, T.W., "Studies on carotenogenesis. The changes in carotenoid and chlorophyll pigments in the leaves of deciduous trees during autumn necrosis". *Biochem. J.*, 68 (1958a) 503.
 - Goodwin, T.W., "Studies in carotenogenesis. XXV. The incorporation of ¹⁴CO₂, [2-¹⁴C]acetate and [2-¹⁴C]mevalonate into β -carotene by illuminated etiolated maize seedlings". *Biochem. J.*, 70 (1958b) 612.
 - Goodwin, T. W., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol.1. T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco (1976).
 - Goodwin, T.W., *The Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall, London (1980).

- Goodwin, T.W. y Goad, L.J., "Carotenoids and triterpenoids". En *The Biochemistry of fruits and their products*. Vol. 1 Hulme A.C. (Ed) Academic Press, London, New York y San Francisco (1970) 305.
- Granick, S., "Enzymatic conversion of δ -aminolevulinic acid to porphobilinogen". *Science*, 120 (1954) 1105.
- Gregory, G.K.; Chen, T. y Philip, T., "Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: Red bell peppers". *J. Food Sci.*, 52 (1987) 1071.
- Griffiths, W.T., "Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes". *Biochem. J.*, 186 (1978) 267.
- Gross, J., *Pigments in Fruits*. B.S. Schweigert (Ed.), Academic Press, London (1987).
- Gross, J., *Pigments in Vegetables. Chlorophylls and Carotenoids*. Van Nostrand Reinhold (Ed.), New York (1991).
- Grumbach, K.H. y Forn, B., "Chloroplast autonomy in acetyl-coenzyme A formation and terpenoid biosynthesis". *Z. Naturforsch.*, 35 (1980) 645.
- Hazarika, M. y Mahanta, P.K., "Some studies on carotenoids and their degradation in black tea manufacture". *J. Sci. Food Agric.*, 34 (1983) 1390.
- Heinonen, M.I.; Ollilainen, V., Linkola, E.K., Varo, P.T. y Koivistoinen, P.E., "Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits, and Berries". *J. Agric, Food Chem.*, 37 (1989) 655.
- Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N., "Enzyme structure". En *Methods in Enzimology*, Part. E., Vol. 47. Academic Press, (1977).
- Holden, M., "The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase". *Biochem. J.*, 78 (1961) 359.
- Holden, M., "Analytical methods - chlorophylls". En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol. 2, T.W. Goodwin, (Ed.), Academy Press. New York, San Francisco (1976) 1.
- Hooper, J.K., En "*Cloroplasts*", P. Siekevitz (Ed.), Plenum Press, New York, (1984).
- Huault, C. y Bruyant, P., "Affinity chromatography of δ -aminolevulinic dehydratase from radish seedlings". *Physiol. Vég.*, 22 (1984) 209.
- Humphrey, A.M. "Chlorophyll". *Food Chem.*, 5 (1980) 57.

- Iriyama, K.; Yoshiura, M. y Shiraki, M., "Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 302.
- Isler, O., "Introduction". En *Carotenoids*, O. Isler (Ed.). Birkhäuser Verlag Basel. Stuttgart (1971) 11.
- Jackson, A.H., "Structure, properties and distribution of chlorophylls". En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol. 1. T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco (1976) 1.
- Jacobs, J.M. y Jacobs, N.J., "Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis". *Biochem. J.*, 244 (1987) 219.
- Jacobs, J.M.; Jacobs, N.J. y De Maggio, A.E., "Protoporphyrinogen oxidation in chloroplast and plant mitochondria, a step in heme and chlorophyll synthesis". *Arch. Biochem. Biophys.*, 218 (1982) 233.
- Jacobsen, T.R., "A quantitative method for the separation of chlorophylls a and b from phytoplankton pigments by high pressure liquid chromatography". *Mar. Sci. Commun.*, 4 (1978) 33.
- Janson, T.R. y Katz, J.J., "NMR spectra of diamagnetic porphyrins". En *The Porphyrins*, Vol. 4, D. Dolphin (Ed.), Academic Press, New York (1978) 1.
- Jeffrey, S.W., "Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae". *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 271.
- Jeffrey, S.W. y Hallegraeff, G.M.; "Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35 (1987) 293.
- Jones, O.T.G., "The inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis in rhodospirillum rubrum spheroides by 8-hydroxyquinoline". *Biochim. J.*, 85 (1963) 335.
- Jones, O.T.G., "A protein-protochlorophyll complex obtained from inner seed coats of *Cucurbita pepo*". *Biochem. J.*, 101 (1966) 153.
- Jones, B.L. y Porter, J.W., "Biosynthesis of carotenes in higher plants". *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 3 (1986) 295.
- Jones, I.D., Butler, L.S., Gibbs, E. y White, R.C., "An evaluation of reversed phase partition for thin-layer chromatographic identification of chlorophylls and derivatives". *J. Chromatogr.*, 70 (1972) 87.

