

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

*"Oxidación de pigmentos carotenoides
en función de su estructura y entorno lipídico."*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio... 147... número... 243... del libro
correspondiente. 25 MAYO 2000
Sevilla,

El Jefe del Negociado.

Fdo./ Antonio Pérez Gálvez

1313926

FACULTAD DE QUÍMICA

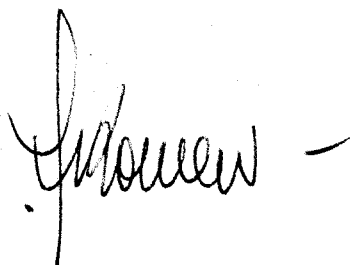
X
746

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

*"Oxidación de pigmentos carotenoides
en función de su estructura y entorno lipídico."*

Memoria presentada por el licenciado ANTONIO PÉREZ GÁLVEZ
para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

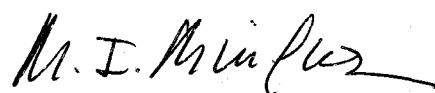
V° B°
el tutor



Fdo./ Dr. D. Fernando Romero Guzmán

Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química

V° B°
el director



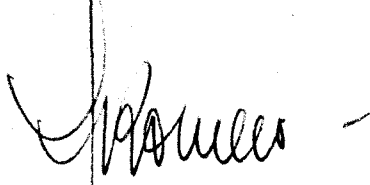
Fdo./Dra. Dña. M^a Isabel Mínguez Mosquera

Investigador Principal del Consejo Superior de Investigaciones
Científicas

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Investigación "Química y Bioquímica de Pigmentos" (P.A.I. AGR 148), del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, dentro del Programa Interdepartamental "Tecnología de Alimentos", del que es responsable académico el Departamento de Ingeniería Química, el cual, de conformidad con el procedimiento establecido por su Consejo, ha autorizado en el día de hoy su presentación

Sevilla, 11 de Mayo de 2000

EL COORDINADOR DEL PROGRAMA



Fdo. Fernando Romero Guzmán

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



Fdo. Antonio Guerrero Conejo

A Inma, mi prometida.

A mis padres, que me dieron la vida.

Sagrado Corazón de Jesús en Vos confío.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. D. Fernando Romero Guzmán, tutor de esta tesis por sus oportunas indicaciones y sugerencias en la elaboración y corrección del manuscrito.

A la Dra. Dña. M^a Isabel Mínguez Mosquera, Investigador Principal del CSIC y director de esta tesis por su estricta dedicación al trabajo de investigación y por el cariño y confianza que siempre ha tenido conmigo.

Al Dr. D. Juan Garrido Fernández, Científico Titular del CSIC por su trabajo diario en las labores de mi formación, no sólo a nivel profesional sino también personal.

A la Dra. Dña. Beatriz Gandul Rojas, Científico Titular del CSIC por ser ejemplo para todos de que la constancia y dedicación al trabajo permiten alcanzar todas las metas.

Al Dr. D. Manuel Jarén Galán, Científico Titular interino del CSIC, por mostrarme siempre su buen ánimo para participar y colaborar en diversos trabajos en el estudio de pigmentos carotenoides.

Al Dr. D. Dámaso Hornero Méndez, Investigador Contratado del CSIC, mi compañero y amigo, que me ha permitido compartir muchas de sus aficiones como la informática y su pasión por el estudio de los pigmentos carotenoides.

A la Dra. Dña. Lourdes Gallardo Guerrero, Investigador Contratado del CSIC porque su magnífico curriculum es sólo una muestra de su trabajo y esfuerzo diario, digno de las mejores recompensas.

A la Lda. Dña. María Roca López-Cepero, Becaria (F.P.I.) del Ministerio de Educación y Ciencia por compartir conmigo una dura carrera de formación en la que finalmente todo llega.

A Dña. Mercedes Bodineau Bada, Ayudante Diplomado de Investigación del CSIC por la excelente colaboración prestada en el laboratorio y su especial cariño hacia mi persona.

A todo el Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa y en especial a su Director, Dr. D. Antonio Garrido Fernández, Profesor de Investigación del CSIC.

A la empresa EVESA y especialmente a D. Tomás Pérez-Matheos por el suministro de muestras de oleorresinas y su colaboración desinteresada.

A los Dres. D. Vicente Montero de Espinosa y Tena y Dña. Mercedes Lozano Ruiz por su inestimable colaboración en el suministro de muestras de pimiento.

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
I. CAROTENOIDES: GENERALIDADES	8
1.- <i>Presencia y distribución de pigmentos carotenoides</i>	8
2.- <i>Biosíntesis de pigmentos carotenoides</i>	10
3.- <i>Conformación espacial</i>	17
- <i>La cadena polienoica</i>	20
- <i>Estereoquímica</i>	20
4.- <i>Propiedades químicas y función</i>	21
- <i>Solubilidad</i>	21
- <i>Absorción de la luz y funciones fotoquímicas</i>	21
- <i>Carotenoides con actividad de provitamina A</i>	22
- <i>Carotenoides como antioxidantes. Procesos de peroxidación lipídica</i>	22
- <i>Efecto de los procesos de peroxidación lipídica en sistemas biológicos</i>	26
II. MECANISMOS DE REACCIÓN EN LOS PROCESOS OXIDATIVOS DE PIGMENTOS CAROTENOIDES	27
1.- <i>Reacciones de β-caroteno con radicales peroxilo</i>	27
- <i>Mecanismo de adición</i>	27
- <i>Otros mecanismos de reacción</i>	30
2.- <i>Oxidación de β-caroteno por oxígeno singulete</i>	32
3.- <i>Oxidación de pigmentos carotenoides con otras características estructurales</i>	32
III. PIGMENTOS CAROTENOIDES EN EL FRUTO DEL PIMIENTO ROJO	38
1.- <i>Fabricación del pimentón</i>	39
2.- <i>Factores que modifican la estabilidad de pigmentos carotenoides en el pimentón</i>	41
- <i>Oxidación por oxígeno molecular</i>	41
- <i>Oxidación lumínica</i>	42
- <i>Oxidación térmica</i>	43
- <i>Adición de antioxidantes para aumentar la estabilidad de pigmentos carotenoides en el pimentón</i>	44
3.- <i>Oleorresina de pimentón</i>	45
- <i>Fabricación de la oleorresina de pimentón</i>	46

- <i>Estabilidad de pigmentos carotenoides en oleorresinas de pimentón.</i>	50
EXPERIMENTAL	51
I. MATERIA PRIMA.	52
II. MÉTODOS.	54
1.- <i>Análisis de la composición en pigmentos carotenoides.</i>	54
- <i>Extracción.</i>	54
- <i>Desesterificación.</i>	54
- <i>Separación y cuantificación de pigmentos carotenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</i>	55
2.- <i>Obtención de patrones.</i>	55
- <i>Preparación del extracto.</i>	55
- <i>Cromatografía en capa fina (TLC).</i>	58
- <i>Cuantificación espectrofotométrica de la disolución patrón de pigmento.</i>	59
III. PLANTEAMIENTO DE LAS EXPERIENCIAS.	60
1.- <i>Oxidación de pigmentos carotenoides en forma libre o esterificada. Evaluación de su capacidad antioxidante.</i>	60
2.- <i>Influencia del sustrato lipídico en la velocidad de oxidación de pigmentos carotenoides. Condiciones experimentales.</i>	62
3.- <i>Influencia de la temperatura sobre la velocidad de oxidación de pigmentos carotenoides. Condiciones experimentales.</i>	65
4.- <i>Lista de aparatos utilizados.</i>	67
IV. ESTUDIO DE DATOS.	69
1.- <i>Determinación de la cinética de reacción.</i>	70
2.- <i>Estudio termodinámico de la oxidación de pigmentos carotenoides.</i>	71
3.- <i>Análisis estadístico de los resultados.</i>	71
- <i>Modelos cinéticos.</i>	71
- <i>Comparación entre constantes cinéticas.</i>	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	73
I. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES Y SU VELOCIDAD DE OXIDACIÓN.	74
1.- <i>Oxidación de pigmentos carotenoides en su forma libre. Evaluación de su capacidad antioxidante.</i>	75

2.- Oxidación de pigmentos carotenoides en su forma esterificada. Evaluación de su capacidad antioxidante	83
II. EFECTO DEL ENTORNO LIPÍDICO EN LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.	86
1.- <i>Sustrato lipídico poliinsaturado.</i>	89
- <i>Velocidad de oxidación según fracciones isocrómicas de pigmentos. Estudio cinético.</i>	89
- <i>Velocidad de oxidación de pigmentos individuales. Estudio cinético.</i>	103
2.- <i>Sustrato lipídico monoinsaturado.</i>	116
- <i>Velocidad de oxidación según fracciones isocrómicas de pigmentos. Estudio cinético.</i>	116
- <i>Velocidad de oxidación de pigmentos individuales. Estudio cinético.</i>	123
3.- <i>Estudio comparativo de la velocidad de oxidación carotenoides en ambos sustratos lipídicos.</i>	131
III. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN CAROTENOIDE.	139
1.- <i>Estudio cinético.</i>	140
2.- <i>Estudio termodinámico.</i>	146
CONCLUSIONES.	152
BIBLIOGRAFÍA.	154

Las características estructurales de los pigmentos carotenoides derivan en una serie de atractivas propiedades, entre las cuales destaca su color, motivo por el que aquellas plantas o frutos que los contienen en una cantidad abundante, se emplean como materia prima para la obtención de concentrados de pigmentos. En concreto los derivados industriales del fruto del pimiento (*Capsicum annuum* L.), pimentón y oleorresinas, son muy utilizados en la industria alimentaria para aportar color o corregirlo. El procesado artesanal del pimiento para pimentón le proporciona otras cualidades organolépticas (aroma y sabor) muy apreciadas por el consumidor y la industria cárnica, por lo que también se utiliza como aditivo alimentario.

El fruto del pimiento presenta una amplia composición carotenoide, cualitativa y cuantitativa, aunque la estructura de todos los pigmentos mantiene la cadena carbonada polienoica central y dos anillos en los extremos. Las diferentes combinaciones entre el tipo de anillo (β , κ) y grupos funcionales (hidroxilo, ceto, epóxido) hace posible la presencia en el perfil carotenoide del pimiento de pigmentos muy comunes, como β -caroteno, y otros como capsanteno y capsorrubeno que sólo se sintetizan en el género *capsicum*. A pesar de esta diversidad, la composición carotenoide del pimiento se puede dividir en dos fracciones atendiendo al color que presentan en el espectro visible, rojo o amarillo. Esta distinción en fracciones isocrómicas, implica además una distinción estructural importante puesto que los pigmentos que componen la fracción roja, capsanteno y capsorrubeno, presentan uno o dos anillos tipo κ y uno o dos grupos ceto. Sin embargo el resto de carotenoides, que componen la fracción amarilla, no poseen ninguna de estas características estructurales.

Las reacciones de oxidación de pigmentos carotenoides, que pueden tener su origen en diversos factores, tienen un efecto inmediato en la capacidad colorante de la materia que los contiene, puesto que implican la interrupción del sistema de dobles enlaces de la cadena carbonada central y consecuentemente la pérdida paulatina de su color. La oxidación continuada puede provocar incluso la ruptura de la molécula de pigmento. Según estudios previos, la división según color y estructura de la composición carotenoide del pimiento, marca diferencias en cuanto a su estabilidad frente a reacciones oxidativas. El perfil carotenoide del pimiento no se degrada homogéneamente sino que los pigmentos de la fracción roja son más estables que los que componen la fracción isocrómica amarilla.



Puesto que la valoración comercial del pimentón y oleorresinas se realiza en base a su capacidad colorante, se han llevado a cabo numerosos estudios para minimizar las reacciones de oxidación, centrados principalmente en las condiciones de procesado y conservación (temperatura y humedad) que puedan ralentizar la degradación carotenoides, y en la adición de sustancias antioxidantes, como tocoferoles y ácido ascórbico, para proteger con su acción a los pigmentos carotenoides.

Pero a pesar de que se establezcan condiciones de procesado y conservación del producto más o menos favorables para su estabilidad, o que se adicionen antioxidantes, las sustancias que promueven las reacciones de oxidación de pigmentos siguen estando presentes, puesto que forman parte del sustrato en el que se encuentran inmersos los carotenoides. Las semillas del fruto, incluidas durante el proceso de molienda para la obtención de pimentón conforman un sustrato lipídico mayoritariamente compuesto por ácido linoleico, propenso a la oxidación incluso a temperatura ambiente. Las reacciones de peroxidación de ácidos grasos generan radicales peroxilo que oxidan a los carotenoides provocando la consecuente pérdida en la capacidad colorante. La temperatura es un factor adicional a controlar, puesto que acelera los procesos oxidativos, máxime debido a la naturaleza poliinsaturada del entorno lipídico en el que se encuentran los carotenoides.

Gracias a los estudios de oxidación de pigmentos carotenoides, se ha puesto de manifiesto que éstos son capaces de inhibir la peroxidación lipídica, lo que añade la capacidad antioxidante a las propiedades de estas sustancias. Las experiencias encaminadas a la determinación de dicha capacidad se han centrado en β -caroteno y otras xantofilas como cantaxanteno y astaxanteno con grupos cetónicos situados en los grupos cíclicos de los extremos de la cadena polienoica. β -caroteno, manifiesta un doble papel antioxidante y prooxidante, éste último a través de determinados mecanismos, por los que se generan especies radicalarias que merman su potencial acción antioxidante. La presencia de los grupos cetónicos mejora su capacidad antioxidante, ya que la inhibición de la peroxidación lipídica tiene lugar sin reacciones que provoquen efecto prooxidante. Las características estructurales condicionan por tanto las propiedades que ejercen estas sustancias.

En los frutos del género *capsicum* se sintetiza una amplia diversidad de pigmentos carotenoides entre los que destacan las xantofilas capsanteno y capsorrubeno, de características estructurales singulares, lo que convierte al fruto del pimiento en una interesante materia de estudio desde diversos puntos de vista, pero principalmente relacionados con las reacciones oxidativas de la fracción carotenoides. Estas reacciones oxidativas son manifestación de la capacidad antioxidante de estos pigmentos. Los estudios sobre la acción antioxidante de β -caroteno ponen de manifiesto que está mermada por procesos autooxidativos que tienen lugar durante el desarrollo de dicha acción por lo que esta línea de investigación empezó a incluir pigmentos cuya estructura no generara procesos autooxidativos, aunque ello también supuso considerar aquellos que no tienen actividad de provitamina A.

El hecho de que los trabajos publicados hasta la fecha se hayan centrado en el estudio de las xantofilas cetónicas, astaxanteno y cantaxanteno, convierte a capsorrubeno y capsanteno en atractivo objeto de estudio y evaluación de dicha capacidad. El proceso de esterificación de las xantofilas por ácidos grasos añade una singularidad más a la estructura de los pigmentos carotenoides presentes en el fruto del pimiento, y además no se ha evaluado la capacidad antioxidante de carotenoides en forma esterificada.

Por otro lado, puesto que la cotización comercial de un pimentón o de una oleorresina se basa en su capacidad colorante, resulta importante estudiar cómo las reacciones oxidativas degradan al perfil carotenoides del producto, y las causas que promueven dichas reacciones. El entorno lipídico en el que los carotenoides se encuentran inmersos puede ejercer *a priori* un doble efecto. De protección por la presencia de antioxidantes naturales, y oxidativo por su naturaleza poliinsaturada. Precisamente un cambio en el grado de insaturación del sustrato lipídico habitual del pimentón puede ser la clave para mejorar la estabilidad de los pigmentos carotenoides presentes en dicho sustrato.

El procesado de ambos productos implica en algunas etapas, el uso de temperaturas más o menos drásticas, que puede provocar la degradación de la fracción carotenoides. Frente al patrón establecido de estabilidad, xantofilas rojas más estables que las amarillas, cabe preguntarse si la diferencia en estabilidad se incrementa también con la temperatura.

Por todo ello en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos.

Objetivo 1.- Estudio de la reacción de oxidación de pigmentos carotenoides en forma libre o esterificada.

Objetivo 2.- Influencia del entorno lipídico en la velocidad de oxidación carotenoides.

Objetivo 3.- Influencia de la temperatura en la oxidación de las fracciones isocrómicas roja y amarilla.



I. CAROTENOIDES: GENERALIDADES.

1.- Presencia y distribución de pigmentos carotenoides.

De todos los pigmentos naturales, los carotenoides son los más ampliamente distribuidos y por el conjunto de funciones y acciones que realizan, los más importantes. Este grupo de compuestos, hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas), son esenciales en la fotosíntesis oxigénica y también están implicados en la prevención o protección contra enfermedades coronarias y cáncer (Ames, 1983; Malone, 1991; Britton, 1995). Estas funciones no resultan tan obvias como sus colores, por los cuales los carotenoides son tan llamativos. El rango de colores de estos pigmentos va desde el rojo hasta el amarillo, y cuando se complejan con proteínas producen coloraciones verdes y azules. De esta forma una gran variedad de organismos debe su color principalmente a los carotenoides. Se pueden encontrar en todos los filos tanto del reino vegetal como animal aunque son únicamente sintetizados *de novo* en las plantas superiores y por organismos procariotas. La presencia de carotenoides en los animales se debe a su incorporación por la dieta, hecho de especial trascendencia si se tiene en cuenta que algunos carotenoides muestran actividad de provitamina A (Pfander, 1992).

A pesar de su amplia distribución, y de que se han descrito hasta 600 pigmentos carotenoides diferentes, lo normal es encontrar una mezcla común, más o menos compleja, de algunos de ellos. En los cloroplastos de las plantas superiores, la mezcla de pigmentos estaría formada generalmente, por α - y β -caroteno, β -criptoxanteno, luteína, zeaxanteno, violaxanteno y neoxanteno. Algunos pigmentos menos frecuentes como rodoxanteno, y semi- β -carotenona se han descrito en los cloroplastos de las hojas de algunos miembros de las cuprasáceas y taxáceas (Goodwin y Britton, 1988).

Se encuentran también en diversos frutos, siendo los responsables de su color, con un perfil carotenoide bastante variable. El tomate, (*Lycopersicon esculentum* L.) debe su color rojo a licopeno que constituye el 90% de su composición total en carotenoides. El pimiento (*Capsicum annuum* L.) contiene una mezcla más compleja siendo capsanteno el pigmento mayoritario. La piña (*Ananas comosus* L.) contiene hasta 21 pigmentos incluyendo isómeros, con violaxanteno, luteoxanteno neoxanteno y β -caroteno como pigmentos mayoritarios. La naranja (*Citrus sinensis* L.) también tiene un amplio perfil carotenoide con luteoxanteno y auroxanteno como pigmentos más representativos (Gross, 1987). En los tejidos reproductivos de las plantas

superiores es posible encontrar pigmentos carotenoides muy específicos como lilixanteno en especies de lirio, o crocetina en especies de crocus. Hasta 40 pigmentos se han encontrado en los pétalos de flores, muchas veces en forma de isómeros *cis*. Eschscholxanteno es un ejemplo de un carotenoide específico, en este caso de la amapola californiana.

Al contrario de lo que sucede en los cloroplastos de las plantas superiores, en los de las algas se presentan en mezclas complejas, que tienden a ser características de cada clase. La excepción es la clase Clorofita, cuyos miembros tienden a acumular los mismos pigmentos que las plantas superiores pero con la inclusión de algunos muy específicos como el sifonaxanteno presente en muchas caulerpalas.

Los carotenoides sintetizados por bacterias fotosintéticas se caracterizan por ser acíclicos con grupos hidroxilo terciarios frecuentemente metilados en las posiciones C1 y C1', como por ejemplo el espirilloxanteno. En el caso de las bacterias no fotosintéticas la aparición de carotenoides es esporádica destacando la síntesis de carotenoides con más de 40 carbonos en flavobacterias y de menos de 40 en algunos estafilococos. En los hongos, la síntesis de pigmentos suele ser muy caprichosa, aunque se destaca ficomicetes por la síntesis predominante de β -caroteno. No es habitual la presencia de las xantofilas sintetizadas por las plantas superiores (Goodwin, 1992).

En los animales, como se ha comentado anteriormente, es posible encontrar carotenoides, procedentes de la dieta. Existen tanto en forma inalterada, como oxidados o reducidos. Hasta hace poco la ruta oxidativa era la única que explicaba la amplia distribución de carotenoides oxigenados en animales marinos. Sin embargo es posible que en pescado, pollo y otros, pigmentos como astaxanteno y cantaxanteno puedan ser reducidos vía derivados hidroxilados a β -caroteno. Esta hipótesis explicaría cómo obtienen los animales marinos una fuente de vitamina A, pues acumulan grandes cantidades de ceto-carotenoides (que no tienen actividad de provitamina A) pero no β -caroteno como tal, que sí es precursor de vitamina A. La asociación de pigmentos carotenoides y proteínas origina el color azul oscuro del caparazón del cangrejo y el rojo de los huevos de pomácea. Los pigmentos verdes del exoesqueleto del cangrejo de río turco son resultado de la coexistencia de carotenoproteínas verdes y amarillas. La coloración de las plumas de diversos pájaros como el flamenco, el verderón, el jilguero, se debe a la presencia de pigmentos carotenoides (Stradi y colaboradores, 1995).

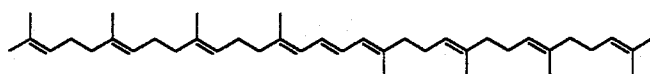
En el plasma humano se ha descrito la presencia de licopeno, α - y β -caroteno, astaxanteno y cantaxanteno (Krinsky y colaboradores, 1958; Ohmacht y colaboradores, 1987). Luteína y zeaxanteno son los pigmentos mayoritarios en la retina del ojo humano (Handelman y colaboradores, 1988).

2.- Biosíntesis de pigmentos carotenoides.

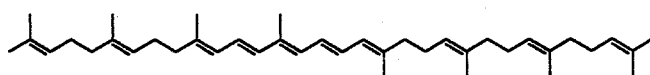
Tanto el color, como las funciones biológicas que desempeñan los pigmentos carotenoides, derivan de sus propiedades físico-químicas y éstas a su vez de la estructura de estos compuestos. Las características estructurales se generan mediante la ruta anabólica, común en sus primeras etapas a la de todos los derivados isoprenoides (terpenos, quinonas, esteroides, ceras, gomas y así hasta más de 20.000 compuestos) que utiliza como unidad básica a isopentenil pirofosfato (Bach, 1995). El sucesivo ensamblamiento de esta unidad da lugar a geranyl pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato. La unión de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato para dar lugar a fitoeno, en un proceso que consta de dos etapas, constituye el primer paso específico en la biosíntesis de carotenoides (Cunningham y Gantt, 1998).

Posteriormente, tras una serie de desaturaciones por las que la longitud del sistema conjugado de dobles enlace aumenta, se genera fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno y licopeno (Sandmann, 1994). En la Figura 1 se muestra la estructura de los carotenos lineales mencionados. La formación de carotenos con grupos cíclicos (Figura 2) se realiza a partir de licopeno aunque no exclusivamente puesto que neurosporeno también sirve de sustrato a los enzimas ciclasas en contadas ocasiones (Takaichi y colaboradores, 1996). La ciclación se produce en los extremos de la cadena, implicando a los primeros 8 carbonos de cada extremo.