- Jordan, P.M. y Seehra, J.S., "The biosynthesis of uroporphyrinogen III: order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring". *FEBS Lett.*, 104 (1979) 364.
- Juhler, R.K. y Cox, R.P., "High-performance liquid chromatographic determination of chloroplast pigments with optimized separation of lutein and zeaxanthin". *J. Chromatogr.*, 508 (1990) 232.
- Jungalwala, F.B. y Cama, H.R., "Carotenoids in *Delonix regia (gul mohr)* flowers". *Biochem. J.*, 85 (1962) 1.
- Jungalwala, F.B. y Porter, J.W., "Biosynthesis of phytoene from isopentenyl and farnesyl pyrophosphate by partially purified tomato enzyme system". *Arch. Biochem. Biophys.*, 110 (1965) 291.
- Kan, K.; Tamura, Y.; Maki, T.; Koseki, M. y Naoi, Y. "Studies on the analysis of degradation products of chlorophyll and chlorophyllase activity". *Food Sci. Tech. Abs.* 5G28 (1985).
- Kanner, J. y Mendel, H., "Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): ascorbic acid". *J. Food Sci.*, 41 (1976) 183.
- Kasemir, H., "Action of light on chlorophyll(ide) appearance". *Photochem. Photobiol.*, 37 (1983) 701.
- Katz, J.J.; Dougherty, R.C. y Boucher, L.J., "Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll". En *The Chlorophylls*, L.P. Vernon y G.R. Seely (Eds.), Academic Press, New York (1966) 186.
- Katz, J.J.; Norman, G.D.; Svec, W.A. y Strain, H.H., "Chlorophyll diastereoisomers. The nature of chlorophylls *a'* and *b'* and evidence for bacteriochlorophyll epimers from proton magnetic resonance studies". *J. Am. Chem. Soc.*, 90, (1968) 6841.
- Khachik, F.; Beecher, G.R. y Whittaker, N.F., "Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents of several green vegetables liquid chromatography". *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 603.
- Khachik, F. y Beecher, G.R., "Separation of carotenol fatty acid esters by high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 449 (1988) 119.
- Klein, A.O. y Vishiac, W., "Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous systems"., *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2544.
- Krinsky, N.I., "Carotenoids and cancer in animal models". *J. Nutr.*, 119 (1989) 123.
- Krinsky, N.I.; Cornwell, D.G. y Oncley, J.L., "The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma". *Arch. Biochem. Biophys.*, 73 (1958) 233.

- Kuroki, M.; Shioi, Y. y Sasa, T., "Purification and properties of soluble chlorophyllase from tea leaf sprouts". *Plant. Cell. Physiol.*, 22 (1981) 717.
- Kushwaha, S.C.; Suzue, G.; Subbarayan, C. y Porter, J.W., "The conversion of phytoen ^{14}C to acyclic, monocyclic and dicyclic carotenes and the conversion of $15,15\text{'-}^3\text{H}$ to mono- and dicyclic carotenes by soluble enzyme systems obtained from plastids of tomato fruits". *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 4708.
- Lange, K., "Trennung von carotinoiden mit hilfe der HPLC". Dissertation, Erlangen, Nurnberg, (1976).
- Lambers, J.W.J., Terpstra, W. y Levine, Y.K., "Studies on the action mechanism of the membrane enzyme chlorophyllase". *Biochim. Biophys. Acta* 789 (1984) 188.
- Lambers J.W.J., Velthuis, H.W. y Terpstra, W. "Molecular mass estimation of chlorophyllase in situ by radiation inactivation analysis. Studies on the composition of the isolated ezyme". *Biochim. et Biophys. Acta* 831 (1985) 213.
- Lease, J.G. y Lease, E.J., "Factors affecting the retention of red colour in peppers". *Food Technol.*, 10 (1956) 368.
- Lehninguer, A.L., en "*Bioquímica*", Ediciones Omega, decimoquinta edición (1985).
- Levadoux, W.L.; Kalmokoff, M.L.; Pickard, M.D. y Grootwassink, J.W.D., "Pigment removal from canola oil using chlorophyllase". *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 64 (1987) 139.
- Liaaen-Jensen, S., "Isolation, reactions". En *Carotenoids*, O. Isler (ed.), Birkhäuser Verlag, Basel (1971).
- Lichtenthaler, H.K., "Verbreitung und reletive Konzentration der lipophilen Plastidenchinone in grunen Pflanzen". *Planta*, 81 (1968) 140.
- Lichtenthaler, H.K., "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes". *Methods Enzymol.*, 148 (1987) 350.
- Lichtenthaler, H.K. y Wellburn, A.R., "Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents". *Biochim. Soc. Trans.*, 603 (1983) 591.
- Livingston, A.L.; Knowles, R.E.; Nelson, J.W. y Kohler, G.O., "Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfalfa processing". *J. Agric. Food Chem.*, 16 (1968) 84.
- Lord, C.E.C. y Tirimanna, A.S.L., "A qualitative study of the carotenoid pigments of sri lanka chillies (*Capsicum annuum*)". *Mikrochim. Acta*, 1 (1976) 469.

- Lütke-Brinkhaus, F. y Kleinig, H., "Carotenoid and chlorophyll biosynthesis in isolated plastids from mustard seedling cotyledons (*Sinapsis alba* L.) during etioplast-chloroplast conversion". *Planta*, 170 (1987) 121.
- Lütke-Brinkhaus, F.; Liedvogel, B.; Kreuz, K. y Kleinig, H., "Phytoene synthase and phytoene dehydrogenase associated with envelope membranes from spinach chloroplasts". *Planta*, 156 (1982) 176.
- Lütz, C.; Roper, U.; Beer, N.S. y Griffiths, T., "Subetioplast localization of the enzyme NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase". *Eur. J. Biochem.*, 118 (1981) 347.
- Malchev, E.; Ioncheva, N.; Tanchev, S. y Kalpakchieva, K., "Quantitative changes in carotenoids during the storage of dried red pepper and red pepper powder". *Die Nahrung*, 26 (1982) 415.
- Mantoura, R.F.C. y Llewellyn, C.A., "The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography". *Anal. Chim. Acta*, 151 (1983) 297.
- Mathews-Roth, M.M., "Presence of carotenoids in the erythrocyte membranes of carotenemic and non-carotenemic individuals". *Clin. Chem.*, 21 (1975) 258.
- Mathews-Roth, M.M., "Carotenoids in the leukocytes of carotenemic and non-carotenemic individuals". *Clin. Chem.*, 24 (1978) 700.
- Mathews-Roth, M.M. y Gulbrandsen, C.L., "Transport of the beta-carotene in serum of individuals with carotenemia". *Clin. Chem.*, 20 (1974) 1578.
- Matsuno, T.; Tani, Y.; Maoka, T.; Matsuo, K. y Komori, T., "Isolation and structural elucidation of cucurbitaxanthin A and B from pumpkin *Cucurbita maxima*". *Phytochem.*, 25 (1986) 2837.
- Matus, Z.; Deli, J. y Szabolcs, J., "Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of β -cryptoxanthin 5,6-epoxide". *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1907.
- Mayer, H., *Planta*, 11 (1930) 294.
- McFeeters, R.F.; Chichester, C.O. y Whitaker, J.R., "Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima*". *Plant. Physiol.*, 47 (1971) 609.
- Meller, E.; Belkin, S. y Harel, E., "The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in greening maize leaves". *Phytochemistry*, 14 (1975) 2399.
- Milborrow, B.V., "Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis". En *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*, G. Britton y T.W. Goodwin (eds.), IUPAC, Pergamon Press, Oxford, (1982) 279.

- Minamide, T. y Ogata, K., "Lipids of fruits and their physiological and qualitative role III change in lipid contents and in ultrastructure of chloroplasts during colouring of tomato fruits". *J. Food Sci. and Technol.*, 19 (1972) 453.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Fernández Díez, M.J., "Pimiento rojo español maduro (*género Capsicum*). Relación entre pigmentos carotenoides rojos y amarillos". 32 (1981) 293.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Garrido Fernández, J. y Pereda Marín, J., "Pimiento pimentonero (*Capsicum annuum*). Relación entre pigmentos carotenoides rojos y amarillos". 35 (1984) 4.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J., "Eliminación de compuestos lipídicos durante la fase de extracción de pigmentos cloroplásticos en aceitunas. *Olea europaea*". *Grasas y Aceites* 36 (1985) 376.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J., "Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*, L.)". *J. Agric Food Chem.*, 37 (1989a) 1.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Garrido Fernández, J. y Gandul Rojas, B., "Pigment changes in olives during fermentation and brine storage". *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989b) 8.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Rejano Navarro, L.; Gandul Rojas, B.; Sánchez Gómez, A.H. y Garrido Fernández, J., "Color-pigment correlation in virgin olive oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991a) 332.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Jarén Galán, M.; Hornero Méndez, D.; Garrido Fernández, J.; Gallardo Guerrero, M.L. y Gandul Rojas, B., "Decoloration of vegetable oils and oleoresins with recovery of unaltered pigments". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991b) 809.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B.; Montaña Asquerino, A. y Garrido Fernández, J., "Determination of chlorophylls and carotenoides by HPLC during olive lactic fermentation". *J. Chromatogr.*, 585 (1991c) 259.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Jarén Galán, M. y Garrido Fernández, J., "Color quality in paprika". *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 2384.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B. y Gallardo Guerrero, L., "De-esterification of chlorophylls in olives by action of chlorophyllase". *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993a) 2254.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gallardo Guerrero, L. y Gandul Rojas, B., "Characterization and separation of oxidized derivatives of pheophorbides *a* and *b* by TLC and HPLC". *J. Chromatogr.*, 633 (1993b) 295.