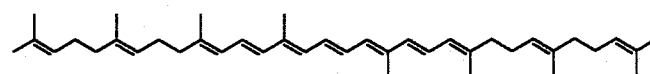
Son dos los tipos de anillo a los que este proceso puede dar lugar, tipo β , y tipo ϵ , en función de qué ciclasa, licopeno- β -ciclasa o licopeno- ϵ -ciclasa intervenga. En el primer caso, la doble ciclación de licopeno daría lugar a β -caroteno, mientras que en el segundo caso se sintetizaría ϵ -caroteno. La lechuga es el único vegetal que acumula un carotenoide con dos anillos tipo ϵ : lactucaxanteno (Siefertmann-Harms y colaboradores, 1981). En el caso en que intervengan ambas enzimas, el producto final es α -caroteno, precursor de luteína, pigmento mayoritario en los tejidos fotosintéticos de muchas plantas y algas. Si la ruta hasta la formación de α -caroteno, se inicia por la ciclación tipo β y tipo ϵ después, o viceversa, no ha sido determinado aún.



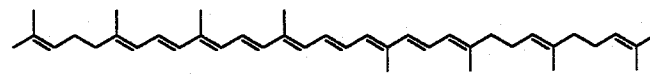
fitoeno



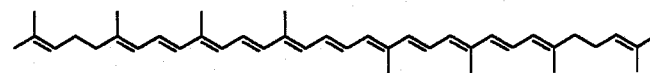
fitoflueno



ζ-caroteno

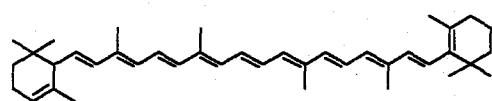


neurosporeno

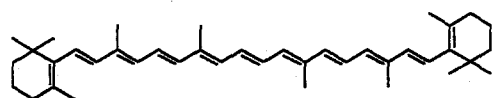


licopeno

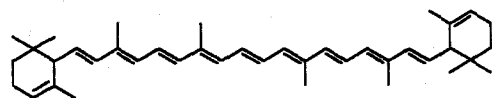
Figura 1.- Carotenos acíclicos.



α -caroteno



β -caroteno



ϵ -caroteno

Figura 2.- Carotenos con grupos cíclicos.

A partir de los carotenos bicíclicos se producen, por inserción de oxígeno, las xantofilas que pueden contener grupos hidroxilo, ceto y epóxidos en su estructura y que son los carotenoides de presencia mayoritaria en los tilacoides de las plantas. La hidroxilación en el carbono 3 de cada anillo de los hidrocarburos β -caroteno, α -caroteno, daría lugar a zeaxanteno y luteína respectivamente. Los enzimas responsables de este proceso son dos hidroxilasas específicas para cada tipo de anillo, β -hidroxilasa, y ϵ -hidroxilasa (Britton, 1990). También es posible la hidroxilación en uno sólo de los anillos, por ejemplo a partir de β -caroteno para dar lugar a β -criptoxanteno.

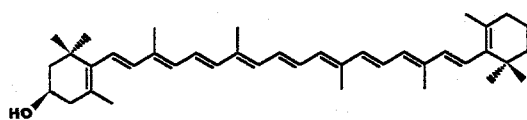
La estructura de estas xantofilas hidroxiladas y algunas mencionadas anteriormente (eschscholxanteno y lactucaxanteno) se representa en la Figura 3.

Los carotenoides con grupos ceto en el carbono 4 de uno o ambos anillos son generados por el enzima β -C-4-oxigenasa. De esta forma y a partir de β -caroteno, la adición de uno o dos grupos ceto genera equinenona y cantaxanteno respectivamente. Resulta interesante destacar que la formación de carotenoides con grupos ceto e hidroxilo en los anillos se produce primero por la acción de la β -C-4-oxigenasa y posteriormente por la acción de la hidroxilasa, ya que la primera no puede utilizar como sustrato a un carotenoide ya hidroxilado, sino al correspondiente hidrocarburo, como lo demuestra la formación de astaxanteno, un carotenoide diceto y dihidroxilado con anillos tipo β , sintetizado en bacterias y hongos (Lotan y Hirschberg, 1995).

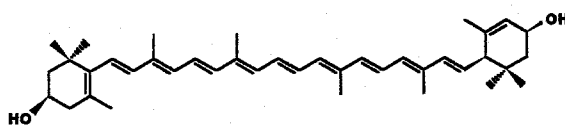
La inclusión de grupos epóxidos se realiza por la acción de enzimas como zeaxanteno-epoxidasa, que da lugar a violaxanteno vía anteraxanteno. Los anillos 3-hidroxi- β de zeaxanteno y anteraxanteno son sustratos de dicho enzima pero no así el mismo grupo presente en luteína (Bouvier y colaboradores, 1996).

Se cree que estos pigmentos epoxidados, particularmente violaxanteno y neoxanteno, son los precursores biosintéticos del ácido abscísico, un regulador del crecimiento de la planta, por la caracterización de un enzima que lleva a cabo el primer paso de la conversión de epoxicarotenoides en ácido abscísico (Zeevaart y Creelman, 1988).

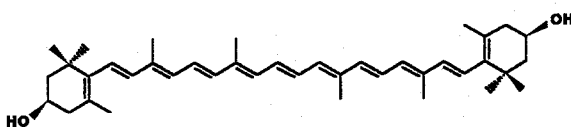
En las Figuras 4, 5 y 6 se muestra la estructura de carotenoides con grupos cetónicos, cetónicos e hidroxilados y xantofilas hidroxiladas con grupos epóxidos respectivamente.



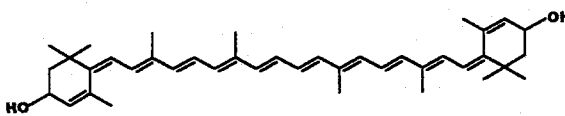
β -criptoxanteno



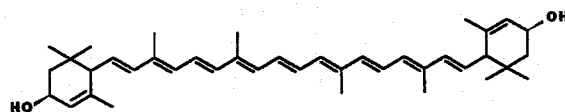
luteína



zeaxanteno



eschscholxanteno



lactucaxanteno

Figura 3.- Xantofilas hidroxiladas.

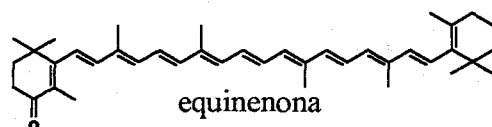
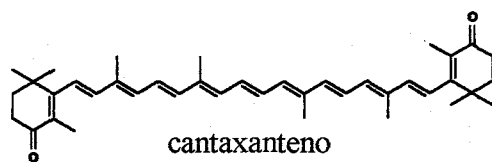
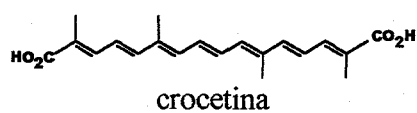
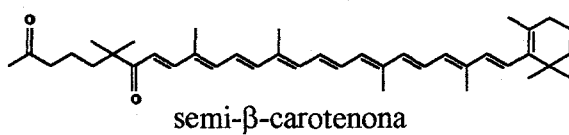
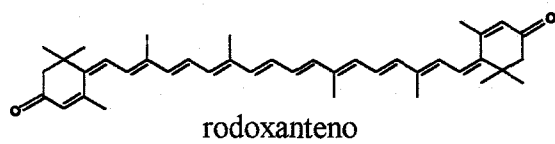


Figura 4.- Cetocarotenoides.

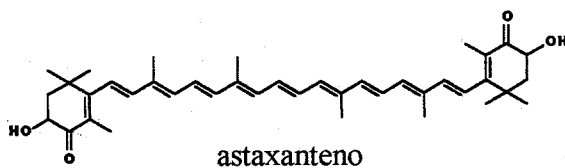
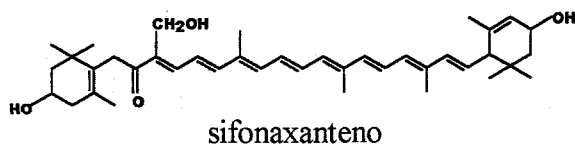


Figura 5.- Cetocarotenoides hidroxilados.

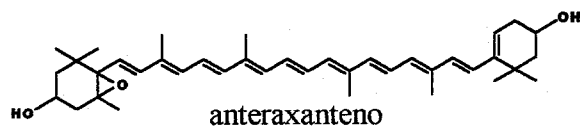
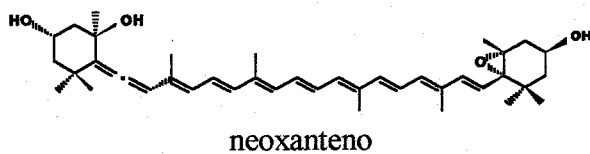
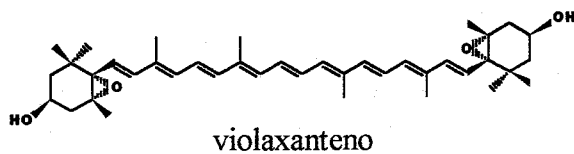


Figura 6.- Xantofilas hidroxiladas con grupos epóxido.

La reorganización del anillo 3-hidroxi-5,6-epoxi- β da lugar a dos tipos de anillo, el anillo acilciclopentanona, presente en pigmentos como capsanteno y capsorrubeno exclusivos del fruto del pimiento (*Capsicum annuum* L.), denominado tipo κ , y otro, el anillo 3,6-oxabicycloheptano característico de pigmentos como la eutreptielanona, α - y β -criptoeutreptielanona presentes en el alga marina *Eutreptilla gymnastica*, cucurbitaxanteno A y B, cicloviolaxanteno presentes en los frutos de la calabaza, (*Cucurbita maxima*) y también en el fruto del pimiento (Fiksdahl y colaboradores, 1984; Parkes y colaboradores, 1988). La síntesis de estos pigmentos se sitúa en las últimas etapas de la ruta biosintética de carotenoides. La formación de pigmentos con anillos tipo κ , se lleva a cabo por la acción del enzima capsanteno-capsorrubeno sintasa, que también posee actividad de β -ciclasa. También es posible encontrar pigmentos resultado de la acción de los dos enzimas, dando lugar a las dos reorganizaciones, como por ejemplo en la formación de 3,6-epóxido-capsanteno presente en variedades de pimiento negro (Deli y colaboradores, 1992). El mecanismo de las dos reorganizaciones del anillo 3-hidroxi-5,6-epoxi- β se esquematiza en la Figura 7 (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 1998) y la estructura de algunos pigmentos que mediante ambos mecanismos se pueden biosintetizar en las Figuras 8 y 9.

3.- Conformación espacial.

Las formas que adopta un pigmento carotenoides pueden ser múltiples aunque existen determinadas disposiciones espaciales que por su baja energía, son más estables. La cadena polienoica adquiere su conformación más estable cuando está dispuesta linealmente en el espacio debido a la mayor estabilización que el sistema de dobles enlaces conjugados adquiere en situación coplanar, y por ser la que menor impedimento estérico provoca entre los grupos metilo. Los anillos situados a los extremos de la cadena, en principio se sitúan coplanarmente a la cadena carbonada central, aunque la presencia de grupos sustituyentes en el anillo, sobre todo los situados en los carbonos 5 y 6, provocan una torsión del anillo. Por ejemplo, en β -caroteno, para disminuir la confrontación estérica entre el grupo metilo del carbono 5 con el hidrógeno del carbono 8, el anillo gira 40° respecto al plano en el que se sitúa la cadena carbonada (Mo, 1995).

Los pigmentos con anillos tipo ϵ , pierden continuidad en la conjugación del doble enlace del anillo, situado en los carbonos 4-5, con el resto de dobles enlaces de la cadena, no siendo necesario buscar la coplanaridad entre ambos grupos de dobles enlaces, por lo que la relajación del impedimento estérico de los grupos funcionales es el único factor que determina la disposición espacial de la molécula.

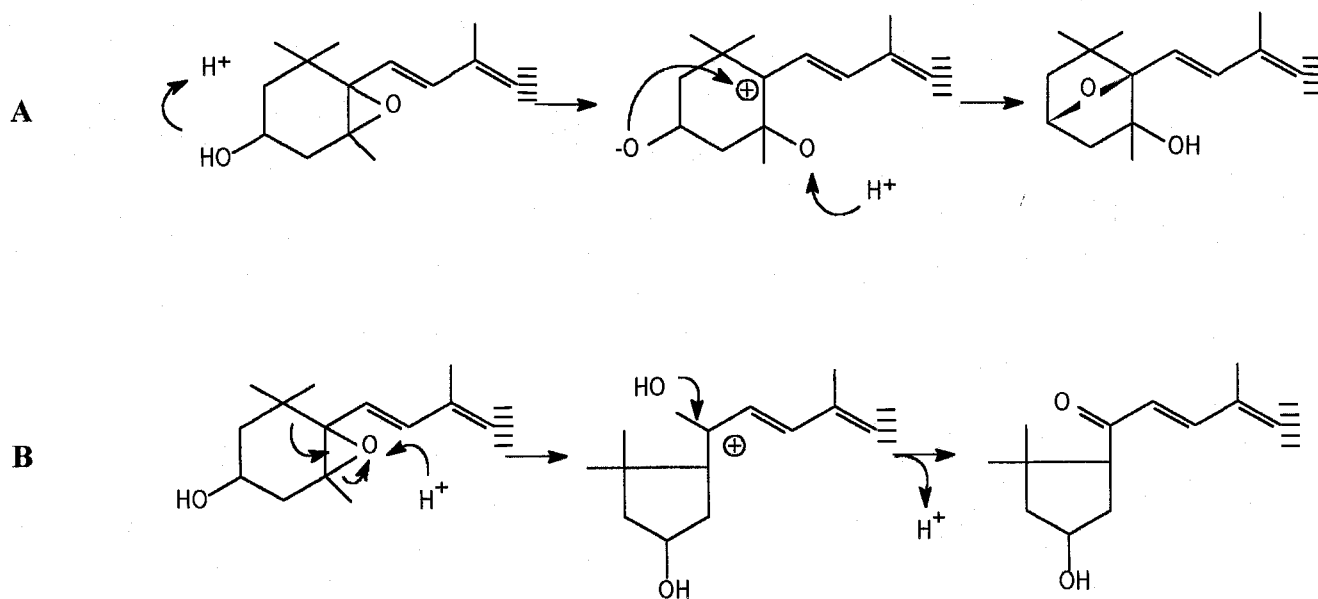


Figura 7.- Esquema de la reorganización del anillo 3-hidroxi-5,6-epoxi- β para generar el anillo 3,6-oxabicycloheptano (**A**) y de la reorganización pinacólica que origina el anillo acilciclopentanona (**B**).

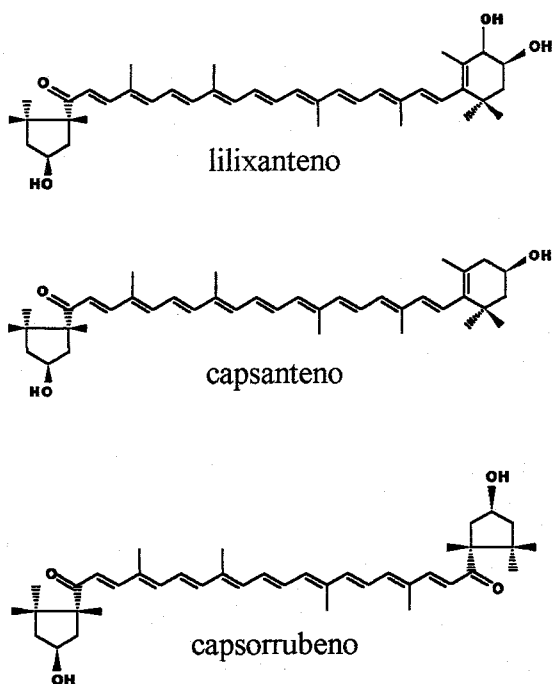


Figura 8.- Xantofilas con anillos acilciclopentanona.

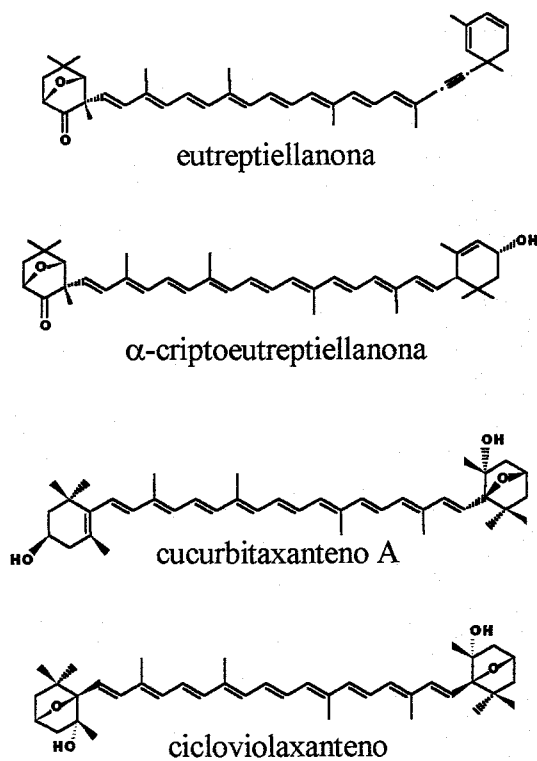


Figura 9.- Xantofilas con anillos 3,6-oxabicycloheptano.

- *La cadena polienoica.*

La característica estructural más importante de los pigmentos carotenoides es el sistema de dobles y simples enlaces alternados que forma la parte central de la molécula. Esto constituye el sistema conjugado en el que los electrones situados en orbitales enlazantes tipo π , están deslocalizados a lo largo de la cadena polienoica. Es esta disposición lo que convierte a los pigmentos carotenoides en un grupo de peculiares sustancias, dando lugar a sus propiedades y comportamiento físico-químico (Britton, 1995).

- *Estereoquímica.*

Las diferentes configuraciones geométricas en torno a los dobles enlaces carbono-carbono, da lugar a la existencia de isómeros, que constituyen distintas posibilidades estructurales que pueden ser aisladas como compuestos diferentes, lo que unido a la rotación del enlace simple carbono-carbono, hace posible que los carotenoides adopten, en principio, un enorme número de formas y configuraciones.

Teóricamente es posible la existencia de dos configuraciones de cada doble enlace de la cadena polienoica, *trans* o *cis*, en función de la disposición espacial de los grupos sustituyentes, en concreto de aquellos que constituyen la continuación de la cadena polienoica. Este hecho da lugar a que un pigmento pueda existir en multitud de disposiciones con uno o varios dobles enlaces en configuración *cis* (Weedon y Moss, 1995). En la realidad sólo unos pocos de estos isómeros estructurales se encuentran de forma natural. La presencia de un doble enlace en configuración *cis*, está menos favorecida energéticamente por impedimento estérico entre grupos metilo y/o átomos de hidrógeno en posiciones vecinales por lo que, termodinámicamente, la configuración más estable es aquella en la que todos los grupos sustituyentes en torno a los dobles enlaces se encuentran en posición *trans*. En aquellos casos en los que el impedimento estérico sea menor, como por ejemplo en los carbonos 15 y 15' sí es posible la configuración *cis* dando lugar a estereoisómeros relativamente estables, como por ejemplo 15-*cis*- β -caroteno, y también 9- y 13-*cis*- β -caroteno. Otras configuraciones sí son prácticamente imposibles como la 7- y 11-*cis* (Weedon y Moss, 1995).

4.- Propiedades químicas y función.

- Solubilidad.

Los pigmentos carotenoides son un grupo de sustancias extremadamente hidrofóbicas con escasa o ninguna solubilidad en agua, por lo que su situación en las células está restringida a áreas hidrofóbicas, excepto cuando se complejan con proteínas, lo que les permite permanecer en un ambiente acuoso. La presencia de grupos funcionales en la estructura altera la polaridad y modifica su interacción con otras moléculas, lo cual tiene especial trascendencia tanto en el mecanismo de las reacciones en las que intervienen como en el tipo de productos que se generan. En cuanto a la forma y tamaño, la linealidad de la cadena carbonada polienoica en configuración *trans* hace que las moléculas sean rígidas. La configuración *cis* rompe la linealidad de la molécula, adquiriendo formas diferentes a la del isómero *trans* por lo que su capacidad para ajustarse a estructuras subcelulares será diferente. Generalmente los isómeros *cis* tienden a ser más rápidamente solubilizados, absorbidos y transportados. La ciclación de los extremos de la cadena, acorta su longitud y el espacio que la molécula ocupa, mientras que los grupos funcionales hidroxilo, ceto y epóxido, condicionan otros factores estéricos de importancia en las reacciones de carotenoides (Weedon, 1971).

- Absorción de la luz y funciones fotoquímicas.

La absorción de energía lumínica produce el paso de la molécula de su estado basal de energía a otro de mayor contenido energético denominado estado excitado. En el caso de los carotenoides la transición de electrones del sistema de dobles enlaces conjugados se produce desde orbitales enlazantes tipo π a orbitales anti-enlazantes π^* . En este caso el salto electrónico no genera una molécula en estado excitado de muy alto contenido energético puesto que los electrones están deslocalizados de forma muy efectiva a lo largo de la cadena carbonada, por lo que no se requiere mucha energía para promocionar dicho salto electrónico, correspondiéndose con la radiación emitida en la región del visible en un rango de longitudes de onda de 400 a 500 nm. Por tanto los pigmentos carotenoides muestran un color que va desde el rojo al amarillo.

La capacidad de absorción lumínica posibilita que los pigmentos carotenoides puedan desarrollar dos funciones vitales para los organismos fotosintéticos. Por un lado la absorción lumínica en la región del visible permite la formación de estados excitados de niveles energéticos similares a los de la clorofila por lo que una transferencia energética tipo singulete-singulete del

pigmento carotenoide en su estado excitado a la clorofila puede generar el estado excitado de ésta, que es el activo en la fotosíntesis. Por otro lado la transferencia energética puede darse a la inversa, es decir, desde una molécula energéticamente excitada al pigmento carotenoide, como por ejemplo la transferencia desde el estado triplete de clorofila o porfirinas a carotenoides (Platt, 1959). Este trasvase energético tiene lugar más rápidamente que la transferencia energética a oxígeno con lo que se evita la formación de oxígeno en estado singulete, especie altamente reactiva y dañina, aunque los pigmentos carotenoides también aceptan la transferencia energética desde oxígeno en estado singulete si éste se formara. En ambos casos el carotenoide en estado excitado que se forma, disipa el exceso energético a su alrededor sin provocar daños a las moléculas en su vecindad, ni generar especies reactivas (Krinsky, 1971; Britton, 1995).

- Carotenoides con actividad de provitamina A.

La función fisiológica esencial de los carotenoides en los animales es la de ser precursores de la vitamina A. De los 600 carotenoides descritos, un 10% muestran actividad de provitamina A. Los más importantes tanto por su alta actividad como por su presencia son α - y β -caroteno, y algunas xantofilas entre las que se destaca β -criptoxanteno y algunos apocarotenoides (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1997). De todos, β -caroteno tiene la mayor actividad de provitamina A puesto que cada molécula de pigmento produce dos de retinal que es reducido a vitamina A (retinol). La vitamina A realiza múltiples funciones en los animales puesto que está implicada en los procesos de crecimiento y fundamentalmente, hace posible el funcionamiento de los pigmentos visuales de la retina (Pitt, 1971).

- Carotenoides como antioxidantes. Procesos de peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica se define como el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados. Este deterioro oxígeno-dependiente da lugar a la rancidez, por la producción durante el proceso oxidativo, de compuestos de bajo peso molecular, que proporcionan flavor indeseable. Al ser un proceso de formación de especies radicalarias, además de degradar a los ácidos grasos, también afecta a otros posibles componentes del medio lipídico, por ejemplo a pigmentos carotenoides, clorofilas y tocoferoles. Cuando estos componentes están presentes, el proceso de peroxidación se retarda por lo que es práctica habitual adicionar estas (de origen natural) y otras (de origen artificial) sustancias, *antioxidantes*, a grasas y aceites, para disminuir su alteración (Pryor y colaboradores, 1988).



La acción antioxidante lleva implícita la degradación de los compuestos que la ejercen. En algunos casos no interesa la pérdida de los antioxidantes naturales presentes en la materia oleosa, bien porque implicaría una merma en las propiedades nutricionales del producto, bien porque representan la verdadera cualidad del mismo, por lo que se añaden otras especies que sean las encargadas de disminuir la oxidación.

La peroxidación lipídica, por tanto, constituye un problema a evitar durante la obtención, transporte y almacenamiento de grasas y aceites, que hoy tiene más importancia con la mayor popularidad de aceites y margarinas de naturaleza poliinsaturada, naturaleza que hace posible la existencia de estos procesos. La rancidez tiene lugar no sólo en alimentos sino también en pinturas, plásticos, lacas y gomas. La secuencia de reacciones hoy en día ampliamente conocidas como la base de la peroxidación lipídica, fue determinada por Farmer y colaboradores hacia 1940, en los laboratorios de investigación de la Asociación Británica de Productores de Gomas. La enorme importancia de estas reacciones en sistemas biológicos no se apreció hasta mucho más tarde. Estos procesos están implicados en la modificación del ADN y proteínas (Hayakawa y colaboradores, 1997), alteración de la estructura de la membrana celular, iniciación de tumores, envejecimiento y pigmentación anormal de la piel y en la deposición de placas en arterias asociada a la modificación de lipoproteínas de baja densidad (Escudero y colaboradores, 1988; Louheranta y colaboradores, 1996).

Por todo ello el estudio de sustancias que sirvan de freno a la propagación de la peroxidación lipídica cuando ésta tenga lugar, tanto en alimentos como en sistemas biológicos, es actualmente una de las líneas de investigación de mayor interés. Dentro de las sustancias antioxidantes, también denominadas quimioprotectores, anticarcinógenos (cuando realizan su acción en sistemas biológicos), se encuentran los tocoferoles, glutathiona, ácido ascórbico, ácido úrico, fenoles, selenio y los pigmentos carotenoides (Sun, 1990). La capacidad antioxidante de los pigmentos carotenoides, deriva de sus características estructurales, y ha sido evaluada de forma amplia en el caso de β -caroteno, atendiendo tanto al mecanismo de reacción con los radicales libres, como a la eficacia de la acción que se deriva de él (Burton e Ingold, 1984; Yamauchi y colaboradores, 1993). Es conveniente introducir a los procesos de peroxidación lipídica y a los efectos que promueven en los sistemas biológicos.

Las etapas básicas de las que consta todo proceso de peroxidación lipídica son iniciación, propagación y terminación (Frankel, 1985; Porter y colaboradores, 1995) y se esquematizan en la

Figura 10. La etapa clave de la iniciación es la formación de un radical lipídico ($L\bullet$) por rotura de un enlace carbono-hidrógeno provocada térmica o fotoquímicamente, o por la abstracción del átomo de hidrógeno por un iniciador de radicales libres, a partir del lípido correspondiente (LH).

La propagación, normalmente comienza por la adición de oxígeno molecular al radical lipídico lo que da lugar a la formación de un radical peroxilo ($LOO\bullet$) que abstrae un nuevo átomo de hidrógeno de otra molécula $L'H$, generando el hidroperóxido ($LOOH$) y un nuevo radical $L'\bullet$. Los átomos de hidrógeno susceptibles de ser abstraídos en esta etapa son los adyacentes a los dobles enlaces carbono-carbono. Si el lípido es monoenoico, los hidrógenos en dichas posiciones vecinales, *alílicos*, tienen mayor energía de enlace, hasta 10 kcal/mol más que aquellos en posiciones vecinales a dos dobles enlaces, *bis-alílicos*, como en el caso de lípidos dienoicos. Al estar el paso limitante de la reacción en esta etapa, se marcan diferencias en la velocidad de oxidación de lípidos monoenoicos con respecto a los polienoicos, obteniéndose velocidades de degradación razonables a altas temperaturas para lípidos monoenoicos (como por ejemplo ácido oleico) mientras que la degradación de lípidos dienoicos (por ejemplo ácido linoleico) ocurre a temperatura ambiente (Davies y colaboradores, 1981).

Por otro lado, el radical peroxilo puede experimentar, alternativamente a la abstracción de un átomo de hidrógeno de otro lípido, procesos de fragmentación, reorganización y ciclación, a partir de los cuales es posible la formación de otros productos. La fragmentación tipo β , da lugar a la formación de compuestos de bajo peso molecular, como por ejemplo pentano, a partir de radicales de ácido linoleico y ácido araquidónico, etano y eteno a partir de radicales de ácido linolénico, y otros compuestos que pueden contener grupos carbonilos, especialmente aldehídos, como por ejemplo malonaldéhid, y 4-hidroxi-2,3-*trans*-nonenal (Sakai y Kuwazuru 1995). La reorganización y ciclación originan endoperóxidos, que pueden mostrar una actividad similar a las prostaglandinas.

Los hidroperóxidos lipídicos formados de manera continuada durante la etapa de propagación, también pueden ser causantes de nuevas etapas de iniciación, por su reacción con metales de transición, que provoca la generación, nuevamente, de radicales peroxilo e incluso radicales alcóxilo, que son especies más reactivas que los primeros. La terminación constituye la última etapa del proceso de peroxidación lipídica, por la que es posible la formación de productos no radicalarios, e incluso oxígeno molecular (Olzilgen y Olzilgen, 1990).

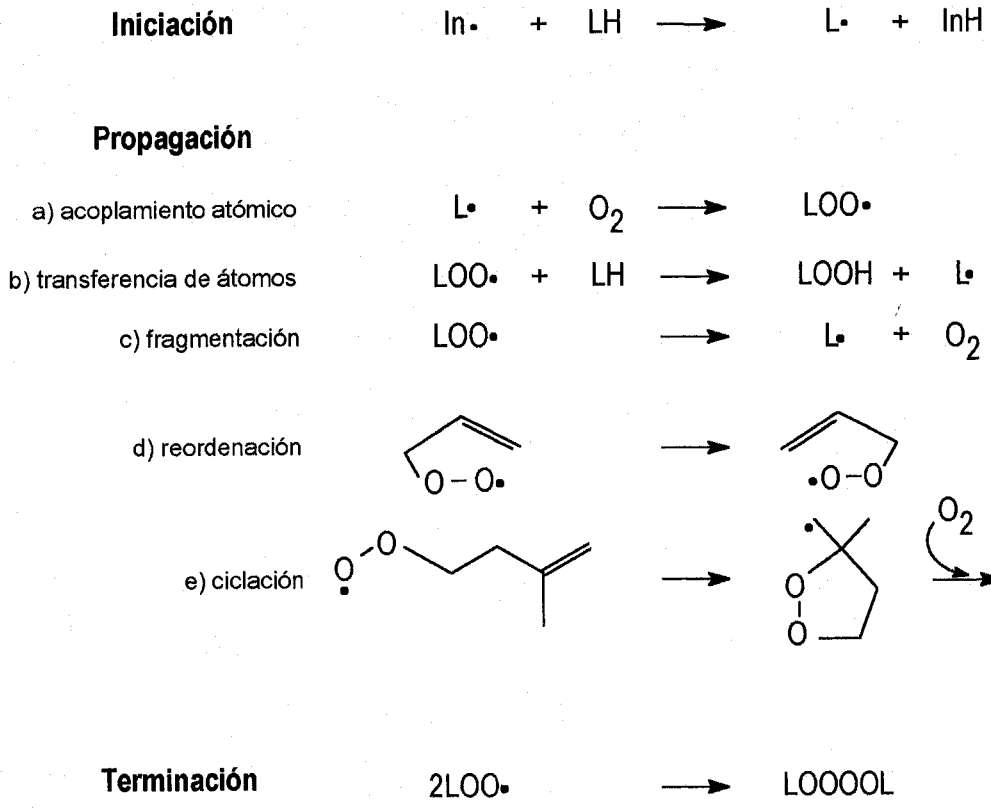


Figura 10.- Etapas básicas del proceso de oxidación lipídica, incluyendo las reacciones elementales posibles en la etapa de propagación radicalaria.

- Efecto de los procesos de peroxidación lipídica en sistemas biológicos.

En la mayoría de las membranas, la reacción de propagación de la peroxidación lipídica termina por afectar a las proteínas que pueden ser atacadas y dañadas por este proceso. Los aldehídos, posibles productos del proceso de oxidación de lípidos, pueden reaccionar con los grupos $-SH$ de proteínas. También pueden atacar a los grupos amino formando puentes intramoleculares e intermoleculares entre diferentes proteínas. Aquellos enzimas que requieran grupos $-NH_2$ o $-SH$ para ejercer su actividad, como le sucede a la glucosa-6-fosfatasa, son normalmente inhibidos durante la peroxidación lipídica (Halliwell, 1989).

Otros productos de la peroxidación lipídica, sobre todo los de bajo peso molecular, son inhibidores de la síntesis de proteínas e interfieren en los procesos de crecimiento celular. Los receptores en las membranas que permiten la respuesta celular a las hormonas, pueden ser inactivados durante la peroxidación lipídica. En general estos procesos de acción radicalaria, disminuyen la fluidez de la membrana, incrementan su permeabilidad a otras sustancias que normalmente no la cruzan e inactivan los enzimas enlazados a la misma. La fragmentación continuada de los ácidos grasos puede llevar a una pérdida total de la integridad de la membrana celular.

II. MECANISMOS DE REACCIÓN EN LOS PROCESOS OXIDATIVOS DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.

La estructura molecular de los pigmentos carotenoides determina que las reacciones químicas en las que intervienen fundamentalmente, sean procesos oxidativos, provocados por la presencia de oxígeno molecular en estado singulete, radicales peroxilo, alcoxilo, sulfonilo, tioilo, implicados en los procesos de peroxidación lipídica (Everett y colaboradores, 1996), y en general cualquier especie reactiva que pueda generar oxidación (Krinsky, 1988). Estas reacciones ponen de manifiesto la importancia biológica de los pigmentos carotenoides puesto que a través de ellas se evidencia su capacidad antioxidante, capacidad por la que se postula que los carotenoides evitan la aparición de cánceres y enfermedades degenerativas causadas por daño oxidativo (Trush y Kensler, 1991).

Los procesos de oxidación de carotenoides han sido utilizados durante muchos años para elucidar la estructura molecular, especialmente con reacciones que implican a los grupos funcionales presentes en la molécula. Sin embargo la zona de la molécula que condiciona el mecanismo por el cual los procesos oxidativos tienen lugar es la cadena polienoica, aunque la presencia de grupos hidroxilo, ceto, epóxido, situados en los extremos de la molécula, puede modificar la velocidad e incluso impedir que otros mecanismos de reacción ocurran. Las reacciones oxidativas de β -caroteno son las tradicionalmente más estudiadas dado que su aporte procedente de la dieta hace que esté habitualmente presente en el plasma y tejidos celulares de todos los animales, en los que se implica de forma efectiva en los procesos de peroxidación lipídica, evitando su propagación. Además su carácter de provitamina A despierta interés en su estudio, en éste y en otros muchos aspectos.

1.- Reacciones de β -caroteno con radicales peroxilo.

- Mecanismo de adición.

Los radicales peroxilo reaccionan principalmente con β -caroteno mediante un mecanismo de adición (Burton e Ingold, 1984). En función de la posición a la que se adicione el radical se formará un producto de reacción u otro. En la Figura 11 se representan éste y otros mecanismos de reacción de β -caroteno con radicales peroxilo. Si la adición tiene lugar en la posición 5,6 del anillo se produce el correspondiente epóxido 5,6 de β -caroteno (Figura 11, ruta A).

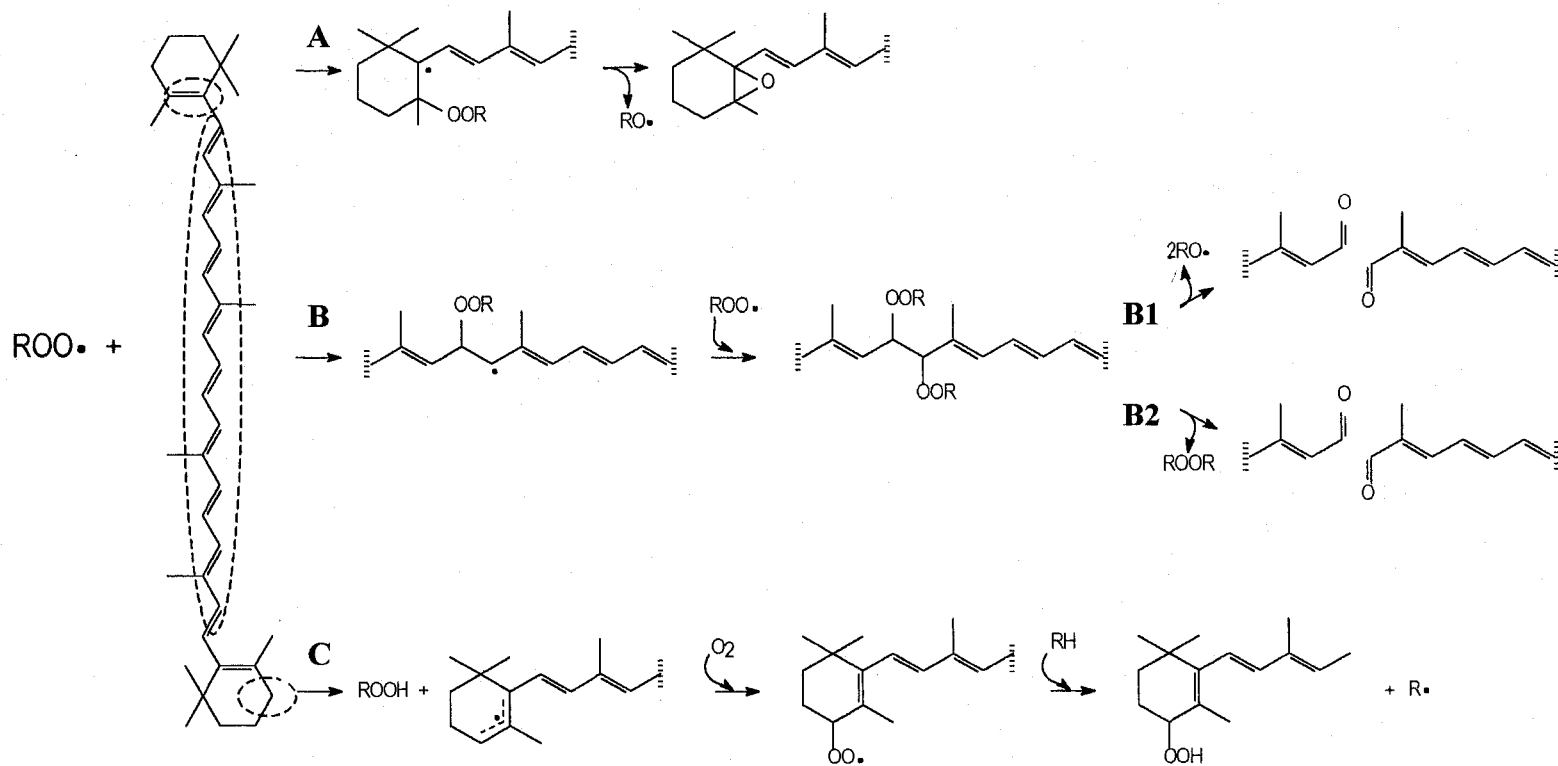


Figura 11.- Mecanismos de reacción de β -caroteno con radicales peroxilo. Adición al anillo en la posición 5,6 (**A**). Doble adición en la cadena polienoica (**B**) y posterior rotura homolítica (**B1**) o heterolítica (**B2**). Abstracción de un átomo de hidrógeno de la posición 4 del anillo (**C**) y continuación de la cadena de propagación radicalaria (**C1**).

La adición también se puede producir en cualquiera de los dobles enlaces de la cadena polienoica lo que produce un radical aducto estabilizado por resonancia.

Es posible la adición de un segundo radical peroxilo para generar un aducto *bis*-peroxilo, cuya existencia ha sido determinada por los productos formados tras estas reacciones, apocarotenales, como por ejemplo β -apo-10'-carotenal, β -apo-12'-carotenal, β -apo-14'-carotenal y β -apo-13'-carotenona (Handelman y colaboradores, 1991; Kennedy y Liebler, 1991; Mordi y colaboradores, 1991). Aunque la adición del segundo radical peroxilo puede tener lugar en la posición adyacente a la primera adición, también puede ocurrir en otras posiciones de la cadena polienoica debido a que el electrón del radical aducto está deslocalizado a lo largo de toda la cadena. Además otras posiciones pueden ser más favorables para la adición por no tener impedimento estérico (Figura 11, ruta B).

De las posibles rutas de reacción de β -caroteno con radicales peroxilo, la formación de epóxidos no implica un efecto antioxidante sino un proceso de autooxidación, puesto que su formación genera un nuevo radical, en este caso un radical alcoxilo, de naturaleza más reactiva que el radical peroxilo, por lo que el consumo neto de radicales es cero. La formación de apocarotenales, por la adición en la cadena polienoica, puede propiciar tanto un efecto antioxidante como un proceso autooxidativo, en función del tipo de fragmentación que el aducto *bis*-peroxilo experimente. La fragmentación homolítica (Figura 11, ruta B1) sugerida por Mordi y colaboradores, daría lugar a los correspondientes apocarotenales pero también a dos radicales alcoxilo, que continuarían la cadena de propagación radicalaria, por lo que no se observaría efecto antioxidante.

Estos casos, Figura 11, ruta A y ruta B1, constituyen en definitiva procesos autooxidativos, provocando la destrucción del pigmento y ningún consumo de radicales. Por otro lado la fragmentación heterolítica de los grupos alquildioxilo, (Figura 11, ruta B2) daría lugar a un dialquil peroxilo u otros productos no radicalarios. La oxidación de β -caroteno por esta ruta sí consumiría dos radicales peroxilo produciendo un efecto antioxidante.

Los estudios de diversos autores confirman que las condiciones de tensión de oxígeno, bajo las cuales se lleva a cabo la peroxidación de β -caroteno, determinan qué efecto (antioxidante o autooxidativo) tiene lugar (Burton e Ingold, 1984; Stocker y colaboradores, 1987; Kennedy y Liebler, 1992). Si las reacciones de oxidación radicalaria de β -caroteno se llevan a

cabo bajo altas tensiones de oxígeno, lo que se observa es un proceso autooxidativo siendo los productos de reacción los indicados en la ruta B1. El radical intermedio reacciona reversiblemente con oxígeno para formar un radical peroxilo, según la reacción representada en la Figura 12. Este equilibrio, está desplazado a la derecha, y más desplazado está, a medida que aumenta la tensión de oxígeno, dando continuidad a la cadena de propagación radicalaria. A bajas tensiones de oxígeno los productos formados son los de la ruta B2 (Figura 11), reflejándose un efecto antioxidante.

Las condiciones del medio condicionan a qué acción o efecto conduce el mecanismo de reacción entre β -caroteno y el radical peroxilo manifestándose uno u otro efecto.

- Otros mecanismos de reacción.

Los radicales peroxilo pueden eliminar un electrón de la cadena polienoica de β -caroteno formando el correspondiente radical catiónico que, a pesar de estar estabilizado por resonancia, acepta electrones de otros donantes como α -tocoferol, ubiquinona, u otras especies de naturaleza lipofílica (Grant y colaboradores, 1988; Jovanovic y colaboradores, 1992; Liebler, 1993; Edge y colaboradores, 1997).

Otro posible mecanismo de reacción con radicales peroxilo es el de abstracción de hidrógeno, representado en la Figura 11, ruta C. Aunque los productos derivados de este mecanismo no han sido descritos hasta 1997, Samokyszyn y Marnett en 1987, indicaban que la oxidación dependiente de prostaglandina sintasa de ácido 13-*cis*-retinoico da lugar a un producto 4-hidroxi y a un derivado 5,6-epóxido. El derivado 4-hidroxi se forma por abstracción del hidrógeno alílico en el carbono C4 seguido por adición de oxígeno, abstracción de hidrógeno y reducción del hidroperóxido, sólo en presencia del citado enzima. Woodall y colaboradores (1997), describen la formación de derivados 4-etoxi y 4-metoxi de β -caroteno por oxidación química, en presencia de etanol y metanol. La presencia de estos compuestos evidencia que la abstracción de hidrógeno en posiciones alílicas es otro posible mecanismo de oxidación de β -caroteno.

El grupo metilo, alílico en la posición 4 del anillo tipo β , muestra un comportamiento similar a los grupos metilo en posiciones alílicas, de los ácidos grasos poliinsaturados de los que la abstracción de hidrógeno tiene lugar como inicio y propagación de la cadena de reacción de peróxidos.

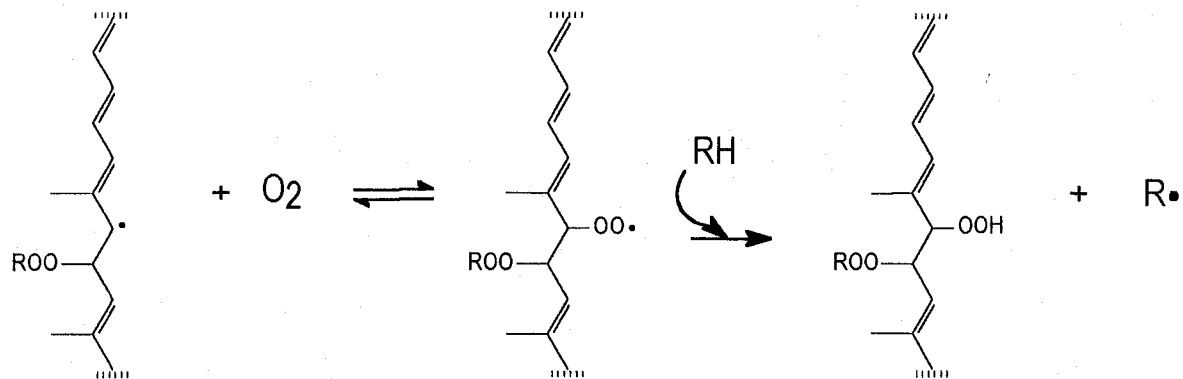


Figura 12.- Reacción reversible del radical carotenoide-peroxilo con altas concentraciones de oxígeno molecular y posterior propagación radicalaria que implica efecto oxidante.

Reacciones similares tienen lugar en los grupos metilo en posiciones alílicas de β -caroteno. En el caso de pigmentos con anillos tipo ϵ como α -caroteno y ϵ -caroteno los hidrógenos susceptibles de ser abstraídos estarían en la posición 3. Este mecanismo de reacción implica un efecto autooxidativo puesto que como productos, se generan nuevos radicales libres.

2.- Oxidación de β -caroteno por oxígeno singulete.

β -caroteno al igual que el resto de carotenoides fueron los primeros compuestos en ser caracterizados como los más efectivos “*quencher*” de oxígeno singulete (Foote y Denny, 1968). El mecanismo se basa en un proceso físico por el cual, el exceso energético de la molécula de oxígeno es absorbida por el pigmento, devolviendo a la molécula de oxígeno a su estado energético basal. El pigmento, dispersa térmicamente el exceso energético adquirido, sin provocar daños a otras moléculas vecinas.