- Mínguez Mosquera, M.I.; Jarén Galán, M. y Garrido Fernández, J., "Effect of processing of paprika on the main carotenenes and esterified xanthophylls present in the fresh fruit". *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993c) 2120.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gandul Rojas, B. y Gallardo Guerrero, L., "Chlorophyllase presence in olive fruit (*Olea europaea*). Measurement of activity". *J. Biochem.*, 116 (1994) 263.
- Moon, R.C., "Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer". *J. Nutr.*, 119 (1989) 127.
- Moran, R. y Porath, D., "Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide". *Plant. Physiol.*, 65 (1980) 478.
- Moss, G.P. y Weedon, B.C.L., "Chemistry of the carotenoids". En *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Vol. 1.T.W. Goodwin (Ed). Academic Press. London, New York y San Francisco (1976) 149.
- Moster, J.B. y Prater, A.N., "Color of Capsicum spices. I. Measurement of extractable color". *Food Technol.*, 6 (1952) 459.
- Nishiyama, Y.; Kitamura, M.; Tamura, S. y Watanabe, T., "Purification and substrate specificity of chlorophyllase from *Chlorella regularis*". *Chem. Lett.* (1994) 69.
- Noga, G. y Lenz, F., "Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Chromatographia*, 17 (1983) 139.
- Olson, J.A., "Biological actions of carotenoids". *J. Nutr.*, 119 (1989) 94.
- Ölze-Karow, H. y Mohr, H., "Control of chlorophyll *b* biosynthesis by phytochrome". *Photochem. Photobiol.*, 27 (1978) 189.
- Papastephanou, C.; Barnes, F.J.; Briedis, A.V. y Porter J.W., "Enzymatic synthesis of carotenenes by cell-free preparations of several genetic selections of tomatoes". *Arch. Biochem. Biophys.*, 157 (1973) 415.
- Pardo, A.D.; Chereskin, B.M.; Castelfranco, P.A.; Franceschi, V.R. y Wezelman, B.E., "ATP requirement for Mg chelatase in developing chloroplasts". *Plant Physiol.*, 65 (1980) 956.
- Parkes, K.E.B.; Pattenden, G.; Baranyai, M.; Molnar, P.; Szabolcs, J. y Toth, G., "Novel carotenoid 3,6-epoxides from red paprika (*Capsicum annuum*)". *Tetrahedron Lett.*, 27 (1986) 2535.
- Pavisá, A.Cs.; hajdu, F.; Hoschke, A.; Bodnar, J. y Biacs, P., "High-performance liquid-chromatographic control of standard specification of ground paprika". *Acta Aliment.*, 16 (1987) 129.

- Perkins, H.J. y Roberts, D.W.A., "Purification of chlorophylls, pheophytins and pheophorbides for specific activity determinations". *Biochim. Biophys. Acta* 58 (1962) 486.
- Peterson, P.D. y McKinney, H.H., "The influence of four mosaic diseases on the plastid pigments and chlorophyllase in tobacco leaves". *Phytopathology*, 28 (1938) 329.
- Petterson, A. y Jonsson, L., "Separation of *cis/trans* isomers of α - and β -carotene by adsorption HPLC and identification with diode array detection". Servicio de Publicaciones "Swedish Institute for Food Research", SIK, n° 833 (1989) Goteborg, Sweden.
- Philip, T. y Chen, T., "Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters by liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 113.
- Philip, T. y Francis, F.J., "Oxidation of capsanthin". *J. Food Sci.*, 36 (1971) 96.
- Philip, T.; Nawar, W.W. y Francis, F.J., "The nature of fatty acids and capsanthin esters in paprika". *J. Food Sci.*, 36 (1971) 98.
- Pitt, G.A.J., "Vitamin A". En *Carotenoids*, O. Isler (Ed.). Birkhäuser Verlag Basel. Stuttgart (1971) 717.
- Porra, R.; Klein, O.; Dornemann, D. y Senger, H., "A simple method for the rapid determination of 4,5-dioxovaleric acid in the presence of 2-oxoglutarate and other 2-oxocarboxylic acids". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361 (1980) 187.
- Porter, J.W. y Lincoln, R.E., "I. *Lycopersicon* selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes. II. The mechanism of carotene biosynthesis". *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 390.
- Purvis, A.C., "Sequence of chloroplast degreening in calamondin fruit as influence by ethylene and AgNO₃". *Plant Physiol.*, 66 (1980) 624.
- Purvis, A.C. y Barmore, C.R., "Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruits". *Plant Physiol.*, 68 (1981) 854.
- Radmer, R.J., "Study on the biosynthesis of chlorophyll in *Phaseolus vulgaris*". *M.Sc. Thesis*, University of Chicago, (1966).
- Radmer, R.J. y Bogorad, L., "(-)S-Adenosyl-L-methionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase, an enzyme in the biosynthetic pathway of chlorophyll in *Zea mays*". *Plant Physiol.*, 42 (1967) 463.
- Rahman, F.M.M. y Buckle, K.A., "Pigment changes in capsicum cultivars during maturation and ripening". *J. Food Technol.*, 15 (1980) 241.