La reiteración de este proceso termina destruyendo al pigmento mediante reacciones químicas que implican la adición del oxígeno singulete a la estructura del carotenoide dando lugar a endoperóxidos y derivados carbonílicos. Aunque una sola molécula de β -caroteno puede desactivar a 1000 moléculas de oxígeno singulete antes de ser oxidado, dicha oxidación irreversible tiene lugar, lo que pone límites a la efectividad como “*quencher*” del pigmento (Liebler, 1993). No obstante, el efecto positivo de la acción queda fuera de dudas.

Los productos de estas reacciones, como se ha comentado, son endoperóxidos y compuestos carbonílicos, procedentes de la rotura de la cadena polienoica que no provocan acción oxidante (Figura 13). La adición de la molécula de oxígeno singulete y la posterior rotura de la cadena no tiene lugar en cualquier punto de la misma. Según los productos obtenidos, sólo las posiciones 7,8-, 9,10-, 11,12- y 13,14- son susceptibles de adición y rotura. La formación del endoperóxido implica que la adición tiene lugar en las posiciones 5,8 con la traslocación del doble enlace de la posición 7,8- a la posición 6,7- en configuración *cis*, (Stratton y colaboradores, 1993).

3.- Oxidación de pigmentos carotenoides con otras características estructurales.

A pesar de los avances realizados en los estudios de oxidación de β -caroteno, se conoce poco de la oxidación y consecuente actividad antioxidante de otros pigmentos carotenoides.

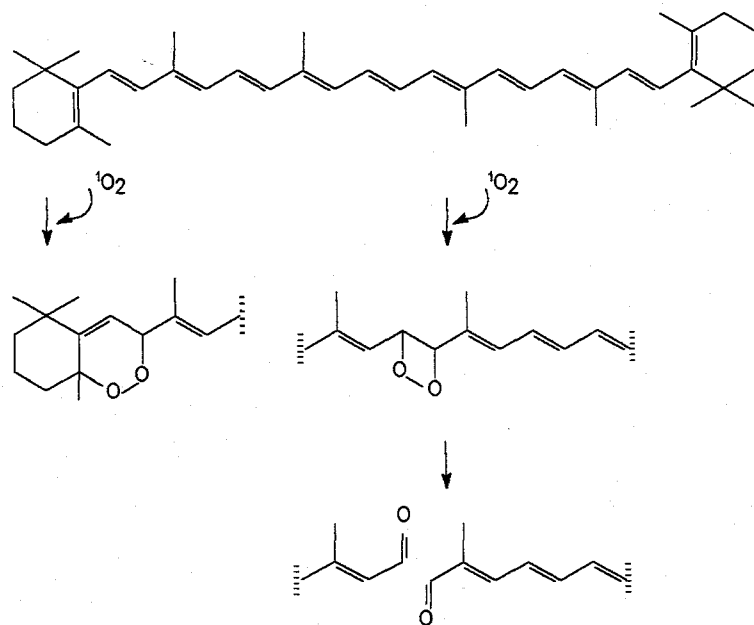


Figura 13.- Formación de endoperóxido y β -apocarotenales tras la reacción de β -caroteno con oxígeno molecular en estado singlete.

Es de esperar que se mantengan los mecanismos de reacción, tanto con radicales peroxilo y oxígeno singulete, puesto que la estructura central polienoica está presente en la conformación del resto de carotenoides. Las diferencias estructurales, que radican en el tipo de anillo que se sitúa a los extremos de la cadena carbonada (tipo β , tipo κ ...) y en la presencia de grupos funcionales (grupos hidroxilo, grupos ceto) en alguno de los carbonos que componen el ciclo, pueden marcar diferencias en la actividad antioxidante de otros carotenoides respecto a β -caroteno, siendo posible que alguno de los mecanismos por los que β -caroteno reacciona, no tengan lugar en otros carotenoides.

Por ello en los estudios de capacidad antioxidante de pigmentos carotenoides, en los que se promueve la oxidación de los mismos, las características estructurales del pigmento en estudio son de fundamental importancia para la interpretación de los resultados obtenidos.

En 1989, Terao realiza un estudio comparativo de la capacidad antioxidante de β -caroteno, zeaxanteno, cantaxanteno y astaxanteno. Estos tres últimos pigmentos mantienen las mismas unidades estructurales que β -caroteno diferenciándose de éste por la presencia de un grupo hidroxilo en cada carbono C3 y C3' (zeaxanteno), un grupo ceto en C4 y C4' (cantaxanteno) y un grupo hidroxilo en cada carbono C3 y C3' y un grupo ceto en C4 y C4' (astaxanteno). Cada pigmento fue añadido a una solución en la que por medio de iniciadores de radicales libres, se oxida linoleato de metilo, determinando el porcentaje de hidroperóxidos de linoleato de metilo formados en el transcurso de la reacción.

De esta forma se comprueba la capacidad antioxidante de cada pigmento comparando con un sistema de reacción en el que no se añade pigmento, y además permite establecer comparaciones directas del efecto que ejerce uno u otro pigmento, deduciendo la mayor o menor efectividad antioxidante y las causas de esas diferencias. Los resultados indicaron que en los medios de reacción en los que se añade una determinada concentración de pigmento, la formación de hidroperóxidos transcurre a menor velocidad que en el medio en el que no se adiciona, siendo cantaxanteno y astaxanteno los pigmentos que retardaron en mayor medida la formación de hidroperóxidos de metil linoleato. En todos los casos se produce una pérdida paulatina de la concentración carotenoides a medida que la reacción transcurre como consecuencia de la acción antioxidante. Además, el autor comprobó que la velocidad de desaparición de cada pigmento no es la misma. β -caroteno y zeaxanteno se consumen a mayor velocidad que cantaxanteno y astaxanteno.

Los pigmentos con un grupo ceto en las posiciones C4 y C4' muestran una mayor efectividad antioxidante. Sin embargo la presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones C3 y C3' no incrementa la efectividad de la acción antioxidante. Por tanto los mecanismos de reacción de la oxidación de zeaxanteno son los mismos que para β -caroteno mientras que en el caso de cantaxanteno y astaxanteno o bien alguno de los mecanismos no tiene lugar o bien la presencia de los grupos ceto modifica la reactividad del pigmento.

Terao atribuye la mejor efectividad de cantaxanteno y astaxanteno a la mayor electronegatividad de los átomos de oxígeno que reducen la densidad electrónica en la cadena carbonada del radical aducto formado en el proceso, lo que disminuye la reactividad de dicha especie y su tendencia a continuar la cadena de propagación radicalaria. La deslocalización electrónica a lo largo de la cadena polienoica se representa en la Figura 14. Es de esperar que otros pigmentos con grupos ceto en las posiciones C4 y C4' pueden ser antioxidantes de mayor efectividad que β -caroteno.

Sin embargo, en este trabajo no se tuvo en cuenta que otro de los posibles mecanismos de reacción es la abstracción de un átomo de hidrógeno en posiciones alílicas, más concretamente en las posiciones C4 y C4', puesto que no se habían descrito productos de reacción que sólo mediante dicho mecanismo se pueden obtener (4-etoxi y 4-metoxi derivados de β -caroteno) por lo que se creía que este proceso no tenía lugar. La descripción tuvo lugar, como ya se ha comentado anteriormente por Woodall y colaboradores en 1997. Cantaxanteno y astaxanteno no tienen átomos de hidrógeno en dichas posiciones por lo que no existe posibilidad de que reaccionen mediante este proceso. De esta forma no se generan especies radicalarias, limitando la reactividad de estos pigmentos a posiciones en la cadena carbonada central, lo que unido a la mayor efectividad en la deslocalización del radical intermedio que se forma, hace que estos pigmentos muestren una mejor acción antioxidante.

No obstante, a pesar de que la hipótesis de Terao no es completamente correcta, los resultados de este trabajo propiciaron una mayor atención a las posibilidades que otros pigmentos, aparte de β -caroteno, podían tener como sustancias antioxidantes, aunque no tuviesen actividad de provitamina A, y máxime porque ya se había descrito la presencia de cantaxanteno y astaxanteno en el plasma humano (Ohmacht y colaboradores, 1987).

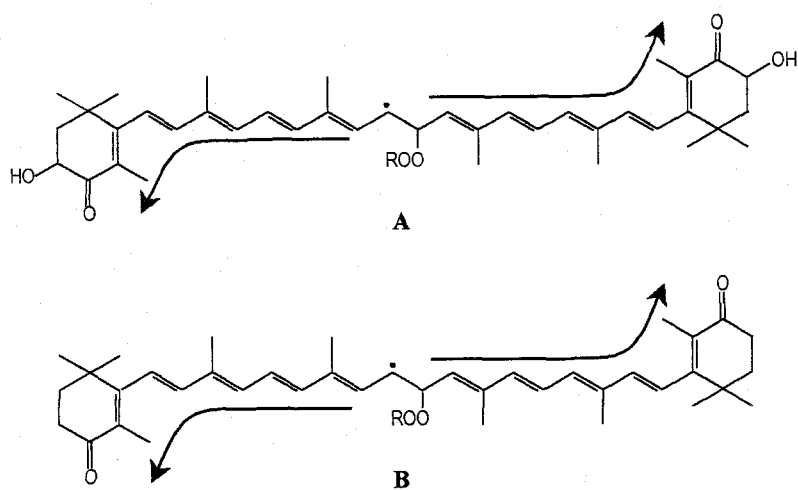


Figura 14.- Deslocalización electrónica a lo largo de la cadena poliénoica central como efecto de la presencia de grupos ceto en los anillos, para los radicales astaxanteno-peroxilo (A) y cantaxanteno-peroxilo (B), sugerido por Terao (1989).

Cantaxanteno, además ya se había utilizado como agente terapéutico en determinadas fotodermatosis (Meyer y colaboradores, 1985). Se realizaron estudios de la actividad antioxidante de estas xantofilas con grupos ceto en anillos tipo β en procesos de oxidación de fosfatidilcolina como componente de liposomas, con resultados positivos (Lim y colaboradores, 1991).

En el trabajo de Woodall y colaboradores (1997), se indica que la idea de que el único papel biológico de los pigmentos carotenoides absorbidos por los animales era la de ser precursores de vitamina A, ha quedado desfasada, y se debe prestar atención a todos los pigmentos carotenoides, aunque no muestren actividad provitamínica. Es más, pigmentos como cantaxanteno y astaxanteno, que no muestran actividad de provitamina A, ejercen una acción antioxidante más efectiva que β -caroteno, que es su precursor más directo.

El interés que despertaron los cetocarotenoides ha suscitado estudios similares incluso con carotenoides de síntesis, y otros naturales pero no tan frecuentes. Martin y colaboradores publican en 1999 un estudio en esta línea de investigación, que incluye a pigmentos como rodoxanteno, isonorastaxanteno, actinioeritrol, isonorastaceno, que contienen distintas combinaciones de grupos hidroxilo y grupos ceto en distintas posiciones del ciclo, incluyendo distintos tipos de anillo (tipo β o tipo ϵ). Resulta interesante como la presencia de más de un grupo ceto en el anillo (isonorastaceno con dos en las posiciones C2 y C3 de cada anillo) aumenta en un 30% la capacidad antioxidante respecto a astaxanteno.

Rodoxanteno, pigmento con los dos anillos tipo ϵ tampoco posee hidrógenos en posiciones alílicas al doble enlace (C3 y C3') al estar ocupadas por un grupo ceto respectivamente, con lo que tampoco son posibles mecanismos de abstracción, tan sólo mecanismos de adición a la cadena carbonada. La efectividad antioxidante de este pigmento es ligeramente inferior a astaxanteno. Martin y colaboradores concluyen que la falta de continuidad de dobles enlaces entre la cadena carbonada central y el anillo no modifica la capacidad antioxidante del pigmento.

III. PIGMENTOS CAROTENOIDES EN EL FRUTO DEL PIMIENTO ROJO.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una planta que pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate, la patata, el tabaco y hasta un total de 80 especies distintas. El fruto del pimiento es una baya redondeada o alargada según variedad, en el que los pigmentos carotenoides se concentran en el pericarpio. Durante la maduración, proceso relacionado con la degeneración de cloroplastos y la aparición de cromoplastos (Gross, 1991) tienen lugar dos procesos metabólicos simultáneos, la síntesis *de novo* de pigmentos y la transformación de los ya formados en otros. Principalmente las xantofilas amarillas se transforman en xantofilas cetónicas, capsanteno y capsorrubeno, pigmentos exclusivos del fruto del pimiento. Por tanto, el fruto experimenta un cambio drástico en su coloración desde el verde, pasando por tonos anaranjados, hasta el rojo intenso (Curl, 1962, 1964).

Los frutos del pimiento ya maduro, contienen una mezcla compleja de pigmentos carotenoides, descrita en diversas publicaciones (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994a; 1994c): El pigmento mayoritario es capsanteno, presente tanto en configuración todo-*trans* como en *cis*, y su epóxido 5,6, seguido de β -caroteno e isómero 13-*cis* y del conjunto de xantofilas amarillas β -criptoxanteno, zeaxanteno (e isómero 13-*cis*) y cucurbitaxanteno A. Violaxanteno y capsorrubeno conforman el resto de la fracción carotenoide. También, se ha descrito la presencia de anteraxanteno, mutatoxanteno y β -criptocapseno pero en concentraciones muy bajas. La composición total carotenoide se divide en dos fracciones atendiendo al color de cada pigmento, fracción isocrómica roja, compuesta por capsanteno (incluyendo isómeros y epóxido-5,6) y capsorrubeno, y fracción isocrómica amarilla, formada por el resto de pigmentos (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1984).

La biosíntesis de los pigmentos está acompañada por el proceso de esterificación con ácidos grasos. Este proceso implica a las xantofilas que contienen grupos hidroxilo en su estructura, formando un enlace éster con el ácido graso. La presencia de uno o dos grupos hidroxilo hace posible que el pigmento se esterifique con uno o dos ácidos grasos que además pueden ser idénticos o diferentes lo cual proporciona mayor complejidad al perfil carotenoide puesto que es posible encontrar múltiples isómeros de esterificación. β -caroteno queda excluido del proceso de esterificación por no poseer grupos hidroxilo. La esterificación confiere al pigmento mayor liposolubilidad por lo que son más fácilmente incorporados en las membranas (Camara y Brangeon, 1981). Además según varios autores (Daood y Biacs, 1986; Biacs y



colaboradores, 1989; Gross, 1991; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b) las formas esterificadas son más estables que las no esterificadas y de aquellas, las que están esterificadas con ácidos grasos saturados lo son más que las esterificadas con ácidos grasos insaturados. En el pimiento, las xantofilas rojas capsanteno y capsorrubeno están esterificadas por ácidos grasos saturados principalmente ácido láurico y ácido mirístico mientras que las xantofilas amarillas se esterifican con ácidos grasos insaturados, mayoritariamente ácido linoleico.

Los frutos del pimiento son por tanto una excelente fuente de carotenoides tanto por su diversidad como por la concentración que en estos frutos alcanza la fracción de pigmentos. Estos motivos, convierten al pimiento en materia prima idónea para obtener concentrados de pigmentos, utilizados en la industria alimentaria. Los concentrados que se pueden obtener a partir de los frutos del pimiento son el pimentón y la oleoresina. Ambos productos son valorados comercialmente en función de la capacidad colorante que posean por lo que es importante tanto seleccionar variedades con alto contenido en pigmentos como evitar que durante el proceso de obtención tengan lugar reacciones degradativas que disminuyan la composición carotenoide (Costa, 1979; ASTA, 1986; Soriano y colaboradores, 1990).

1.- Fabricación del pimentón.

Desde la introducción desde América del fruto del pimiento la producción del pimentón se ha concentrado en dos zonas de España, Cáceres y Murcia. Las diferencias entre ambas zonas van desde la variedad cultivada (variedad *Bola* en Murcia y variedad *Agridulce* en Cáceres) hasta la forma y tipo de procesado del fruto para la elaboración del pimentón, resultando un producto final claramente distinto en un caso y otro.

De las dos operaciones básicas de las que consta el proceso de fabricación del pimentón es la deshidratación la que se realiza de forma diferente en una zona y otra. Así en la región murciana el secado de los frutos se realiza al Sol, bien por exposición directa bien cubiertos por plásticos en grandes superficies de cemento, completándose la desecación en diez días aproximadamente. Posteriormente se fragmenta el fruto seco y se deja al Sol unos dos días más, finalizando su secado.

En los últimos años se ha introducido el secado por corrientes de aire caliente, que acorta el proceso a unas 6-8 horas. Debido al uso de temperaturas más energéticas, las condiciones son controladas más cuidadosamente para evitar pérdidas de pigmentación carotenoide por procesos

termodegradativos. Normalmente la temperatura de secado en este tipo de procesado no supera los 350 K. Existen diversos diseños de secaderos utilizados en este proceso, como por ejemplo secaderos de bandejas, de corriente de aire horizontal o vertical (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1993, 1994a, 1996).

En Cáceres, y más concretamente en la comarca de La Vera el proceso de secado se realiza en casas, construidas con piedras y madera, de dos plantas, separadas por un entresuelo que permite el flujo de calor. Los frutos se colocan en la planta superior, formando una capa de 50 a 80 cm. En la planta inferior se genera la fuente de calor, quemando leña de encina o roble. El proceso consume de ocho a diez días de trabajo, durante los cuales el "paisano" voltea los frutos, homogeneizando la masa de pimientos para conseguir un secado uniforme. El humo generado en la combustión de la leña, impregna a los frutos de un aroma inconfundible por lo que el pimentón procedente de frutos secados por este procedimiento es muy apreciado por los consumidores. Las temperaturas medias de este procesado se sitúan en torno a 315 K, por lo que el secado tradicional de La Vera es un proceso energéticamente suave.

Diversos estudios realizados por Mínguez-Mosquera y colaboradores (1994b) y Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1994c) han puesto de manifiesto que estas características (deshidratación lenta a temperaturas moderadas) permiten que el fruto muestre actividad metabólica, simulando un proceso de sobremaduración, generándose procesos biosintéticos que en algunos casos, aumentan el contenido carotenoide inicial.

La mayor o menor expresión de estos procesos biosintéticos depende fundamentalmente de las condiciones de secado a las que se ven sometidos, de la humedad inicial de los frutos y del alcance de los procesos catabólicos que se producen durante el secado. De la conjugación de estos factores puede resultar que la concentración carotenoide de los frutos aumente, se mantenga o disminuya.

El proceso de deshidratación constituye un cúmulo de procesos, de naturaleza múltiple, tanto positiva como negativa de cuya realización surge un producto seco cuya composición carotenoide es resultante de dichos procesos.

La producción de pimiento deshidratado, desde 1950 hasta 1994, alcanzó sus cotas máximas en los años 1985 y 1986 con 29.800 y 30.900 toneladas con un valor comercial de más de 5.000 millones de pesetas. A partir de 1990 la superficie dedicada al cultivo desciende pero la

producción no lo hace proporcionalmente debido a las mejoras agronómicas introducidas, con 11.600 toneladas y un volumen económico de 3614 millones de pesetas como valores medios desde 1990 hasta 1994 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994).

Tras el proceso de secado, el fruto deshidratado se muele, molturando conjuntamente al pericarpio seco con las semillas hasta conseguir un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm. A pesar de que algunos productores siguen utilizando molinos de piedra, en esta etapa del procesado para pimentón se han introducido de forma general todas las mejoras tecnológicas, puesto que la cáscara es sometida a un nuevo calentamiento por fricción que puede de nuevo propiciar pérdidas de pigmentos. Según indican Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1994c), las pérdidas tienen una especial incidencia sobre la fracción isocrómica de pigmentos amarillos, mientras que la fracción compuesta por pigmentos rojos experimenta pérdidas inferiores. También se observa una mayor presencia de isómeros. Por estos motivos en algunas industrias pimentoneras, se realiza la molturación bajo refrigeración, disipando el calor generado.

La inclusión en esta etapa de las semillas del fruto, a pesar de diluir la capacidad colorante del fruto deshidratado, confiere al producto final un aspecto lustroso y brillante más atractivo para el consumidor. En la etapa de molienda, los productores consiguen homogeneizar su producción, puesto que cada lote de fruto seco puede tener una capacidad colorante muy distinta de otros, hecho que se corrige diluyendo adecuadamente unas partidas con otras (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1996).

2.- Factores que modifican la estabilidad de pigmentos carotenoides en el pimentón.

Los estudios de estabilidad del color en el pimentón se han centrado principalmente en estudiar los factores responsables de la degradación de pigmentos carotenoides. Entre dichos factores estudiados, que provocan pérdidas de concentración carotenoide, están oxígeno, luz y temperatura.

- Oxidación por oxígeno molecular.

La oxidación de capsanteno, al ser el pigmento mayoritario del pimentón y responsable principal de la coloración roja de esta especia es objeto de estudio en el trabajo de Philip y Francis (1971). Según la citada publicación, se provocó la oxidación de capsanteno mediante corrientes de oxígeno a 313 K, identificando los productos de la reacción. Se observa como principal producto la formación de capsantona y 3-ceto-criptocapsona lo que indica que la

oxidación de capsanteno implica la conversión de los grupos hidroxilo en grupos ceto como primer estadio de la reacción. También se identifican apocarotenoides como β -citraurín y 3-ceto- β -apo-8'-carotenal. Los productos finales de la oxidación son compuestos procedentes de la fragmentación de los anteriormente descritos. La formación de estos compuestos implica pérdida progresiva de color, principalmente por aquellas reacciones que rompen la cadena carbonada y consecuentemente el sistema de dobles enlaces conjugados.

- Oxidación lumínica.

La luz es otro factor que provoca pérdida de color en el pimentón. Mar y Francis (1969) observan una pérdida de color del 96% en pimentones expuestos a la luz. Las propiedades de absorción lumínica de los pigmentos carotenoides, tan importantes y necesarias para la fotosíntesis oxigénica, convierten a la luz en un factor degradativo, y más aún cuando las estructuras celulares en las que los pigmentos carotenoides desarrollan su función han sido destruidas, siendo la exposición a la luz más directa y perjudicial. Cada pigmento, en función de sus características estructurales muestra una velocidad de degradación distinta. En 1995, Mínguez-Mosquera y Jarén-Galán publican un estudio de decoloración de β -caroteno y capsanteno (en su forma libre y diesterificada). La experiencia se realiza en distintos disolventes y exponiendo la disolución de pigmento a la luz. β -caroteno muestra una velocidad de degradación superior a capsanteno en todas las condiciones de reacción experimentadas mientras que la esterificación de capsanteno genera una mayor estabilidad del pigmento, en los medios de reacción apolares, mientras que en los medios de reacción de polaridad intermedia la estabilidad de ambas formas de capsanteno (libre y diesterificada) es muy similar. El medio de reacción y no sólo la estructura, también condiciona la estabilidad.

Una de las reacciones provocadas por la luz, la isomerización, es de especial trascendencia, no sólo por la pérdida de intensidad de color sino por el valor nutricional del pimentón y otros alimentos que contienen carotenoides con actividad de provitamina A, puesto que la formación de isómeros *cis* disminuye su valor provitamínico hasta en un 50% (Zechmeister, 1944). Los estudios de fotoisomerización, se han centrado por ello en β -caroteno. Sin embargo en el pimiento y pimentón es posible encontrar los isómeros *cis* de capsanteno y zeaxanteno. En cualquier caso la isomerización constituye el paso previo a la formación de productos de degradación con la consecuente pérdida de la capacidad colorante.

Sin embargo por las razones anteriormente citadas es β -caroteno el pigmento en el que se han centrado los estudios de fotoisomerización. Pesek y Warthesen realizan en 1990 un estudio de la fotoisomerización de *trans*- β -caroteno a 301 K. Los dos isómeros que se forman durante la exposición lumínica son 9- y 13-*cis*- β -caroteno, estando la reacción de fotoisomerización en competencia con la fotodegradación, que implica pérdida tanto de β -caroteno como de los isómeros que se van formando.

De los dos isómeros, preferentemente se favorece la formación de 9-*cis*, lo que está en consonancia con lo indicado por Zechmeister en 1944, que establece una menor energía de activación para la isomerización *trans-cis* en los dobles enlaces cercanos a la posición central de la molécula pero el isómero formado muestra una menor estabilidad. A medida que la isomerización tiene lugar en posiciones más alejadas de los carbonos 15 y 15' el isómero que se obtiene es más estable. En una solución de *trans*- β -caroteno sometida a la misma temperatura, pero en oscuridad, el isómero que se forma preferentemente es 13-*cis* (aproximadamente a una velocidad tres veces superior a la de formación de 9-*cis*- β -caroteno). En este caso aunque los isómeros formados son los mismos, la velocidad de degradación de los isómeros que se forman es menor debido a la falta de luz.

- Oxidación térmica.

Según indican Lease y Lease (1956) en la estabilidad de la capacidad colorante del pimentón, la temperatura de almacenamiento es un factor importante. Los pimentones almacenados a temperaturas iguales o inferiores a 298 K muestran una pérdida de la capacidad colorante muy inferior a aquellos pimentones conservados a temperaturas más altas. Las muestras sometidas a temperaturas inferiores a 298 K, pierden su capacidad colorante rápidamente si se aumenta su temperatura de almacenamiento, lo que pone de manifiesto que incluso a bajas temperaturas se producen cambios, aunque no afecten de forma inmediata al color del pimentón. Según los autores, una conservación a alta temperatura, tras un almacenamiento refrigerado "estimula el pasado del pimiento desde su procesado hasta su comercialización".

Quizás en esta idea se inspiraron los trabajos publicados por Malchev y colaboradores en 1982 y 1989. En ambas publicaciones, se estudió el efecto que la temperatura de secado tiene sobre los cambios en la composición total carotenoides durante el almacenamiento del pimentón.

Tras desecar frutos de pimiento a distintas temperaturas, se molturaron hasta obtener los correspondientes pimentones, que fueron conservados a la misma temperatura. La velocidad de pérdida de color de los pimentones es proporcional a la temperatura de secado de los frutos. Concluyen, por tanto, en que la estabilidad de los pigmentos carotenoides es dependiente de las condiciones de temperatura que fueron empleadas para deshidratar el producto.

- Adición de antioxidantes para aumentar la estabilidad de pigmentos carotenoides en el pimentón.

En todos los casos expuestos, la pérdida de concentración carotenoide tiene lugar por reacciones de oxidación. Si el objetivo es conservar el color en el producto, habría que evitar dichas reacciones. De forma natural en el pimiento existen otros antioxidantes como el ácido ascórbico, de naturaleza hidrofílica y tocoferol, soluble en sistemas oleosos (Fuente y colaboradores, 1977; Daood y colaboradores, 1996). La concentración de dichos antioxidantes es distinta según la variedad de pimiento considerada, aunque otros muchos factores pueden modificar dicha concentración.

En el caso de ácido ascórbico, además hay que considerar que su posible efectividad queda mermada por la escasa presencia de agua en el pimentón. Tan sólo resta la acción antioxidante de tocoferol, que se encuentra en un medio más adecuado a su naturaleza lipofílica. Biacs y colaboradores (1992), realizan un estudio sobre la evolución de ambos antioxidantes en distintas variedades de pimiento, observando que aquellos pimentones de mayor contenido en tocoferol la pérdida de color es más lenta. Este es el motivo por el que además de considerar el contenido carotenoide de una variedad, se tiene en cuenta la presencia de antioxidantes naturales, especialmente tocoferol, en el fruto.

En el mismo estudio, además, se considera la posibilidad de adicionar ácido ascórbico y tocoferol a los pimentones para reducir la oxidación degradativa del color. Para ello se pulverizó ácido ascórbico en solución acuosa y tocoferol en hexano, sobre los pimentones, y se conservaron a temperatura ambiente y en refrigeración a 278 K. En el caso de los pimentones con ácido ascórbico la pérdida en pigmentos fue de un 5% para los pimentones almacenados en frío y de un 15% para los conservados a temperatura ambiente. Los controles perdieron un 15% y un 27% en cada caso.

No fue tan efectiva la conservación de los pimentones con tocoferol adicionado, que presentaron pérdidas similares a las de los controles. La concentración de antioxidantes disminuye rápidamente en las primeras etapas de la experiencia. La pérdida se sitúa en el 80% de su concentración inicial a los 30 días de la conservación, siendo una muestra de su efectividad frente a la oxidación y consecuentemente de su rápido descenso.

El resultado de ambas adiciones se considera insatisfactorio al conjuntar la pérdida en antioxidantes y la de pigmentos carotenoides, ya que ácido ascórbico y tocoferol sólo exhiben su potencial en la primera etapa de la experiencia, sin mejorar sustancialmente la estabilidad de la capacidad colorante, además de las dificultades en redisolverse al primero y distribuirse uniformemente al segundo. Osuna-García y colaboradores realizaron en 1997 un estudio similar, adicionando determinadas cantidades de antioxidantes naturales (tocoferol y ácido ascórbico) y sintéticos (etoxiquin y Pristene), con resultados similares al trabajo de Biacs.

Finalmente, la semilla adicionada durante la molienda de la cáscara seca, aumenta el contenido en tocoferol de la composición final del pimentón. La mejora de la estabilidad del color atribuida a la adición de semilla, por aumentar el contenido en antioxidantes, se contrapone con otros estudios en los que la adición hizo disminuir la concentración carotenoide en pimentones almacenados (Biacs y colaboradores, 1989). Este hecho se fundamenta, según los autores, en la naturaleza poliinsaturada de la fracción lipídica que compone la semilla, que origina y propicia degradación en la fracción carotenoide. Por otro lado Okos y colaboradores, publican en 1990 un estudio de estabilidad de pimentones con distinta proporción de semilla, observando una mejor conservación de la fracción carotenoide en aquellos pimentones con mayor cantidad de semilla. No queda claro qué efecto, positivo o negativo, tiene la adición de semilla en la estabilidad de la composición carotenoide.

3.- Oleorresina de pimentón.

La oleorresina de pimentón es un concentrado de pigmentos, que se obtiene mediante la extracción con disolvente orgánico y posterior eliminación del mismo, disuelto en una matriz oleosa de composición similar a la del pimiento. El producto es un líquido aceitoso más o menos viscoso de color rojo oscuro, de olor y picor variables. Existen tres tipos de oleorresina en función de su uso final, clasificadas por la Essential Oil Association (1975). Oleorresina de pimentón usada como colorante alimentario en carnes procesadas, productos lácteos, sopas, salsas, y aperitivos. Oleorresina de pimiento rojo, como fuente tanto de color como de sabor

picante, también para carnes procesadas, salsas, sopas, dispersa en algunas bebidas y en aperitivos. Finalmente la oleorresina de *capsicum*, generalmente la de sabor más picante por su alto contenido en capsaicinoides, usada para algunas preparaciones farmacéuticas y en emplastos.

Aunque los nombres y especificaciones de picor y color han sido adoptadas y seguidas por fabricantes y consumidores, éstos solicitan de forma particular los niveles de color y picor requeridos y el fabricante les proporciona la oleorresina adecuada, modificando sus cualidades previamente si es necesario.

Del total de la producción de oleorresina entre un 60-70% se dedica al sector industrial, comercializada en bidones de 90 a 180 kg, mientras que un 25-30% se dedica a la venta directa en pequeños lotes de 2,5 a 10 kg. Los Estados Unidos importaron en 1998, 178.000 kg de oleorresina de pimentón de los cuales 72.807 kg fueron exportados desde España, aunque su principal proveedor es la India con 96.527 kg exportados. El volumen económico del mercado de oleorresinas de pimentón en Estados Unidos supuso 4 millones y medio de dólares. Estos datos fueron proporcionados por la American Spice Trade Association, que controla las especificaciones de calidad del producto (ASTA, 1986) y que además dirige las importaciones y exportaciones de especias y otros productos relacionados en los Estados Unidos.

- Fabricación de la oleorresina de pimentón.

La obtención de oleorresina de pimentón (Figura 15), es un proceso discontinuo, que se puede resumir en tres etapas básicas: preparación de la materia prima (etapa similar a la obtención industrial del pimentón), extracción y eliminación del disolvente (Govindarajan, 1983).

Preparación de la materia prima.

Tras la selección de los frutos, basada principalmente en su riqueza de color, se deshidratan bajo condiciones fijadas. Posteriormente, se eliminan las semillas y pedúnculos, para moler sólo la cáscara seca en dos etapas, primero en un molino de martillos trabajando entre 800-1000 r.p.m. hasta obtener un tamaño de partícula de 300 a 400 μm . Los residuos se muelen en una segunda etapa a velocidades superiores (2500 r.p.m.).

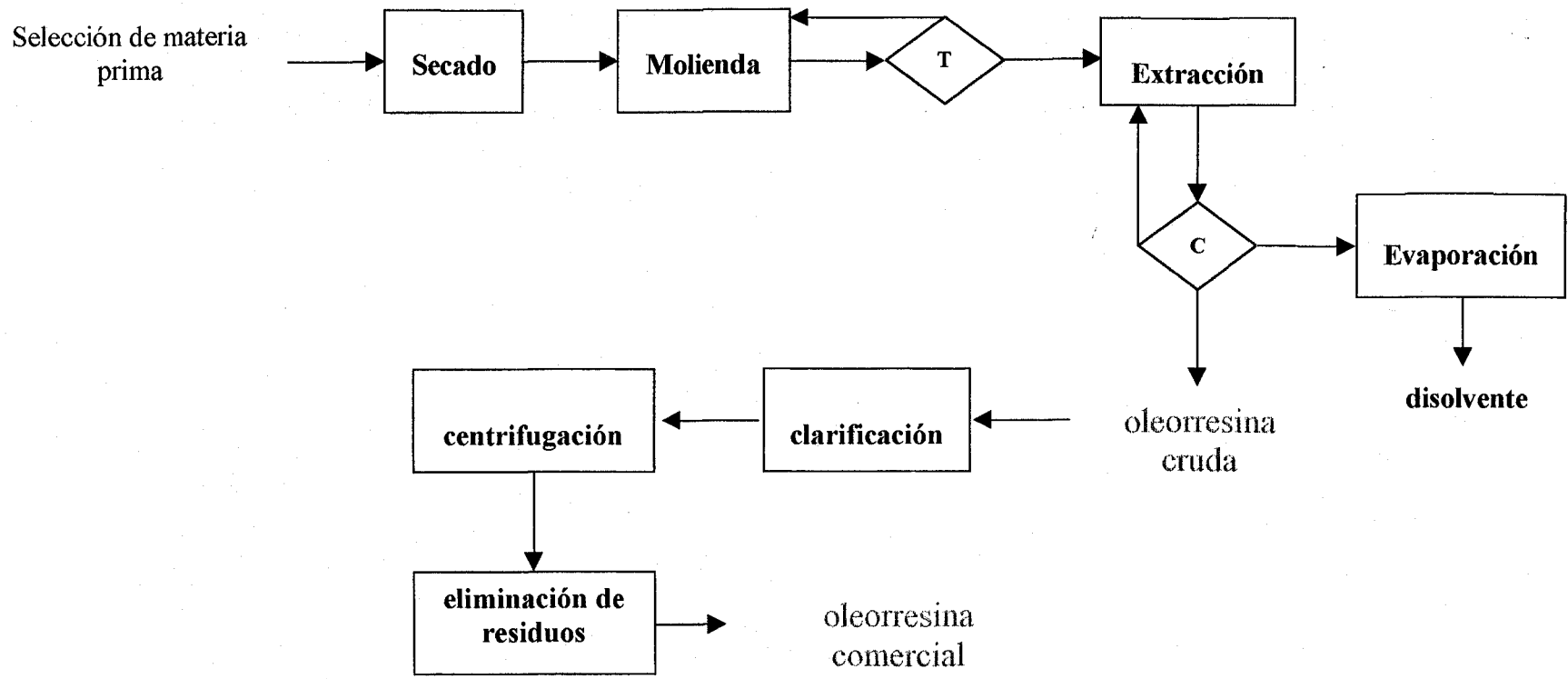


Figura 15.- Operaciones básicas del proceso de obtención de oleorresina de pimentón. Puntos de recirculación en T: tamaño de partícula inferior a 400 μm y C: porcentaje de color extraído que se fija en un 96%.

El polvo obtenido se aglomera mediante rodillos para obtener láminas de 0,15 a 0,25 mm de espesor, para conseguir que el disolvente de extracción moje a una velocidad uniforme toda la materia a procesar, mejorando el proceso de extracción.

Extracción.

La elección del disolvente de extracción se basa en la capacidad de éste para extraer los pigmentos, y en su caso los capsaicinoides. Éter, hexano, acetona y cloruro de metileno son usados por sus buenas características de extracción. Sin embargo también hay que considerar la facilidad para eliminar el disolvente del extracto (junto con su recuperación). Acetona deja residuos de difícil eliminación, mientras que para éter, además de su extrema inflamabilidad, su recuperación implica mayores costes. Cloruro de metileno y hexano son los más frecuentemente utilizados.

Cofield (1951) describe un extractor continuo similar al usado en la elaboración de oleorresina de pimentón, con una capacidad de 25 toneladas/día y diseñado para el manejo de disolventes altamente inflamables. Sin embargo, puesto que la velocidad y límite de extracción son criterios importantes que marcan la economía del proceso, se prefiere el uso de procesos en lotes en los que la materia prima se somete a extracciones sucesivas cuyo número depende de la cantidad de color remanente en el residuo. Generalmente se realizan tres extracciones. En la primera la extracción del color es rápida, (25% del color se extrae en unos 15 minutos), mientras que la segunda, de 40 minutos reduce el color hasta un 15%. En la tercera extracción, la más larga (hasta 250 minutos) se agota el color hasta un 4%. Se ha extraído un 96% del color en un periodo de 5 horas. El proceso de extracción continuo alcanza el mismo límite pero en 4 horas.

Eliminación del disolvente.

Previo a la eliminación del disolvente se procede a la filtración para la eliminación de residuos sólidos. La concentración tiene lugar en evaporadores verticales a una presión de 140 torr. Tras este proceso se obtiene una oleorresina cruda, todavía con un 1 a un 4% de disolvente. Posteriormente la oleorresina se clarifica para eliminar los mucílagos, ceras, proteínas, azúcares, que podrían precipitar durante el almacenamiento del producto. Para ello la oleorresina cruda se trata con disolución acuosa de ácido acético al 17% (en relación volumétrica 1:3) y posterior centrifugación para separar el sedimento formado, neutralizando con agua y centrifugando de nuevo.

Los residuos de disolvente se eliminan después de esta operación de clarificación, en evaporadores que trabajan a presiones de 0,01-0,001 torr. Esta etapa es fundamental para cumplir la reglamentación en cuanto al uso de disolventes y residuos máximos permitidos en los productos alimenticios o en los ingredientes extraídos. En España la normativa vigente se corresponde con el Real Decreto 472/1990 (BOE, 1990) y el Real Decreto 226/1994 (BOE, 1994). Se permite un máximo de 1 mg/kg de hexano y 0,02 mg/kg de diclorometano.

Procesos de extracción alternativos.

La tendencia de las normativas en cuanto al empleo de disolventes de extracción ha sido la reducción del límite de residuos de disolvente permitido lo que indica que en el futuro se prohibirá el uso de disolventes orgánicos de extracción tales como el hexano y el diclorometano, imponiendo un cambio en el proceso de producción de oleorresinas de pimentón y otros productos.

Al margen de la normativa, se justificará el uso de otros procesos por el coste del procedimiento actual y las modificaciones que sufre el producto durante el prolongado tratamiento necesario para la eliminación de los residuos de disolvente hasta llegar al límite máximo permitido. Sobre todo, las condiciones de temperatura y el tiempo de tratamiento provocan pérdidas en la composición carotenoide y reacciones de isomerización que hacen disminuir el valor comercial del producto, al margen de que esas condiciones originen reacciones degradativas en el medio oleoso que, posteriormente, provoquen una merma en la fracción de pigmentos durante el almacenamiento (Govindarajan, 1983).

En 1975, Meerov y colaboradores describen un proceso de obtención de oleorresina de pimentón empleando dióxido de carbono líquido. Este proceso tiene la ventaja de poder realizarse en continuo y el dióxido de carbono carece de toxicidad, no deja residuos tras su eliminación y económicamente es muy ventajoso. Sin embargo plantea dos dificultades, la escasa solubilidad del soluto y la restricción del proceso a las condiciones de presión y temperatura en las que el gas está licuado.

Para salvar estos inconvenientes se planteó el uso de dióxido de carbono altamente comprimido (fluido supercrítico). De esta forma se aumenta la solubilidad y además es posible trabajar en un cierto rango de presión y temperatura. Como consecuencia de este margen en las condiciones de trabajo, es posible seleccionar la fracción de componentes extraídos ajustando la

presión y temperatura de trabajo. En el estudio de las condiciones de trabajo se centran las investigaciones para desarrollar esta técnica de extracción, investigaciones que han dado lugar a diversas patentes y publicaciones (Mohri y colaboradores, 1993; Skerget y colaboradores, 1998).

- Estabilidad de pigmentos carotenoides en oleorresinas de pimentón.

En un producto cuyo valor comercial depende de la capacidad colorante y ésta del contenido carotenoide es importante aplicar unas condiciones de procesado que no alteren la composición en pigmentos ni promuevan reacciones degradativas, que garanticen dicha composición durante el periodo de almacenamiento del producto. La oleorresina de pimentón, como producto, no se utiliza inmediatamente después de su obtención sino que se almacena, utilizando la cantidad requerida para el proceso industrial. En los procesos industriales que necesitan un aporte de color o corregirlo, en alguna de sus etapas y que emplean oleorresinas de pimentón se debe tener en cuenta las condiciones de tratamiento a las que se somete el producto puesto que la pigmentación añadida se afectará por dichas condiciones.

En el trabajo publicado por Jarén-Galán y colaboradores, 1999, se proporciona una ecuación de predicción de la estabilidad de la capacidad colorante de oleorresinas. Para llegar a esa ecuación, se realizó un estudio cinético y termodinámico de la degradación térmica de oleorresinas determinando la pérdida en pigmentos, realizando un seguimiento de la reacción de degradación por medida espectrofotométrica de la capacidad colorante total. El estudio termodinámico habilitó la consecución de una ecuación basada en los parámetros entalpía y entropía de activación. Con esta ecuación se puede predecir la capacidad colorante de una oleorresina a un tiempo de almacenamiento dado. El uso de los parámetros termodinámicos entalpía y entropía de activación evita el uso de la temperatura en la ecuación de predicción, pero hace necesario determinar previamente los mencionados parámetros. En este estudio se propone un método para calcularlos y además se comprueba la validez de las ecuaciones propuestas.

I. MATERIA PRIMA.

Las muestras de pimiento fresco, deshidratado y semillas empleadas para el estudio, son de la variedad *Jaranda*, que se emplea como cultivar en la comarca de La Vera (Cáceres) desde 1992 (Rodríguez y colaboradores, 1993). El fruto fresco es, morfológicamente, similar a la variedad *Agridulce*, de 15 cm de largo, de forma triangular estrecha y sección circular con ápice agudo. El espesor del pericarpio es muy pequeño y destaca por su alta concentración carotenoide (hasta 8 gramos de pigmentos totales por kilogramo de fruto deshidratado) y nula presencia de capsaicinoides (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1999). Los frutos se desecan según el método tradicional extendido en la comarca, secado lento empleando como fuente de calor la combustión de leña de encina o roble.

Las muestras de oleoresina de pimentón, fueron suministradas por las empresas Extractos Vegetales S. A. (La Línea de la Concepción, Cádiz) y Extract-oil S. A. (Cartagena, Murcia). Las seis oleoresinas empleadas tienen el mismo perfil carotenoide pero se distinguen por su capacidad colorante debido a diferencias en la materia prima y a distintas condiciones de extracción empleadas para su elaboración.

Las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) con alto contenido en ácido oleico proceden de la finca Cortillo (Écija, Sevilla) cv. *Sambro*. Ésta, al igual que el resto de variedades de girasol alto oleico fue obtenida por mutagénesis química (Soldatov, 1976) y posteriormente mejoradas por varios grupos de investigación entre los que destaca el de Mancha y colaboradores (Harwood, 1996).

La descripción del aceite de los frutos de pimiento y semillas de la variedad *Jaranda*, (composición en ácidos grasos y α -tocoferol) se realizó en un trabajo previo (Pérez-Gálvez y colaboradores, 1999). Los resultados se exponen en la Tabla 1. Con la misma metodología descrita en dicho trabajo se determina la composición del aceite en las semillas de girasol utilizadas (Tabla 1). Los sustratos difieren en la riqueza grasa, mostrando las semillas de girasol la más alta (50%) seguida de las semillas de pimiento (18%) y finalmente el fruto deshidratado con un 3%.

Tabla 1.- Composición media en ácidos grasos y niveles de α -tocoferol del aceite de frutos de pimiento deshidratado, sus semillas (*Capsicum annuum* L.) cv. *Jaranda* y semillas de girasol alto oleico (*Helianthus annuus* L.) cv. *Sambro*.

ácido graso	Fruto deshidratado		Semilla de pimiento		Semilla de girasol	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
láurico (12:0)	0,8	3,0	- ^a	0,0	-	0,0
dodecenoico (12:1)	0,2	1,0	-	0,0	-	0,0
mirístico (14:0)	2,3	9,1	1,1	0,1	0,3	0,1
palmitico (16:0)	5,0	20,1	96,1	10,9	29,1	4,2
palmitoleico (16:1)	0,3	1,1	2,0	0,2	1,1	0,2
esteárico (18:0)	1,1	4,2	25,7	2,9	-	0,0
oleico (18:1)	3,2	12,8	70,7	8,0	607,7	86,5
linoleico (18:2)	5,9	23,6	685,2	77,4	62,7	8,9
linolénico (18:3)	6,1	24,4	2,8	0,3	0,3	0,1
araquídico (20:0)	0,2	0,8	2,1	0,2	1,5	0,2
α -tocoferol (mg/kg)	356,1		755,2		264,7	

^a -, no detectado.

II. MÉTODOS.

1.- Análisis de la composición en pigmentos carotenoides.

- Extracción.