- Rahmani, M. y Saari-Csallany, A., "Development of high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of chlorophyll in vegetable oils". *Rev. Fr. Corps. Gras*, 32 (1985) 257.
- Ramakrishnan, T.V. y Francis, F.J., "Color and carotenoid changes in heated paprika". *J. Food Sci.*, 38 (1973) 25.
- Ramaswamy, N.K. y Nair, P.M., " δ -Aminolevulinic acid synthetase from cold-stored potatoes". *Biochim. Biophys. Acta*, 293 (1973) 269.
- Ramaswamy, N.K. y Nair, P.M., "Temperature and light dependency of chlorophyll synthetase in potatoes". *Plant Sci. Lett*, 2 (1974) 249.
- Ramaswamy, N.K. y Nair, P.M., "Pathway for the biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in greening potatoes". *Indian J. Biochem. Biophys.*, 13 (1976) 394.
- Ramírez, D.A. y Tomes, M.L., "Relation between chlorophyll and carotenoid biosynthesis in dirty-red (green-flesh) mutant in tomato". *Botan. Gaz.*, 125 (1964) 221.
- Rebeiz, C.A.; Abou-Haidar, M.; Yaghi, M. y Castelfranco, P.A., "Porphyrin biosynthesis in cell-free homogenates from higher plants". *Plant Physiol.*, 46 (1970) 543.
- Rebeiz, C.A.; Bazzaz, M.B. y Belanger, F., "The separation of chlorophyll and pheophytins by reversed phase HPLC". *Chromatogr. Rev.*, 4 (1978) 2.
- Richter, M.L. y Rienits, K.G., "The synthesis of magnesium and zinc protoporphyrin IX and their monomethylester in etioplast preparations studied by high pressure liquid chromatography". *FEBS Lett.*, 116 (1980) 211
- Rodríguez, M.T.; González, M.P. y Linares, J.M., "Degradation of chlorophyll and chlorophyllase activity in senescing barley leaves". *J. Plant Physiol.*, 129 (1987) 369.
- Rüdiger, W., "Regulation of chlorophyll biosynthesis". En *Regulation of Chloroplast Differentiation*. Vol. 2, Akoyunoglu, C. y Senger, H. (Eds.), Alan R. Liss, New York (1986) 3.
- Rüdiger, W.; Hedden, P.; Köst, H.P. y Chapman, D.J., "Esterification of chlorophyllide by geranylgeranyl pyrophosphate in a cell-free system from maize shoots". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74 (1977) 1268.
- Rüdiger, W.; Benz, J. y Guthoff, C., "Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes". *Eur. J. Biochem.*, 109 (1980) 193.
- Sanger, J.E. "Quantitative investigations of leaf pigments from their inception in buds through autumn coloration to decomposition in falling leaves". *Ecology*, 52 (1971) 1075.

- Schanderl, S.H., Marsh, G.L. y Chichester, C.O., "Color reversion in processed vegetables. I. Studies on regreened pea puree". *J. Food Sci.*, 30 (1965) 312.
- Scheer, H. y Katz, J.J., "Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins". En *Porphyrins and Metalloporphyrins*, 2nd ed., K.M. Smith (Ed.), Elsevier, New York (1975) 399.
- Schick, G.A. y Bocian, D.F., "Resonance Raman studies of hydroporphyrins and chlorophylls". *Biochim. Biophys. Acta*, 895 (1987) 127.
- Schneider, H.A.W., "Changes in activity of four consecutive enzymes in the porphyrin and chlorophyll biosynthesis chain during development and illumination". *Z. Naturforsch.* 28C (1973) 45.
- Schoch, S., "The esterification of chlorophyllide *a* in greening bean leaves". *Z. Naturforsch.*, 33c (1978) 712.
- Schoch S. y Brown, J., "The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes". *J. Plant. Physiol.* 126 (1987) 483.
- Schoch, S. y Schäfer, W., "Tetrahydrogeranylgeraniol a precursor of phytol in the biosynthesis of chlorophyll *a*. Localization of the double bonds". *Z. Naturforsch.*, 33c (1978) 408.
- Schoch, S.; Lempert, U. y Rüdiger, W., "On the last steps of chlorophyll biosynthesis. Intermediates between chlorophyllide and phytol containing chlorophyll". *Z. Pflanzenphysiol.*, 83 (1977) 427.
- Schoch, S.; Lempert, U.; Wieschhoff, H. y Scheer, H., "High-performance liquid chromatography of tetrapyrrole pigments". *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 3567.
- Schwartz, S.J., "High performance liquid chromatography of zinc and copper pheophytins". *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 1673.
- Schwartz, S.J.; Woo, S.L. y von Elbe, J.H., "High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach". *J. Agric. Food Chem.*, 29 (1981) 533.
- Schwartz, S.J.; von Elbe, J.H. y Lindsay, R.C., "Influence of processing on the pigmentation of wild rice grain". *J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) 349.
- Segner, W.P., Ragusa, T.J., Nank, W.K., y Hoyle, W.C., "Process for the preservation of green color in canned vegetables". U.S. Patent No. 4,473,591, September 25, (1984).
- Sêsták, Z. "Paperchromatography of chloroplast pigments (chlorophylls and carotenoids). Part. 3". *Photosynthetica*, 14 (1980) 239.