El análisis de la composición carotenoide en las mezclas de fruto deshidratado y semillas requiere una etapa de extracción con disolvente orgánico. La cantidad de muestra a analizar se modifica en función del avance de reacción alcanzado, siendo de 1 gramo al principio de la reacción de oxidación y de 2 gramos en las etapas finales de la misma. La muestra se homogeneiza con 50 mL de acetona (para análisis) extrayendo la pigmentación. El homogeneizado se filtra a vacío recogiendo el filtrado en el kitasato y el residuo sólido en el buchner, cuya pigmentación se agota en sucesivas extracciones con 50 mL de acetona. El filtrado que contiene la pigmentación carotenoide se pasa a un embudo de decantación y se añaden 150 mL de éter etílico (para análisis) y 200 mL de disolución de NaCl al 10% (p/v), transfiriendo la pigmentación de la fase acuosa a la orgánica. La fase acuosa se separa a otro embudo, recuperando pigmentación de la misma si la hubiera, repitiendo el proceso anterior. Todas las fases orgánicas, con la pigmentación, se reúnen en un mismo embudo y se lavan varias veces con 200 mL de disolución de Na₂SO₄ al 2% (p/v).

Esta etapa previa de extracción no es necesaria en el análisis de la composición carotenoide en muestras de oleorresina que se disuelven directamente en 150 mL de éter etílico (para análisis) para proceder a la desesterificación. La mayor concentración de pigmentos en las oleorresinas permite reducir el tamaño de la muestra a 0,03 gramos.

- Desesterificación.

Al extracto de pigmentos disuelto en éter etílico se adicionan 50 mL de disolución de hidróxido potásico en metanol (para análisis) al 10% (p/v), agitando suavemente cada 15 minutos hasta completar una hora de reacción. Finalizado el proceso de desesterificación, la fase orgánica se lava con agua destilada, hasta neutralidad, y con la precaución de recuperar la pigmentación que pueda pasar a la fase acuosa. Una vez conseguida la neutralización, la fase orgánica se lava varias veces con 200 mL de disolución de Na₂SO₄, al 2% (p/v) y se filtra, a través de un lecho de Na₂SO₄ sólido, en un matraz de rotavapor. Se evapora el éter en un

rotavapor, y el residuo se disuelve en 10 mL de acetona (para cromatografía líquida). Del extracto final se toma 1 mL, que se conserva a 253 K y en ausencia de luz.

- Separación y cuantificación de pigmentos carotenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para determinar la concentración carotenoide individual del extracto final obtenido se emplea el método de patrón interno. En este caso se utiliza β -apo-8'-carotenal, ausente del perfil carotenoide del pimiento y que se adiciona antes de proceder a la desesterificación de la muestra. Se añade una alícuota de la disolución patrón en éter de petróleo ligero 40-60 °C (para cromatografía líquida) de concentración 150-200 $\mu\text{g/mL}$. La cantidad exacta a añadir, depende de la concentración carotenoide de la muestra. A modo orientativo los niveles de absorbancia de patrón interno deben ser similares a los del pigmento más cercano en elución, β -criptoxanteno.

El sistema de HPLC está equipado con una columna de fase reversa C18, en la que se realiza la separación cromatográfica. La columna tiene 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno (d. i.) y está rellena con Spherisorb ODS2 (5 μm de tamaño de partícula). Una precolumna (50 mm \times 4 mm d. i.) del mismo material se utiliza para proteger a la columna principal. Se inyectan 20 μL de muestra y como eluyentes se emplean acetona y agua desionizada (para cromatografía líquida) a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. El programa de gradiente empleado se muestra en la Tabla 2. La detección de los picos cromatográficos se realiza a $\lambda=450$ nm. En la Figura 16 se representa un cromatograma correspondiente a un extracto desesterificado de pimentón, junto con la asignación de picos cromatográficos según el trabajo publicado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993.

2.- Obtención de patrones.

- Preparación del extracto.

Las disoluciones patrón de zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno se obtienen a partir del extracto desesterificado, obtenido mediante la extracción y desesterificación de 100 gramos de pimiento fresco troceado, libres de pedúnculos y semillas. En este caso se parte de mayor cantidad de materia a extraer, para obtener una disolución madre (extracto desesterificado) concentrada en pigmentos, para las posteriores operaciones de separación y purificación mediante cromatografía en capa fina (TLC).



Tabla 2.- Programa de gradiente empleado en la separación de pigmentos carotenoides de un extracto saponificado de pimiento, pimentón u oleoresina.

tiempo (min)	% acetona	% agua	curva
10 (eq) ^a	75	25	
5	75	25	
5	95	5	lineal
7	95	5	
5	100	0	convexa
5	75	25	lineal

^a eq, etapa de acondicionamiento.

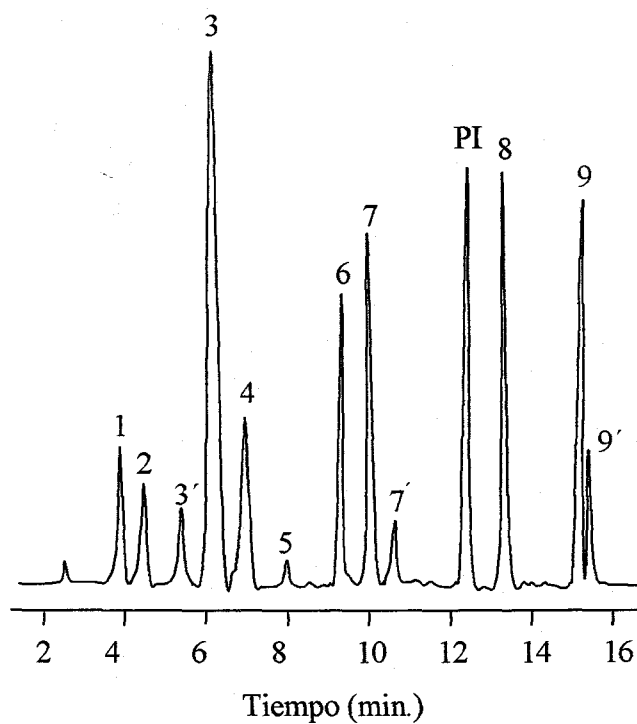


Figura 16.- Cromatograma de un extracto saponificado de pimentón. Asignación de picos: (1) capsorrubeno; (2) violaxanteno; (3) capsanteno; (3') capsanteno-5,6-epóxido; (4) *cis*-capsanteno; (5) mutatoxanteno; (6) cucurbitaxanteno A; (7) zeaxanteno; (7') *cis*-zeaxanteno; (8) β -criptoxanteno; (9) β -caroteno; (9') *cis*- β -caroteno; (PI) β -apo-8'-carotenal.

Asimismo se obvia la adición de patrón interno puesto que la cuantificación de cada disolución patrón se realiza por medida espectrofotométrica directa. Para obtener disoluciones patrón de zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno diesterificados es necesario un extracto completo de pigmentos, aplicando los mismos procedimientos anteriores pero omitiendo la etapa de desesterificación. Se obtiene por tanto otra disolución madre (extracto completo) concentrada en pigmentos esterificados.

De ambos extractos se puede obtener la disolución patrón de β -caroteno puesto que este pigmento no puede presentar formas esterificadas.

- Cromatografía en capa fina (TLC).

La separación carotenoides se realiza mediante TLC. Para ello, placas de vidrio (20 cm \times 20 cm) se revisten de una capa de gel de sílice 60 GF₂₅₄ de 0,7 mm de espesor, dejándolas secar al aire y activándolas durante una hora en estufa a 393 K antes de su empleo. De la disolución madre se toma una alícuota de 200 μ L y se cromatografía utilizando como eluyente la mezcla hexano - acetato de etilo - metanol - acetona (95:3:2:2) (para cromatografía líquida) si se trata del extracto completo y éter de petróleo 65-95 °C - acetona - dietilamina (10:4:1) (para cromatografía líquida) si se trata del extracto desesterificado. Completado el desarrollo en la placa, se selecciona la banda de interés, se rasca y se disuelve en acetona (para análisis) filtrando para eliminar la sílice. Las características del cromatograma de TLC partiendo tanto del extracto completo como del extracto desesterificado, están publicadas por Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1984 y Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993. El orden en elución de los pigmentos seleccionados para el estudio, partiendo de ambos tipos de extracto es el mismo: β -caroteno se encuentra al frente del cromatograma, posteriormente zeaxanteno (en forma diesterificada o en forma libre), capsanteno (en forma diesterificada o en forma libre) y capsorrubeno (en forma diesterificada o en forma libre). La operación de cromatografiar, eluir, raspar y filtrar se repite hasta obtener la cantidad de pigmento requerida. La disolución de cada pigmento se vuelve a cromatografiar en las mismas condiciones para comprobar su pureza. El disolvente en el que finalmente se diluye cada pigmento es benceno (para cromatografía líquida). De esta forma se obtienen disoluciones patrón de cada pigmento bien en su forma libre bien en su forma esterificada, que son almacenadas a 253 K y en ausencia de luz.

- Cuantificación espectrofotométrica de la disolución patrón de pigmento.

Cada disolución de pigmento se cuantifica mediante la medida espectrofotométrica de su absorbancia, registrándola a la longitud de onda máxima (λ_{max}). Para una correcta correlación de la ley de Lambert-Beer, la medida debe situarse entre 0,2 y 0,8 unidades de absorbancia. A través de la ecuación que verifica la ley anterior (E-1), una vez medida la absorbancia (A) y, utilizando el coeficiente de extinción adecuado (ϵ) para cada pigmento (Davies, 1971), se obtiene la concentración de pigmento en la disolución (c).

$$c(g/mL) = \frac{A(\lambda_{max})}{\epsilon \times 100} \quad E-1$$

III. PLANTEAMIENTO DE LAS EXPERIENCIAS.

1.- Oxidación de pigmentos carotenoides en forma libre o esterificada. Evaluación de su capacidad antioxidante.

La reacción de oxidación de pigmentos carotenoides provocada por un iniciador de radicales libres se analiza determinando la pérdida de color del pigmento en la región visible del espectro. Los reactivos que sirven de fuente de radicales libres pueden ser no enzimáticos y enzimáticos y se resumen en la Tabla 3. De todos ellos, los más frecuentemente utilizados son los azo compuestos 2,2'-azobis-isobutironitrilo (AIBN) y 2,2'-azobis-(2,4'-dimetilvaleronitrilo) (AMVN), cuya descomposición térmica a 310 K genera radicales peroxilo. Se puede hacer reaccionar directamente una mezcla de iniciador con pigmento, o bien adicionar disoluciones de metil linoleato, metil oleato, fosfatidilcolina, provocando su peroxidación con el iniciador.

En ambos casos se determina la capacidad antioxidante del pigmento, empleándose el primer método (el de reacción directa) para evaluar los parámetros cinéticos y la influencia de las características estructurales del pigmento en su capacidad antioxidante, mientras que el segundo método emula la oxidación de pigmentos en sistemas biológicos y permite evaluar la inhibición de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos componentes de las membranas celulares.

En cualquier caso un factor adicional a controlar sería la presión parcial de oxígeno en el sistema de reacción, puesto que el efecto global, antioxidante o prooxidante que el pigmento carotenoide ejerce en el medio, depende de dicho factor. Este factor adquiere especial importancia si se pretende evaluar la inhibición de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos. En estos casos se escoge una presión parcial de oxígeno, que reproduzca la que habitualmente hay en los tejidos y membranas celulares (15-150 torr). Sin embargo, cuando se realiza un estudio de oxidación de pigmentos carotenoides con radicales libres es acertado llevarlo a cabo en sistemas abiertos.

De esta forma, al realizar la reacción en condiciones en las que se conjugan los dos efectos, antioxidante y prooxidante, se ponen de manifiesto las posibilidades reales que, como antioxidante, tiene cada pigmento. Aquel que ejerza una acción antioxidante efectiva incluso en condiciones "adversas" tanto más lo será en aquellos sistemas de presión parcial de oxígeno baja.

Tabla 3.- Iniciadores de radicales empleados para la decoloración o formación de productos de oxidación de pigmentos carotenoides.

Iniciador de radicales ^a	Especies radicalarias	Medida	
		Decoloración	Productos de oxidación
No enzimático			
AIBN	R. peroxilos	+	
AMVN	R. peroxilos		+
NaOCl	R. oxígeno		+
<i>t</i> -BOOH	<i>t</i> -BOO•	+	
TPPO	oxígeno singulete		+
CCl ₄	CCl ₃ O•	+	
Enzimático			
Lipoxidasa	n.d. ^b	+	
Peroxidasa	n.d.		
Lactoperoxidasa	n.d.	+	
Mieloperoxidasa	n.d.	+	

^a AIBN, 2,2'-azobis-isobutironitrilo; AMVN, 2,2'-azobis-(2,4' dimetilvaleronitrilo); *t*-BOOH, hidroperóxido de tertbutilo; TPPO, trifenilfosfito ozonida.

^b n.d., no se ha demostrado que su acción implique la formación de especies radicalarias.

Los pigmentos, cuya capacidad antioxidante se evalúa son zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno en sus formas libres y esterificadas y β -caroteno. La concentración de la disolución de pigmento a emplear se sitúa en torno a 30 mM. Como reactivo iniciador se emplea una disolución de AIBN en benceno (para cromatografía líquida) de concentración 160 M. La reacción se verifica en un tubo de ensayo abierto de vidrio Pyrex, inmerso en un baño termostataado a 310 K tomando 3 mL de la disolución madre de pigmento y adicionando 7 mL de reactivo iniciador, precalentado durante 1 minuto. La cantidad de reactivo iniciador añadido es más que suficiente para completar la oxidación del pigmento.

Las cantidades anteriores se pueden modificar en función de la concentración exacta de la disolución patrón de pigmento. En cualquier caso, la proporción de ambos reactivos debe ser siempre la misma para garantizar homogeneidad en las condiciones experimentales y obtener una disolución (mezcla de ambos reactivos) cuya absorbancia esté en torno a 0,8 unidades. Una vez realizada la mezcla, a cada intervalo de tiempo seleccionado se retira una alícuota del medio de reacción y se determina el valor de la absorbancia. Se utilizan intervalos de tiempo de 1 minuto, además de una toma inicial a los 0,5 minutos, hasta completar un periodo total de reacción no superior a 12 minutos. A cada punto en la escala de tiempo se determinan ocho datos de absorbancia. Se realizan por tanto 104 medidas para cada pigmento evaluado, lo que implica un total de 728 determinaciones.

Estas condiciones experimentales son las empleadas en diversos estudios de evaluación de la capacidad antioxidante de pigmentos carotenoides (Terao, 1989; Woodall y colaboradores, 1997; Martin y colaboradores, 1999).

Los datos de absorbancia se transforman con la ecuación E-1 a datos de concentración. Posteriormente, empleando la concentración inicial de pigmento en la mezcla reactante, se determina el porcentaje de pigmento remanente (porcentaje de retención) que es el formato de datos empleado para los posteriores estudios cinéticos.

2.- Influencia del sustrato lipídico en la velocidad de oxidación de pigmentos carotenoides. Condiciones experimentales.

El concentrado de pigmentos con el que se trabaja es una mezcla de fruto de pimiento deshidratado y semillas en distintas proporciones. La naturaleza del sustrato lipídico (poliinsaturada o monoinsaturada) aportado por las semillas es lo que se modifica. Para ello, los

frutos deshidratados se trocean, separando pericarpio, pedúnculo y semillas. Se pesan las cantidades adecuadas de pericarpio de pimiento seco y sus semillas para obtener mezclas que contengan un 20%, 40% y 60% de sustrato poliinsaturado en peso. De todas ellas la que representa a un pimentón comercial es la mezcla del 40%, disponiendo por tanto de una mezcla de contenido en semillas superior y otra inferior al normal. El fruto deshidratado y las semillas se molturan en un molino de martillos obteniendo aproximadamente 100 gramos de cada mezcla con un tamaño de partícula inferior a 500 μm .

Las mezclas de fruto deshidratado y semillas de girasol (sustrato monoinsaturado) se elaboran de igual forma, eliminando la cáscara de las semillas para emplear sólo el germen. Se elabora una mezcla al 40%, para establecer diferencias o similitudes con aquella mezcla que representa a un pimentón comercial y, además, una mezcla de contenido en semillas al 20%. Se muelen las cantidades adecuadas para obtener 100 gramos de cada mezcla.

Además se moltura el pericarpio seco (100 gramos) para obtener un “pimentón” exento de semillas que servirá de referencia para determinar el efecto que produce la adición de semillas de uno y otro tipo en la estabilidad de pigmentos carotenoides. En la Tabla 4 se muestra la composición carotenoide individual de cada mezcla elaborada, tanto con semillas de pimiento como con semillas de girasol, así como la de referencia.

Para determinar la influencia del entorno lipídico en la velocidad de oxidación de los pigmentos carotenoides, se realiza un tratamiento térmico sobre las distintas mezclas. La temperatura más adecuada para el estudio de estabilidad se determinó en función de tres requisitos:

1. Al ser la composición carotenoide del pimiento una mezcla compleja que comprende hasta siete pigmentos diferentes (sin contar isómeros y epóxido) la evolución degradativa no necesariamente es uniforme, mostrando cada uno de ellos una estabilidad diferente. A la temperatura de ensayo se le exige que la distribución de datos sea lo más homogénea posible.
2. Posibilidad de detectar otras reacciones al margen de la degradación carotenoide, que pudieran tener lugar, principalmente isomerizaciones y formación de epóxidos.
3. Obtención de datos de evolución de concentración carotenoide, en tiempos de ensayos razonables.

Tabla 4.- Composición carotenoides de las mezclas de fruto deshidratado y semillas elaboradas.

	sustrato poliinsaturado ^a				sustrato monoinsaturado ^a	
	0%	20%	40%	60%	20%	40%
capsorrubeno	250,4 ^b	202,9	154,2	106,8	215,7	180,8
violaxanteno	280,8	241,8	169,5	115,3	230,5	142,8
5,6-epóxido capsanteno	212,5	205,1	104,0	212,5	151,3	110,0
capsanteno	1475,2	1161,9	893,0	644,6	1173,5	873,0
<i>cis</i> -capsanteno	301,5	298,1	217,1	142,3	275,9	212,5
mutatoxanteno	13,5	- ^c	-	-	-	-
cucurbitaxanteno A	300,6	194,6	170,0	100,5	211,2	169,5
zeaxanteno	315,0	237,8	181,1	132,0	259,6	179,1
<i>cis</i> -zeaxanteno	46,6	33,7	29,4	20,1	43,1	31,0
β -criptoxanteno	329,4	257,3	184,1	138,3	263,6	192,8
β -caroteno	291,5	236,8	163,0	114,8	244,7	174,0
<i>cis</i> - β -caroteno	83,0	67,9	48,2	35,5	63,5	27,4
fracción roja ^d	2239,6	1868,0	1368,3	1106,2	1816,4	1376,2
fracción amarilla	1660,4	1269,9	945,3	656,5	1316,2	916,6
total	3900,0	3137,9	2313,6	1762,7	3132,6	2292,8

^a el sustrato poliinsaturado se corresponde con semillas de pimienta; el sustrato monoinsaturado se corresponde con semillas de girasol alto oleico.

^b valor medio, n=4.

^c -, no detectado.

^d fracción roja = capsorrubeno + 5,6-epóxido capsanteno + capsanteno + *cis*-capsanteno. Fracción amarilla = violaxanteno + cucurbitaxanteno A + mutatoxanteno + zeaxanteno + *cis*-zeaxanteno + β -criptoxanteno + β -caroteno + *cis*- β -caroteno. Total = fracción roja + fracción amarilla.

Por ensayos previos (Pérez-Gálvez y Garrido-Fernández, 1997), se determinó que la temperatura que más se acoge a los requisitos previos es la de 343 K. Cada mezcla de fruto deshidratado y sustrato lipídico (en las distintas proporciones consideradas) se dispone sobre una placa Petri y se procede a su almacenamiento en estufa a la temperatura de 343 K, constante durante todo el ensayo. Al principio de la experiencia se realiza el muestreo cada 24 horas, pasando a intervalos superiores (48, 72 y 96 horas) en una etapa intermedia. Las dos últimas tomas se realizan a intervalos superiores (168 y 216 horas). De esta forma se consigue un seguimiento de la reacción de degradación completando como mínimo un avance del 80% de la misma.

El número total de datos temporales en la reacción de oxidación es de 14 y de cada uno se realiza un muestreo por cuadruplicado, lo que implica un número total de 56 análisis en cada mezcla ensayada. El peso de muestra también se modifica, puesto que la concentración en pigmentos decrece durante el transcurso de la reacción. Inicialmente se pesa en torno a 1 gramo de muestra y se aumenta progresivamente hasta pesar 2 gramos al final de la experiencia. La muestra se introduce en un frasco topacio, adicionando 50 mL de acetona - agua (75:25, para análisis), conservándose bajo refrigeración (253 K) y en oscuridad hasta su posterior análisis.

3.- Influencia de la temperatura sobre la velocidad de oxidación de pigmentos carotenoides.

Condiciones experimentales.

Las experiencias se realizan con seis oleorresinas de pimentón lo que supone el manejo de un gran número de muestras, lo que unido al proceso de análisis, que incluye desesterificación y cuantificación cromatográfica del extracto, implica un tiempo de procesado amplio. Ello supone realizar la experiencia de forma que se pueda almacenar el conjunto de muestras hasta su análisis. Para ello 200 gramos de cada oleorresina se vierten sobre varios conos Eppendorf (1,5 mL de capacidad) y éstos se introducen en la estufa donde se someten a temperatura constante.

Una vez comenzada la experiencia, a los intervalos de tiempo seleccionados, se toma un cono Eppendorf de cada oleorresina, que contiene cantidad de muestra suficiente para su análisis y se almacenan a 253 K.

En la Tabla 5 se muestra la composición carotenoide individual de las seis oleorresinas empleadas.

Tabla 5.- Composición carotenoides individual y agrupada por fracciones isocrómicas de las seis oleorresinas empleadas para el estudio de oxidación.

pigmento	oleorresina					
	1	2	3	4	5	6
capsorrubeno	2413,7 ^a	2301,6	1559,7	3363,4	805,9	3436,1
violaxanteno	3326,2	2614,5	1139,1	4050,0	- ^b	3925,2
5,6-epóxido capsanteno	2081,8	2171,7	1373,9	3683,6	-	3606,1
capsanteno	34138,0	16122,3	12947,4	31147,3	7337,6	20158,7
<i>cis</i> -capsanteno	16276,0	7877,8	6427,3	16253,3	3223,1	11055,2
mutatoxanteno	1688,8	715,3	625,1	1611,2	-	1717,1
cucurbitaxanteno A	7167,3	3554,0	2818,1	7284,5	-	5538,2
zeaxanteno	10690,4	4495,1	3103,1	7673,1	2003,0	6957,5
<i>cis</i> -zeaxanteno	3289,0	1270,7	978,1	2357,3	699,1	1206,7
β -criptoxanteno	7637,2	4269,2	2311,5	5546,5	1580,5	4468,6
β -caroteno	7565,2	4529,5	2606,6	5233,6	1554,9	7054,0
<i>cis</i> - β -caroteno	2646,4	889,5	386,4	1382,0	496,8	472,6
fracción roja ^c	54909,3	28473,3	22308,2	53447,6	11366,6	38256,0
fracción amarilla	44010,5	22337,7	13967,9	35138,2	6334,4	31339,8
total	98919,8	50811,0	36276,1	88585,8	17700,9	69595,8

^a valor medio en mg/kg, n=3.

^b -, no detectado.

^c fracción roja = capsorrubeno + 5,6-epóxido capsanteno + capsanteno + *cis*-capsanteno. Fracción amarilla = violaxanteno + cucurbitaxanteno A + mutatoxanteno + zeaxanteno + *cis*-zeaxanteno + β -criptoxanteno + β -caroteno + *cis*- β -caroteno. Total = fracción roja + fracción amarilla.