- Shaw, E., "Chemical modification by active-site-directed reagents". En *The Enzymes*, P.D. Boyer (Ed.), Academic, New York (1970).
- Shimada, S. y Shimokawa, K., "Ethylene-activated chlorophyllase in *Satsuma mandarin* fruits". *J. Agric. Chem. Soc. Jap.*, 52 (1978) 489.
- Shimizu, S. y Tamaki, E., "Chlorophyllase of tobacco plants II. Enzymic phytylation of chlorophyllide and pheophorbide in vitro". *Arch. Biochem. Biophys.*, 102 (1963) 152.
- Shimokawa, K.; Shimada, S. y Yaeo, K., "Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of *Citrus Unshiu* marc". *Sci. Hort.*, 8 (1978) 129.
- Shioi, Y.; Fukae, R. y Sasa, T., "Chlorophyll analysis by high-performance liquid chromatography". *Biochim. Biophys. Acta.*, and 722 (1983) 72.
- Shioi, Y.; Michio, D. y Sasa, T., "Separation of non-esterified chlorophylls by ion-suppression high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 298 (1984) 141.
- Shuster, H.V. y Lockhart, E.E., "Development and application of objective methods for quality evaluation of spices. 1. Color grading of capsicums". *Food Res.*, 19 (1953) 472.
- Sievers, G. y Hynninen, P.H., "Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers". *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 359.
- Simpson, K.L., "Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A". *Proc. Nutr. Soc.*, 42 (1983) 7.
- Simpson, D.J.; Rahman, F.M.M.; Buckle, K.A. y Lee, T.H., "Chemical regulation of plastid development. II. Effect of CPTA [2-4(chlorophenylthio) ethyldiethylammonium chloride] on the ultrastructure and carotenoid composition of chromoplast of *Capsicum annuum* cultivars". *Australian J. Plant Physiol.*, 1 (1974) 135.
- Sironval, C., *Physiol. PLant.*, 7 (1954) 523.
- Smith, A.G., "Subcellular localization of two porphyrin-synthesis enzymes in *Pisum sativum* (pea) and *Arum* (cuckoo-pint) species". *Biochem. J.*, 249 (1988) 423.
- Smith, J.H.C. y Benítez, A., "Chlorophylls: analysis in plant materials". En *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 4, Paech, K. y Tracey, M.V. (Eds.), Springer-Verlag, New York, (1955) 142.
- Soll, I. y Schulz, G., "Phytol synthesis from geranylgeraniol in spinach chloroplasts". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99 (1981) 907.
- Soll, I.; Schulz, G., Rüdiger, W. y Benz, J., "Hydrogenation of geranylgeraniol. Two pathways exist in spinach chloroplasts". *Plant Physiol.*, 71 (1983) 849.

- Spurgeon, S.L. y Porter, J.W., "Biosynthesis of carotenoids". En *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, J.W. Porter y S.L. Spurgeon (eds.), Wiley, Chichester, (1983).
- Spurgeon, S.L.; Sathyamoorthy, N. y Porter, J.W., "Isopentyl pyrophosphate isomerase and prenyltransferase from tomato fruit plastids". *Arch. Biochem. Biophys.*, 230 (1984) 446.
- Stancher, B. y Zonta, F., "High-PLC determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in foods". *J. Chromatogr.*, 238 (1982) 217.
- Stobart, A.K., McLaren, I. y Thomas, D.R., "Chlorophylls and carotenoids of colourless callus, green callus and leaves of *Kalanchoe crenata*". *Phytochemistry*, 6 (1967) 1467.
- Strain, H.H., "Fat soluble chloroplast pigments: their identification and distribution in various Australian plants". En *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. I, T.W. Goodwin, ed. Academic Press, London, (1966) 387.
- Strain, H.H y Sherma, J., " Investigations of the chloroplast pigments of higher plants, green algae and brown algae and their influence upon the invention, modifications and applications of Tsweett's chromatographic method". *J. Chromatogr.*, 73 (1972) 371.
- Strain, H.H. y Svec, W.A., "Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls". En *The Chlorophylls*, L.P. Vernon, y G.R. Seely, (Eds.), Academic Press, New York (1966) 21.
- Strain, H.H. y Svec, W.A., "Some procedures for the chromatography of the fat-soluble chloroplast pigments". *Adv. Chromatogr.*, 8 (1969) 118.
- Strain, H.H.; Sherma, J. y Grandolfo, M., "Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents". *Anal. Chem.*, 39 (1967) 926.
- Sweeney, J.P. y Marsh, A.C., "HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables". *J. Food Sci.* 52 (1987) 669.
- Sweeney, J.P. y Martin, M.E., "Determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures". *Food Res.*, 23 (1958) 635.
- Sweeney, J.P. y Martin, M.E., "Stability of chlorophyll in vegetables as affected by pH". *Food Technol.*, 15 (1961) 263.
- Swirski, M.A.; Allouf, R.; Guimard, A. y Cheftel, H., "A water-soluble, stable green pigment, originating during processing of canned Brussels sprouts picked before the first autumn frosts". *J. Agric. Food Chem.*, 17 (1969) 799.
- Tan, C.T. y Francis, F.J., "Effect of processing temperature on pigments and color of spinach". *J. Food Sci.*, 27 (1962) 232.