La elección de las temperaturas a las que se lleva a cabo la oxidación de las muestras, se realiza en base a los siguientes requisitos:

1. En el rango de temperaturas se deben producir cambios en los valores de energía de activación lo suficientemente amplios para ser observados. Por ello se aconseja un rango de temperaturas alto y superior a 353 K. El intervalo de temperatura en cualquier caso será de 10 unidades, para aumentar la probabilidad de observar variaciones en el valor de la energía de activación con la temperatura (Hill y Grieger-Block, 1980).
2. A cada temperatura de ensayo se le exige que la distribución de datos sea lo más homogénea posible.
3. Posibilidad de detectar otras reacciones al margen de la degradación carotenoides que pudieran tener lugar, principalmente isomerizaciones y formación de epóxido.
4. Obtención de datos de evolución de concentración carotenoides, en tiempos de ensayos razonables.

En base a estas premisas y según experiencias previas (Jarén-Galán y colaboradores, 1999), las temperaturas seleccionadas son 373 K, 383 K y 393 K. Cada muestra de oleorresina se somete a estas tres temperaturas obteniendo datos de evolución carotenoides con el tiempo. Los intervalos seleccionados para la toma de muestras son de 24 horas al inicio de la experiencia, 48, 72 y 96 horas en la etapa intermedia y 168 horas al final. El seguimiento de la reacción de degradación se realiza hasta completar como mínimo un avance del 80% de la misma. A la temperatura de 373 K el muestreo incluye 15 puntos temporales. A 383 K el número de muestras es de 13 mientras que es de 11 a la temperatura de 393 K. Cada muestreo se analiza por triplicado. Esto implica un número total (por cada oleorresina) de 45, 39 y 33 análisis a 373 K, 383 K y 393 K respectivamente. El peso de muestra se mantiene constante durante toda la experiencia e igual a 0,03 gramos.

4.- Lista de aparatos utilizados.

- Balanza de precisión, Metler, modelo AE200.
- Baño termostático, Selecta, modelo Unitronic OR.
- Molino de martillos, IKA Lab, modelo Culatti.
- Microcentrífuga, MSE, modelo MicroCentaur.

- Rotavapor, Büchi modelo RE111 y baño de agua Büchi modelo 461.
- Homogeneizador, Janke & Kunkel IKA Lab, modelo Ultraturrax T-25.
- Estufa isoterma, Fisher, modelo Senior.
- Aparato para la elaboración de placas de TLC Southern, modelo Unoplen.
- Espectrofotómetro de diodos UV-Vis, Hewlett-Packard modelo 8452A
- Cromatógrafo Waters equipado con bomba cuaternaria modelo 600E, detector UV-Vis modelo 996 y estación de adquisición y gestión de datos controlada por el programa Millennium, versión 2.0.
- Congelador Liebherr modelo GS 3702.

IV. ESTUDIO DE DATOS.

Los datos experimentales de concentración de pigmentos se expresan en términos de porcentaje de retención, calculando en base a la concentración de la muestra inicial, el porcentaje de pigmento remanente y que por tanto no ha experimentado la reacción de degradación o cualquier otra que haya tenido lugar. De esta forma, la comparación de los datos de evolución en el transcurso de la reacción, se puede llevar a cabo directamente.

Esta expresión de los datos resulta muy útil sobre todo en los estudios de oxidación de pigmentos carotenoides en distintos sustratos lipídicos, puesto que a cada tiempo de reacción seleccionado, se obtiene un perfil completo de la composición en pigmentos de la muestra analizada. En un mismo perfil, la concentración de cada pigmento carotenoide puede ser muy diferente del resto, por lo que expresando la concentración como porcentaje de retención se puede comparar la evolución de cada pigmento en cada perfil. Al manejar muestras de diferente concentración inicial en pigmentos, la expresión de datos en porcentaje de retención permite realizar comparaciones de evolución también entre muestras.

Además de realizar el estudio de la evolución individual y, a pesar de la complejidad del perfil carotenoide, que incluye 7 pigmentos más isómeros *cis* y epóxido 5,6 de capsanteno, se puede abordar el estudio de los datos, agrupando cada pigmento individual en función de su color en el espectro visible, rojo o amarillo. De esta forma se agrupan como *fracción de pigmentos rojos* a capsanteno (incluyendo sus isómeros *cis* y al epóxido 5,6) y capsorrubeno y, al resto de la composición carotenoide como *fracción de pigmentos amarillos*.

Esta división, además de una distinción en base al color, supone una diferenciación estructural importante, puesto que los carotenoides que componen la fracción roja contienen grupos ceto en uno o en los dos extremos de la cadena polienoica, mientras que ninguno de los que conforman la fracción amarilla tienen dicha peculiaridad estructural. La suma de ambas fracciones representa al total de pigmentos (*pigmentos totales*). La determinación de la influencia de la temperatura en la velocidad de degradación carotenoide se lleva a cabo agrupando los datos de composición individual en las fracciones de pigmentos anteriormente mencionadas.



1.- Determinación de la cinética de reacción.

Desde el punto de vista de la capacidad colorante, el conjunto de reacciones de oxidación se convierten en una, en la que el reactante coloreado se transforma en un producto o productos de degradación, exentos de color o de menor capacidad colorante que el reactante inicial. Por ello, aunque la experiencia de oxidación de carotenoides implica varias reacciones de diferentes mecanismos y originando distintos productos de degradación, la reacción a estudiar que se plantea es la siguiente.



La reacción R-1, que incluye reacciones de isomerización, oxidación térmica y oxidación por radicales peroxilo, permite realizar un estudio cinético asequible para dar respuesta al objetivo planteado. Los parámetros cinéticos, orden de reacción, n , y constante cinética, κ , se determinan según el método integral. Este método utiliza un procedimiento de prueba y error, en el que el orden de la reacción de la ecuación de velocidad (E-2), se supone inicialmente.

$$-\frac{dC_P}{dt} = \kappa \times [C_P]^n \quad E-2$$

Supuesto el orden, se integra la ecuación E-2 obteniendo una expresión lineal que relaciona C_P (concentración de pigmentos, expresada en términos de porcentaje de retención) con el tiempo t . A continuación se exponen las ecuaciones integradas para orden $n=0$, $n=1$ y una ecuación genérica para órdenes iguales y superiores a 2.

$$\text{Orden } 0 \quad \%Ret = 100 - \kappa \times t \quad E-3$$

$$\text{Orden } 1 \quad \ln(\%Ret) = 4,605 - \kappa \times t \quad E-4$$

$$\text{Orden } \geq 2 \quad \frac{1}{(n-1) \times (\%Ret)^{n-1}} = \frac{1}{(n-1) \times (100)^{n-1}} - \kappa \times t \quad E-5$$

De la expresión que mejor represente a la evolución de los datos experimentales con el tiempo de reacción, se verifica el orden (supuesto *ab initio*) obteniendo de la misma la constante cinética κ , (Fogler, 1992).

2.- Estudio termodinámico de la oxidación de pigmentos carotenoides.

Para determinar la influencia de la temperatura en la velocidad de oxidación de pigmentos carotenoides, además del estudio cinético (realizado de igual forma que en el apartado 4), se aborda un estudio termodinámico, al disponer de valores de la constante cinética κ , a diferentes temperaturas (T). De dicho estudio se obtienen los parámetros termodinámicos, energía de activación (E_A) y factor preexponencial (A) empleando la expresión de Arrhenius (E-6, R = constante de los gases ideales).

$$\kappa = A \times e^{-\frac{E_A}{R \times T}} \quad E-6$$

Tomando logaritmo en base e en la ecuación E-6 se obtiene la expresión lineal que relaciona κ y T (E-7).

$$\ln \kappa = \ln A - \frac{E_A}{R} \times \frac{1}{T} \quad E-7$$

La representación gráfica de $\ln \kappa$ frente al inverso de T debe ser una línea recta de cuya pendiente se obtiene E_A y de la ordenada en el origen, se deduce el factor preexponencial A .

3.- Análisis estadístico de los resultados.

El programa de cálculo utilizado es Statistica versión 5.1 (Statsoft Inc.), que permite realizar análisis estadístico de datos y análisis de regresión lineal, así como las correspondientes representaciones gráficas.

- Modelos cinéticos.

En principio cualquier modelo de los presentados debe ser significativo, pues todos ellos incluyen las variables porcentaje de retención y tiempo que son variables correlacionables. Se escoge aquel modelo que mejor represente a los datos experimentales, lo que se deduce según el

valor del coeficiente de correlación. Aquel modelo que presente un coeficiente de correlación más alto es el elegido. La significación empleada en todos los casos es $p < 0,05$.

- Comparación entre constantes cinéticas.

Una vez deducido el modelo, se realiza la comparación entre los valores de las constantes cinéticas para determinar si el factor, en torno al cual se agrupan y cuya influencia se quiere determinar, marca diferencias significativas, para lo cual se efectúan pruebas de t con una significancia $p < 0,05$.

I. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES Y SU VELOCIDAD DE OXIDACIÓN.

La propiedad nutricional más importante de los pigmentos carotenoides es su actividad de provitamina A que algunos de ellos, como β -caroteno y β -criptoxanteno, muestran (Simpson, 1983). Sin embargo todos los pigmentos carotenoides manifiestan, en mayor o menor grado, su capacidad como antioxidantes, siendo ésta una de sus propiedades más estudiadas, atendiendo tanto a su mecanismo de acción como a los beneficiosos efectos que genera dicha capacidad, entre ellos su relación con la prevención y disminución de cánceres y otras enfermedades degenerativas en las que pueden estar implicados radicales libres (Ames, 1983). Las características estructurales de los pigmentos carotenoides son las que posibilitan que éstos muestren su capacidad antioxidante, principalmente la cadena carbonada polienoica que permite, mediante mecanismos de adición, la incorporación de radicales libres o especies reactivas, frenando la cadena de propagación que extiende dichos radicales (Liebler, 1993).

Este proceso de ruptura de la cadena de propagación radicalaria implica la destrucción del pigmento, puesto que la secuencia de dobles enlaces alternados se interrumpe al producirse la adición, disminuyendo paulatinamente su concentración, con la consecuente pérdida de color. A pesar de la complejidad que el estudio de todo proceso de acción radicalaria tiene, diferentes autores coinciden en que tras el proceso de adición del radical libre a la estructura del pigmento, la mayor o menor estabilidad de la especie intermedia que se forma, condiciona la efectividad de la acción antioxidante, puesto que se pueden generar de forma inmediata nuevas especies radicalarias al medio, lo que provocaría un aumento de la velocidad con que la concentración carotenoide disminuye, poniéndose de manifiesto acciones prooxidantes que contrarrestan la efectividad antioxidante. De hecho, varios estudios comparativos aportan algunos de los factores condicionantes de la estabilidad de dicha especie intermedia, entre ellos la presencia de diversos grupos funcionales así como de nuevos sitios reactivos en la estructura del pigmento, localizados en los anillos de la misma.

Los resultados obtenidos por Terao en 1989 y por Miki en 1991, ponen de manifiesto que la presencia de grupos funcionales ceto en las posiciones C4 y C4', presentes en astaxanteno y cantaxanteno, mejora la eficiencia de la capacidad antioxidante del pigmento bien porque dichos grupos ceto contribuyan a estabilizar la especie radicalaria intermedia o bien por ocupar dichos grupos funcionales posiciones que, mediante otros mecanismos de reacción (abstracción de

hidrógeno) son reactivas, quedando de esta forma inhabilitadas. Esta última hipótesis fue demostrada por Woodall y colaboradores en 1997. Las posiciones C4 y C4', alílicas al cromóforo, son posiciones reactivas en las que la abstracción de un hidrógeno estaría energéticamente favorecida, siendo éste otro de los mecanismos implicados en las reacciones de carotenoides con radicales libres, mecanismo que genera nuevas especies que continúan la cadena de propagación. Por tanto, astaxanteno y cantaxanteno, al igual que otros pigmentos que tengan dichas posiciones ocupadas por grupos funcionales, manifiestan una capacidad antioxidante mayor que aquellos pigmentos con dichas posiciones desocupadas. Martin y colaboradores en 1999, ratifican la idea de que la presencia de varios grupos ceto en el anillo potencia aún más la efectividad antioxidante, siendo ésta superior en pigmentos como isonorastaceno y actinioeritrol, que poseen dos grupos ceto en cada anillo. Sin embargo, muchas de las experiencias realizadas para estimar la actividad antioxidante de carotenoides no tienen en cuenta que en muchos casos, éstos se encuentran en la Naturaleza esterificados por ácidos grasos.

La presencia del ácido graso según qué tipo sea (saturado o insaturado) puede hacer que la capacidad antioxidante del pigmento sea diferente a la esperada. En el fruto del pimiento las xantofilas están esterificadas y su capacidad antioxidante no ha sido contrastada en dicho estado de esterificación. Además, se da la particularidad de que las xantofilas rojas se esterifican con ácidos grasos saturados mientras que las amarillas lo están por ácidos grasos insaturados, lo que según varios autores (Philip y colaboradores, 1971; Camara y Monéger, 1978; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b) establece diferencias en cuanto a su estabilidad. La diferente esterificación por ácidos grasos saturados o insaturados puede o no, modificar la capacidad antioxidante, en función de la naturaleza del ácido graso, lo que además permitiría concluir qué aporta la esterificación a la estabilidad de los pigmentos.

1.- Oxidación de pigmentos carotenoides en su forma libre. Evaluación de su capacidad antioxidante.

En el presente trabajo se han elegido cuatro pigmentos que mantienen la estructura carbonada polienoica central y difieren en los grupos funcionales que presentan y el tipo de anillo situado en los extremos de la cadena. β -caroteno presenta la estructura básica con anillos tipo β y sin grupos funcionales oxigenados. Zeaxanteno presenta dos hidroxilos en los carbonos C3 y C3' manteniendo los anillos tipo β . La estructura de capsanteno incorpora dos modificaciones básicas a la de los pigmentos anteriores. Posee un anillo acilciclopentanona (tipo

κ) y otro tipo β , con dos grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C3' de cada anillo y además incluye un grupo ceto situado en el carbono C6 que pertenece a la cadena polienoica. Capsorrubeno refleja estas últimas características de capsanteno en ambos extremos de la cadena carbonada, es decir, presenta dos anillos tipo κ con sendos grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C3' y dos grupos ceto en los carbonos C6 y C6'.

Las experiencias de evaluación de la capacidad antioxidante con capsanteno y capsorrubeno son *a priori* las más interesantes por las peculiares características estructurales que presentan. La inclusión de grupos ceto en ambas estructuras aumenta las expectativas de una buena capacidad antioxidante. Los ensayos con β -caroteno y zeaxanteno se utilizan como referencia.

Aunque el mecanismo de adición no es el único por el que la reacción de oxidación de pigmentos carotenoides con radicales libres tiene lugar, sí es el que con mayor cadencia se produce por el amplio número de posiciones, en cada pigmento, a las que el radical se puede adicionar. Por ello esta reacción se expresa de la siguiente forma.



La ecuación cinética de esta reacción es la siguiente.

$$-\frac{dC_{Car}}{dt} = \kappa \times [C_{Car}]^n \times [C_{R\bullet}]^m \quad E-8$$

Las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción, con una elevada concentración de iniciador de radicales libres, permiten suponer que ésta permanece constante por lo que la ecuación cinética que se maneja es:

$$-\frac{dC_{Car}}{dt} = \kappa' \times [C_{Car}]^n \quad E-9$$

En las Tablas 6 y 7 se exponen los datos de evolución del porcentaje de retención de cada pigmento durante la reacción de oxidación. A partir de estos datos y aplicando el método integral, a partir de la ecuación E-9, se obtiene que el mejor ajuste a los datos es el modelo cinético de primer orden, lo que indica una reacción unimolecular acorde con R-2. Aunque es

posible una segunda adición de otro radical para formar un aducto *bis*-peroxilo, debido a las condiciones de presión de oxígeno a las que se lleva a cabo la reacción, esta segunda adición genera un nuevo radical según el mecanismo representado en la Figura 11 ruta B1, por lo que aunque se produzcan dos adiciones, netamente cada molécula de pigmento consume un radical. La ecuación que representa dicho modelo cinético es:

$$\ln(\%Ret) = 4,605 - \kappa' \times t \quad E-10$$

Los valores de la constante cinética κ' junto con el coeficiente de correlación, del modelo cinético de primer orden para cada pigmento, se muestran en la Tabla 8. La ecuación E-10 (expresión de idéntica forma a E-4) es un modelo lineal al tomar logaritmo en base e en ambos miembros de la igualdad. En la Figura 17 se representa en escala semilogarítmica la evolución del porcentaje de retención de β -caroteno y zeaxanteno (Figura 17A) y de capsanteno y capsorrubeno (Figura 17B) según el modelo cinético de primer orden (E-10) obtenido para cada pigmento.

Un mayor valor de la constante de velocidad implica una degradación más rápida y, consecuentemente, una pérdida en la concentración de pigmento más acelerada, resultado de la oxidación por radicales libres. Todos los pigmentos ensayados reaccionan rápidamente con los radicales libres siendo β -caroteno el que muestra la mayor constante de velocidad y, por tanto, el que con mayor rapidez se degrada. El valor de la constante de velocidad disminuye a medida que se incorporan grupos funcionales a la estructura básica de referencia que sería en este caso la de β -caroteno. Así, zeaxanteno con dos grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C3' y capsanteno con un grupo ceto en el carbono C6 y dos grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C3' muestran velocidades de degradación muy similares, siendo mayor la de capsanteno, a pesar de la presencia del grupo ceto en su estructura. Capsorrubeno, con dos grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C3' y dos grupos ceto en los carbonos C6 y C6' es el pigmento con menor velocidad de degradación, con una disminución en la constante de velocidad de hasta un 65% con respecto a β -caroteno y entre un 55-60% con respecto a zeaxanteno y capsanteno. Las pruebas estadísticas indican que las diferencias entre los valores de las constantes de degradación de pigmentos desesterificados, son significativas en todos los casos, diferencias que se hacen constar en la Tabla 8.

Tabla 6.- Evolución del porcentaje de retención durante la reacción de oxidación de β -caroteno y zeaxanteno (forma libre y diesterificada).

tiempo (min.)	β -caroteno	zeaxanteno	zeaxanteno diesterificado
0	100,0 \pm 0,3 ^a	100,0 \pm 0,4	100,0 \pm 0,2
0,5	86,6 \pm 0,6	89,8 \pm 0,3	87,5 \pm 0,6
1	75,0 \pm 1,0	80,6 \pm 0,6	76,6 \pm 1,1
2	56,3 \pm 1,5	64,9 \pm 0,9	58,8 \pm 1,7
3	42,2 \pm 1,7	52,3 \pm 1,1	45,0 \pm 2,0
4	31,7 \pm 1,7	42,1 \pm 1,2	34,5 \pm 2,0
5	23,8 \pm 1,6	33,9 \pm 1,2	26,5 \pm 1,9
6	17,9 \pm 1,4	27,3 \pm 1,1	20,3 \pm 1,8
7	13,4 \pm 1,3	22,0 \pm 1,1	15,6 \pm 1,6
8	10,1 \pm 1,1	17,7 \pm 1,0	12,0 \pm 1,4
9	- ^b	14,3 \pm 0,9	-
10	-	11,5 \pm 0,8	-
11	-	-	-
12	-	-	-

^a Media \pm desviación estándar, (n=8).

^b -, datos inferiores a 10%.

Tabla 7.- Evolución del porcentaje de retención durante la reacción de oxidación de capsanteno y capsorrubeno (formas libre y diesterificada).

tiempo (min.)	capsanteno	capsanteno diesterificado	capsorrubeno	capsorrubeno diesterificado
0	100,0 ± 0,3	100,0 ± 0,1	100,0 ± 0,3	100,0 ± 0,2
0,5	89,0 ± 0,7	88,9 ± 0,5	95,3 ± 0,7	95,2 ± 0,8
1	79,2 ± 1,2	79,0 ± 0,9	90,7 ± 1,3	90,6 ± 0,6
2	62,8 ± 1,9	62,4 ± 1,4	82,3 ± 0,9	82,1 ± 1,0
3	49,8 ± 2,3	49,3 ± 1,7	74,7 ± 1,2	74,5 ± 1,4
4	39,4 ± 2,4	38,9 ± 1,8	67,8 ± 1,4	67,6 ± 1,7
5	31,3 ± 2,4	30,8 ± 1,7	61,6 ± 1,5	61,3 ± 1,8
6	24,8 ± 2,3	24,3 ± 1,7	55,9 ± 1,3	55,6 ± 2,0
7	19,7 ± 2,2	19,2 ± 1,5	50,8 ± 1,2	50,5 ± 2,1
8	15,6 ± 2,0	15,2 ± 1,4	46,2 ± 1,2	45,8 ± 2,2
9	12,4 ± 1,8	12,0 ± 1,2	42,0 ± 1,1	41,6 ± 2,0
10	^b -	-	38,1 ± 0,9	37,8 ± 2,0
11	-	-	34,7 ± 0,8	34,3 ± 1,8
12	-	-	31,5 ± 0,8	31,2 ± 1,8

^a Media ± desviación estándar, (n=8).

^b -, datos inferiores a 10%.

Tabla 8.- Constantes cinéticas según modelo cinético de primer orden para la oxidación de carotenoides con radicales libres.

pigmento	$\kappa' \pm \text{E.E.}^a$	Coeficiente de correlación	Test comparativo ^b						
			1	2	3	4	5	6	7
1 β -caroteno	0,288 \pm 0,005	0,998	-	-	-	-	-	-	-
2 zeaxanteno	0,217 \pm 0,003	0,997	-	-	-	-	-	-	-
3 zeaxanteno diesterificado	0,266 \pm 0,005	0,999	-	-	-	-	-	-	-
4 capsanteno	0,233 \pm 0,005	0,996	-	-	-	*	-	-	-
5 capsanteno diesterificado	0,236 \pm 0,004	0,996	-	-	-	*	-	-	-
6 capsorrubeno	0,097 \pm 0,005	0,998	-	-	-	-	-	-	*
7 capsorrubeno diesterificado	0,099 \pm 0,006	0,999	-	-	-	-	-	-	*

^a Constante cinética según modelo de primer orden (E-10). E.E., error estándar.

^b Test comparativo de los valores de la constante cinética de cada pigmento, $p < 0,05$. *, indica que las diferencias en el valor de la constante cinética no son estadísticamente significativas mientras que - indica que sí lo son.