- Terpstra, W. y Lambers, J.W.J., "Interactions between chlorophyllase, chlorophyll *a*, plants lipids and Mg²⁺". *Biochim. Biophys. Acta*, 746 (1983) 23.
- Torsi, G., Chiavari, G. y Lippolis, M.T., "Quantitation without calibration curves using HPLC with nondestructive detectors". *LC-GC INTL* 5 (1992) 37.
- Tsatsaronis, G.C. y Kehayoglou, A.H., "Fatty acid composition of Capsicum oils by gas liquid chromatography". *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 48 (1971) 365.
- Tsukida, K.; Saiki, K.; Takii, T. y Koyama, Y., "Separation and determination of cis/trans β -carotenes by HPLC". *J. Chromatogr.*, 245 (1982) 359.
- Tswett, M., "Adsorptionsanalyse und chromatographische Methoden, Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls". *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 24 (1906) 384.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S., "Carotenoids of lilies and red pepper: biogenesis of capsanthin and capsorubin". *Z. Pflanzenphysiol.*, 82 (1977) 407.
- Vecchi, M.; Englert, G.; Maurer, R. y Meduna, V., "Separation and characterization of the cis-isomers of β - β -carotene". *Helvetica Chim. Acta*, 64 (1981) 2746.
- Vernon, L.P. y Seely, G.R., (Eds.), *The Chlorophylls*. Academic Press, New York, (1966) 679.
- Vinkler, M. y Kizsel-Richter, M., "A thin-layer chromatographic method to determine the pigment content (component) in the pericarp of paprika". *Acta Alimentaria*, 1 (1972) 41.
- von Elbe, J.H.; Huang, A.S.; Attoe, E.L. y Nank, W.K., "Pigment composition and color of conventional and Veri-Green[®] canned beans". *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 52.
- Wackenroder, H., "Über das oleum radicis dauci aetherum, das carotin, den carotenzucker und den officiellen sucus dauci; sowie auch über das mannit welches in dem möhrensaft durch eine besondere Art der Gährung gebildet wird". *Mag. Pharm. (Geiger)*, 33 (1831) 144.
- Wallace, T.H.M., "The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms". *Stationery Office*, London (1961).
- Wang, C., "Physiology of ripening in pears". *Food Sci. Tech. Abs.*, 7J722 (1970).
- Wang, W.Y., "Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*". *Internatl. Rev. Cytol.*, 8 (1978) 335.

- Wang, W.Y.; Gough, S.P. y Kannangara, C.G., "Biosynthesis of δ -aminolevulinate in greening barley leaves. IV. Isolation of three soluble enzymes required for the conversion of glutamate to δ -aminolevulinate". *Carlsberg Res. Commun.*, 46 (1981) 243.
- Watanabe, T.; Hongu, A.; Honda, K.; Nakazato, M.; Konno, M. y Saithoh, S., "Preparation of chlorophylls and pheophytins by isocratic liquid chromatography". *Anal. Chem.*, 56 (1984) 251.
- Weast, C.A. y McKinney, G., "Chlorophyllase". *J. Biol. Chem.*, 133 (1940) 551.
- Weedon, B.C.L., "Carotenoids: recent advances". *Chem. Br.*, 3 (1967) 424.
- Weedon, B.C.L. *Occurrence in Carotenoids*, (Isler O. ed.) Birkhäuser Verlag, Basel, 1971.
- Weinstein, J.D.; Mayer, S.M. y Beale, S.I., "Formation of δ -aminolevulinic acid from glutamic acid in algal extracts. Separation into an RNA and three required enzyme components by serial affinity chromatography". *Plant Physiol.*, 84 (1987) 224.
- Wellburn, A.R., "Studies on the esterification of chlorophyllides". *Phytochem.*, 9 (1970) 2311.
- White, R.C.; Jones, I.D. y Gibbs, E., "Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in plant material". *J. Food Sci.*, 28 (1963) 431.
- Williams, R.J.H.; Britton, G.; Charlton, J.M. y Goodwin, T.W., "The stereospecific biosynthesis of phytoene and polyunsaturated carotenes". *Biochem. J.*, 104 (1967) 767.
- Wider de Xifra, E.A.; Battle, A.M. del C. y Tigier, H.A., " δ -Aminolevulinate synthetase in extracts of cultured soybean cells". *Biochim. Biophys. Acta*, 235 (1971) 511.
- Willstatter, R. y Stoll, A., *Investigations on Chlorophyll*, (transl. by Schertz, F.M. and Merz, R.A.). The Science Press Printing, Lancaster, PA (1928) 385.
- Willstatter, R. y Stoll, A., "*Untersuchungen uber Chlorophyll*", Springer, Berlin, (1910).
- Wintermans, J.F.G.M. y de Mots, A., "Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol". *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 448.
- Wong Y.S. y Castelfranco, P.A., "Resolution and reconstitution of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, the enzyme system responsible for the chlorophyll isocyclic ring". *Plant Physiol.*, 75 (1984) 658.

- Wright, S.W. y Shearer, J.D., "Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton". *J. Chromatogr.*, 294 (1984) 281.
- Yamamoto, H.Y.; Chichester, C.O. y Nakayama, T.O.M., "Biosynthetic origin of oxygen in the leaf of xanthophylls". *Arch. Biochem. Biophys.*, 96 (1962) 645.
- Yamauchi, N.; Hamaguchi, S. y Ogata, K., "Physiological and chemical studies on ascorbic acid of fruits and vegetables. VII. Mechanism of chlorophyll degradation and action of ascorbic acid in the inhibition of yellowing in harvested parsley leaves". *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 49 (1980) 414.
- Yokoyama, H.; Coggins, C.W. y Henning, G.L., "The effect of CPTA on the formation of carotenoids in citrus". *Phytochem.*, 10 (1971) 1831.
- Yokoyama, H.; Debenedict, C.; Coggins, C.W. y Henning, G.L., "Induced color changes in grape fruit and orange". *Phytochem.*, 11 (1972) 1721.
- Yoshimune, N.; Hitoshi, H.; Kazuki, F. y Hidenari, I., "Preparation and determination of cobalt (II) chlorophylls by high-performance liquid chromatography". *Anal. Sci.*, 10 (1994) 117.
- Yoshiura, M.; Iriyama, K. y Shiraki, M., "High-performance liquid chromatography of chlorophylls and some of their derivatives". *Chem. Lett.*, (1978) 281.
- Zechmeister, L. y Cholnoky, L., "Paprika coloring matters. I.". *Ann. Chem.*, 454 (1927) 54.
- Zechmeister, L. y Cholnoky, L., "VII. Absorptions analysed des pigments". *Justus Liebigs Analn. Chem.*, 509 (1934) 269.
- Ziegler, R.G.; Blaeta, A.; Guha, N. y Schönegege, B., "Enzymatic formation of pheophorbide and pyropheophorbide during chlorophyll degradation in a mutant of *Chlorella fusca*". *J. Plant Physiol.* 132 (1988) 327.
- Zonneveld, H.; Klop, W. y Gorin, N., "Analysis of unboiled and boiled beans for chlorophylls and pheophytins by thin-layer chromatography and fluorimetry comparison with spectrometry". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 178 (1984) 20.

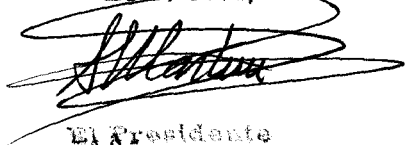
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal en el día de hoy, por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar el Tesis Doctoral de

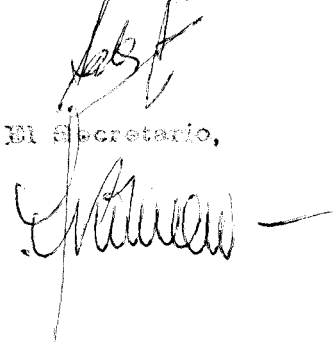
D. Dámaso Hornero Méndez
sobre Cambios en la composición de pigmentos en frutos de
Capsicum annuum, durante la maduración y procesamiento
para pimentón, variedades Oca y Agridulce.
acordó otorgarle la calificación de apto "cum laude"

Sevilla, tres de Febrero 1995

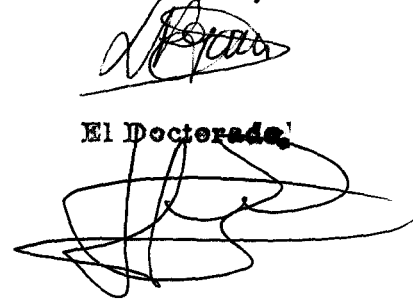
El Vocal,



El Vocal,



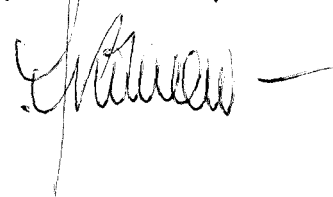
El Vocal,



El Presidente



El Secretario,



El Doctorado,