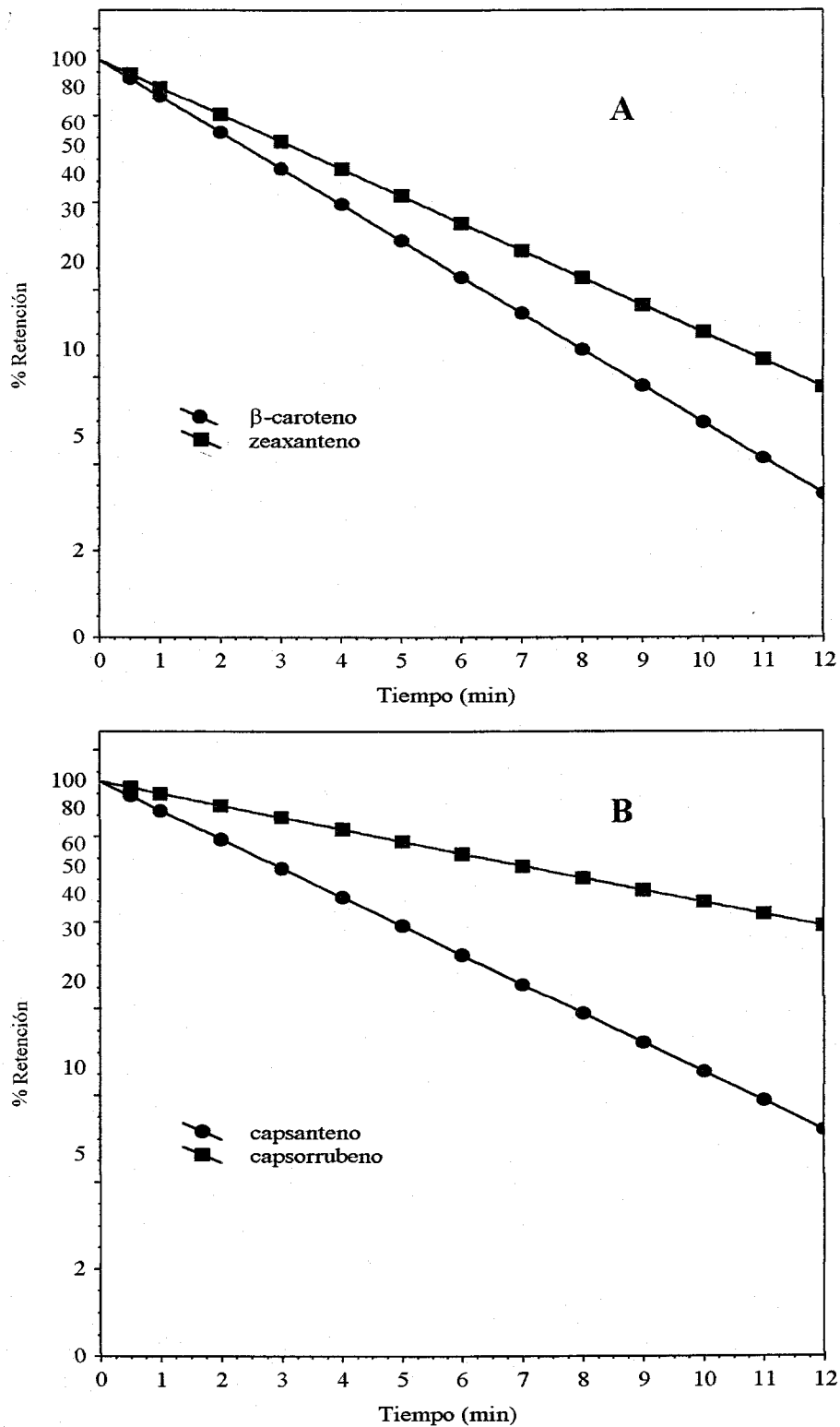


Figura 17.- Modelo cinético de primer orden para la reacción de oxidación de β -caroteno, zeaxanteno (A) y capsanteno, capsorrubeno (B).

Los resultados, sin tener en cuenta a capsanteno, están en la línea de los publicados por Terao en 1989, en su estudio comparativo de β -caroteno, zeaxanteno, cantaxanteno y astaxanteno. Estos últimos pigmentos mostraron la menor velocidad de degradación cuando son incubados con un iniciador de radicales libres, atribuyendo a la presencia de grupos ceto en el anillo, una mayor efectividad en la deslocalización, mejorando la estabilidad de la especie radicalaria intermedia que se forma tras la primera adición. Por este motivo, estos pigmentos muestran una mejor capacidad antioxidante, puesto que el mecanismo de acción no produce especies reactivas de forma inmediata, que aceleren la degradación del pigmento.

Esta misma hipótesis sirve de base para explicar que la velocidad de degradación de capsorrubeno por radicales libres sea la menor de todos los pigmentos ensayados. Los dos grupos ceto en los carbonos C6 y C6' deslocalizan el radical aducto intermedio que se forma tras la primera adición, pero en este caso con una ventaja más a favor con respecto a cantaxanteno y astaxanteno, que es la situación de dichos grupos en los extremos de la cadena polienoica y no en el anillo, lo que probablemente aumenta la estabilización por deslocalización. Además los mecanismos de abstracción de hidrógeno no son posibles ya que no existen hidrógenos *alílicos* cuya abstracción esté energéticamente favorecida. Capsorrubeno es por tanto, menos susceptible de degradarse por procesos autooxidativos y su capacidad antioxidante está menos contrarrestada que en otros pigmentos como β -caroteno que, por sus características estructurales, sí experimentan claramente procesos autooxidativos.

Por otro lado capsanteno muestra una velocidad de degradación superior a pesar de la presencia de un grupo ceto en el carbono C6. En este caso son dos los factores que aumentan la velocidad de degradación, respecto a la que muestra capsorrubeno. Capsanteno puede experimentar procesos autooxidativos en mayor extensión puesto que además de la adición a la cadena polienoica, es posible la adición al anillo β , formando el epóxido 5,6 y la abstracción de hidrógeno, procesos que implican autooxidación. Por otro lado, la falta de simetría en la molécula puede contribuir en este caso a no estabilizar el aducto radicalario intermedio, por una mayor distribución de carga electrónica hacia el único grupo ceto. Capsanteno es por tanto más susceptible a experimentar procesos autooxidativos cuando ejerce su acción antioxidante por lo que ésta se ve contrarrestada.

2.- Oxidación de pigmentos carotenoides en su forma esterificada. Evaluación de su capacidad antioxidante.

En la Figura 18 se muestra, en escala semilogarítmica, la evolución del porcentaje de retención en el tiempo de la reacción de degradación por radicales libres, para las formas libres y esterificadas de zeaxanteno, (Figura 18A) y capsanteno (Figura 18B), según el modelo lineal de primer orden (E-10) obtenido para cada pigmento. Se puede comparar más claramente la degradación que sigue cada pigmento y la influencia de la esterificación. Los valores de la constante cinética, para cada xantofila esterificada, se muestran en la Tabla 8. Teniendo en cuenta dichos valores y como se observa en la Figura 18, capsanteno, tanto en forma libre como esterificada sigue prácticamente la misma línea de evolución mientras que zeaxanteno y su forma esterificada siguen un avance de reacción diferente, más rápido en el caso de zeaxanteno diesterificado. El test comparativo aplicado indica que no existen diferencias significativas entre los valores de las constantes de degradación de capsanteno y sus ésteres, y capsorrubeno y sus ésteres mientras que sí las hay al comparar zeaxanteno y sus ésteres (Tabla 8).

La razón de este distinto comportamiento frente a la oxidación, de zeaxanteno y sus ésteres, es la naturaleza insaturada de los ácidos grasos que esterifican a zeaxanteno, principalmente ácido linoleico (18:2). *A priori* se podría pensar que la presencia en el medio de reacción de este tipo de ácidos grasos desviaría en parte el ataque oxidativo de los radicales libres al pigmento, ya que habría otros sitios reactivos en las posiciones alílicas a las insaturaciones de cada ácido graso y, con más razón si por cada molécula de pigmento hay dos de ácido graso que la esterifican. Sin embargo los resultados obtenidos no sustentan la idea anterior sino todo lo contrario. En la oxidación del pigmento por radicales libres, los ácidos grasos mono y poliinsaturados promueven un ambiente más oxidativo ya que durante dicho proceso se generan, a partir de los ácidos grasos, otros radicales que aceleran la degradación del pigmento. La capacidad antioxidante, en este caso de zeaxanteno, se ve mermada no sólo por los procesos autooxidativos, implícitos a su estructura, sino también por otras especies reactivas procedentes de los ácidos grasos que lo esterifican.

Sin embargo cuando los ácidos grasos que esterifican al pigmento son saturados, como en el caso de capsanteno y capsorrubeno, no existe diferente velocidad de degradación respecto a la mostrada por sus correspondientes formas desesterificadas.

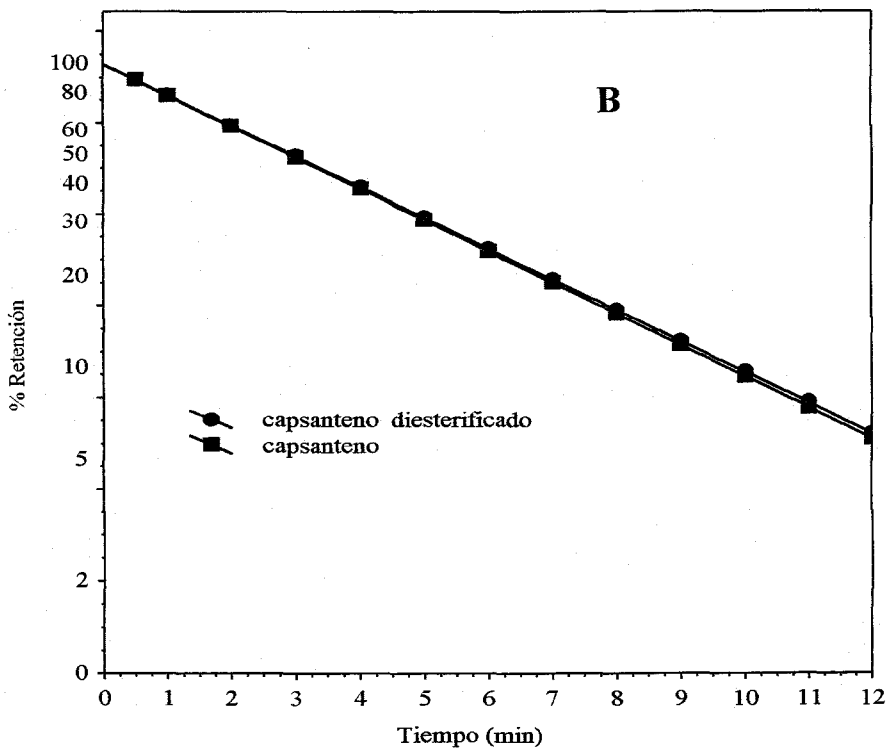
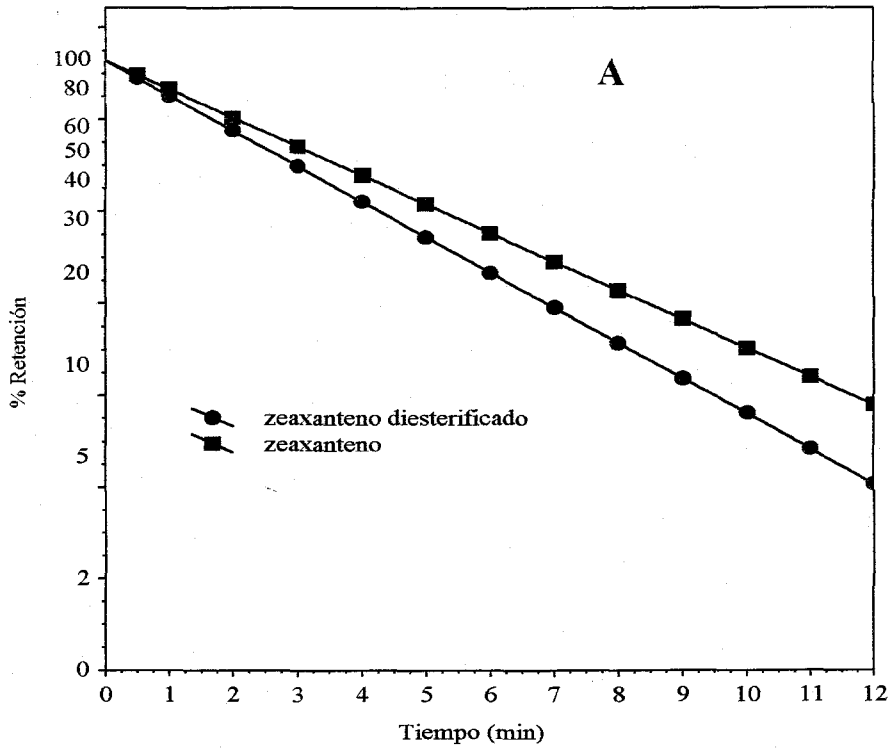


Figura 18.- Modelo cinético de primer orden para la reacción de oxidación de las formas libres y diesterificadas de zeaxanteno (A) y capsanteno (B).

Este hecho muestra que la presencia en el medio de reacción de ácidos grasos como láurico y esteárico no propicia cambios en la capacidad antioxidante del pigmento, puesto que el valor de κ' mostrado es el mismo. Esta situación puesta de manifiesto, conlleva a la conclusión de que tanto capsanteno como capsorrubeno tienen la misma capacidad antioxidante que sus correspondientes ésteres, destacando la mayor efectividad de capsorrubeno, mientras que zeaxanteno diesterificado muestra una capacidad antioxidante inferior respecto a su correspondiente forma desesterificada. Además también se pone de manifiesto la mayor o menor estabilidad que cada pigmento puede mostrar ante procesos degradativos, puesto que una menor capacidad antioxidante implica una mayor velocidad de degradación y por tanto menor estabilidad. La esterificación por ácidos grasos insaturados es una desventaja ante procesos degradativos, dado que su presencia aumenta el nivel oxidativo del medio, disminuyendo la estabilidad de los pigmentos carotenoides presentes en él.

II. EFECTO DEL ENTORNO LIPÍDICO EN LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.

El pimentón es un colorante natural ampliamente utilizado. Sus buenas cualidades pigmentarias, unido a su contenido en carotenoides con actividad de provitamina A, hacen particularmente apto su empleo como ingrediente alimentario. Dos aspectos fundamentales son los que generalmente se tienen en cuenta para la cotización comercial de un pimentón: poder colorante y estabilidad del color. El primer aspecto se refiere a la capacidad de conferir color, consecuencia directa de la concentración carotenoide que posee. Esta viene marcada, en primer lugar, por la variedad de pimiento empleada, presentándose diferencias muy notables entre variedades respecto al contenido carotenoide (Almela y colaboradores, 1991; Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1992; Levy y colaboradores, 1995). El otro factor a considerar, el mantenimiento del poder colorante con el tiempo, está limitado por las condiciones de procesado que se utilicen en las distintas etapas por las que pasa el fruto del pimiento hasta llegar a pimentón. Dichas etapas son la deshidratación del fruto y posterior molienda y homogeneización (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1993, 1994a).

El proceso de molienda requerido para la obtención del pimentón incluye a las semillas del fruto ya que se mejoran las características organolépticas, puesto que el aporte del aceite que contienen las semillas le proporciona un aspecto más atractivo. Por otro lado, en función de la composición en antioxidantes de las semillas de pimiento y del pericarpio seco del fruto, al incluir las semillas, se aumenta el contenido en antioxidantes liposolubles lo que *a priori* aumenta la estabilidad del producto. La proporción de semillas que suele tener el fruto oscila en torno al 40% y al estar exentas de color, su presencia supone una dilución del mismo.

Por la composición en ácidos grasos (Tabla 1), ácido linoleico (23%) y ácido linolénico (24%) son los mayoritarios en el fruto deshidratado. Sin embargo en el aceite de las semillas se triplica la proporción de ácido linoleico (77%), en tanto que ácido linolénico se encuentra de forma residual (0,33%). La presencia de ácidos grasos poliinsaturados hace que el medio lipídico en el que se encuentra la fracción carotenoide sea muy susceptible a la oxidación, siendo posible la puesta en marcha de reacciones de peroxidación lipídica, que tienen lugar incluso a temperatura ambiente y cuyos productos intermedios, radicales peroxilo, reaccionarán con los pigmentos carotenoides, provocando pérdidas en su concentración.

Por otro lado la presencia de α -tocoferol puede servir de freno a los radicales libres, por lo que un aporte excesivo de oxidantes potenciales, al aumentar la proporción de semillas, se compensa por un mayor aporte de antioxidantes. En el aceite del fruto deshidratado, la concentración de α -tocoferol es de 356,1 mg/kg, en tanto que en el de las semillas, la concentración es de 755,2 mg/kg (Tabla 1). El resto de isómeros de tocoferol, si bien pueden tener una actuación eficaz como antioxidantes (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996), tienen una concentración, tanto en fruto deshidratado como en el aceite de las semillas muy minoritaria (Fuente y colaboradores, 1977).

En la medida en que se mantenga un buen equilibrio entre estas dos tendencias, se dispondrá de un producto en el que permanezcan las características iniciales, principalmente la capacidad colorante. Cuando las reacciones de oxidación no estén contrarrestadas por los antioxidantes, posiblemente se producirán modificaciones más aceleradas de los componentes del medio y en particular de los pigmentos.

Hasta la fecha, los diversos trabajos sobre la estabilidad de los pigmentos carotenoides del pimentón se han enfocado hacia la degradación en función de factores como el aire y la luz (Carnevale y colaboradores, 1980), tipo de secado y tiempo de almacenamiento (Malchev y colaboradores, 1982; Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1994a), relación con el contenido en azúcares (Vámos-Vigyazó y colaboradores, 1985), pero en relación con la semilla y su efecto sobre la fracción carotenoide del fruto sólo hay una referencia, en la que se estudia la evolución del color de pimentones con distinto porcentaje de semillas (Okos y colaboradores, 1990), concluyendo que un mayor contenido en sustrato lipídico mejora la estabilidad del color, aunque sin establecer la amplitud de la mejora en la estabilidad y si posteriormente se produce el efecto contrario. La adición de un mayor porcentaje de semillas implica un aporte de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente linoleico, por lo que es de esperar una degradación acelerada, dada la facilidad con la que los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan generando radicales libres (Porter y colaboradores, 1995).

Con las líneas de trabajo dirigidas a mejorar la estabilidad de la capacidad colorante mediante la adición de sustancias antioxidantes, no se consigue eliminar el origen de las reacciones de oxidación puesto que en el pimentón siguen estando presentes las sustancias que pueden ser responsables de dichas reacciones.



Como se ha comentado anteriormente, el pimentón posee una proporción relativamente importante de ácidos grasos poliinsaturados, en particular de ácido linoleico, origen de radicales peroxilo (Frankel, 1985), que pueden oxidar a los pigmentos carotenoides disminuyendo la capacidad colorante del pimentón. Estos procesos degradativos se solapan con la probable acción antioxidante que ejercen los tocoferoles, presentes en el medio, la cual podría ser más efectiva si se minimizaran las reacciones de oxidación de ácidos grasos.

Para ello, se podría cambiar el perfil lipídico del pimentón de una composición mayoritariamente poliinsaturada a otra con una presencia grasa de naturaleza menos sensible a la oxidación. Estas consideraciones motivan que en el presente estudio se contemple el uso del pericarpio seco del fruto de pimiento adicionándole en la fase de molienda una clase de semilla distinta. El sustrato lipídico elegido es el que aportan las semillas de girasol alto oleico. Su naturaleza monoinsaturada, menos oxidante *a priori*, puede mejorar la estabilidad de la capacidad colorante.

La composición de ambos tipos de semillas (pimiento y girasol) mostrada en la Tabla 1, corrobora la diferencia cualitativa y cuantitativa en el grado de insaturación que posee cada uno de ellos destacando la proporción mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados en las semillas de pimiento, respecto a la presencia de monoinsaturados en las semillas de girasol alto oleico. Aunque también se distinguen en cuanto a la composición en α -tocoferol en el aceite de ambos sustratos lipídicos, dicha distinción no tiene lugar cuando se considera la riqueza grasa, también diferente (18% para las semillas de pimiento y 50% para las semillas de girasol alto oleico). Conjuntando ambas composiciones la presencia real de α -tocoferol en los dos tipos de semillas es prácticamente idéntica (135,9 mg/kg de semillas de pimiento y 132,4 mg/kg de semillas de girasol alto oleico). A igual proporción de semillas en una mezcla, se aporta la misma cantidad de α -tocoferol, pero no de aceite.

El objetivo se centra en conocer el efecto que sobre la pigmentación carotenoide ejerce un medio lipídico mayoritariamente monoinsaturado (86%) y de menor proporción en ácidos grasos poliinsaturados (9%), en comparación con el medio lipídico habitual procedente de las semillas de pimiento que contiene una proporción de poliinsaturados mucho más elevada (77%), y ambos con niveles en antioxidantes liposolubles muy similares. En ambos casos, el estudio se realizará determinando la velocidad de oxidación de la fracción carotenoide total y de las fracciones isocrómicas roja y amarilla, cuya distinción ya implica una diferenciación estructural. Asimismo

se realizará un estudio de la oxidación de los pigmentos carotenoides más representativos de ambas fracciones.

1.- Sustrato lipídico poliinsaturado.

- Velocidad de oxidación carotenoides según fracciones isocrómicas de pigmentos. Estudio cinético.

En las Tablas 9 a 12 se expone la evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos, amarillos y totales, durante la termodegradación a 343 K, en las cuatro mezclas de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado elaboradas. Para poder observar la evolución gráficamente, en la Figura 19, se representa la evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales frente al tiempo en las cuatro mezclas. Las líneas se corresponden con ajustes a los datos de polinomios de orden cuatro, que son los que mejor representan la evolución experimentada por el porcentaje de retención de pigmentos. En dicha figura, se observan dos zonas de diferente comportamiento en función del porcentaje de semillas presente en la mezcla. Desde el 100% de retención de pigmentación total hasta un 30-40% de retención, la mezcla que se degrada más lentamente es la que posee mayor porcentaje de semillas mientras que aquella obtenida sin adición de sustrato lipídico, muestra una degradación más acelerada. Sin embargo, a partir de ese intervalo de porcentaje de retención, este orden de estabilidad se invierte, pasando a ser las mezclas más concentradas en sustrato lipídico poliinsaturado las que muestran mayor velocidad de degradación mientras que el triturado del fruto deshidratado presenta una degradación más lenta.

Como ejemplo, en las tablas de evolución de porcentaje de retención se observa como la pigmentación total de la mezcla elaborada con un 60% de semillas (Tabla 12), experimenta cambios a partir de las 72 horas de reacción, mientras que a ese tiempo, la mezcla de referencia (0%) ya ha perdido un 11% de pigmentación total.

Se deduce que durante una primera etapa, la adición de un mayor porcentaje de semillas tiene efectos protectores sobre la fracción carotenoides que, al mantenerse ese efecto protector por encima del 50% de retención del color, es el efecto trasladable a la vida comercial del producto.

Tabla 9.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido sin sustrato lipídico.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 3,8 ^a	100,0 ± 5,9	100,0 ± 4,3
24	100,0 ± 2,4	100,0 ± 3,3	100,0 ± 2,7
48	100,0 ± 2,7	99,3 ± 4,1	100,0 ± 3,3
72	92,3 ± 4,3	84,4 ± 2,5	88,9 ± 3,5
120	80,5 ± 3,3	74,7 ± 3,9	78,1 ± 3,6
168	72,4 ± 0,3	60,5 ± 5,6	67,3 ± 2,6
216	65,5 ± 6,6	50,7 ± 4,2	59,2 ± 5,5
288	45,2 ± 3,2	32,6 ± 1,3	39,8 ± 2,4
360	33,5 ± 0,6	21,7 ± 0,6	28,5 ± 0,6
456	26,7 ± 0,5	15,1 ± 0,5	21,8 ± 0,5
552	20,7 ± 0,4	12,0 ± 0,2	17,0 ± 0,2
648	16,8 ± 0,1	10,4 ± 0,1	14,1 ± 0,1
816	9,4 ± 0,5	6,0 ± 0,2	7,9 ± 0,4
1032	7,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 10.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 2,6 ^a	100,0 ± 2,9	100,0 ± 2,7
24	100,0 ± 1,4	100,0 ± 3,6	100,0 ± 2,4
48	97,0 ± 1,2	96,1 ± 1,9	96,6 ± 1,5
72	89,5 ± 2,5	93,9 ± 1,4	91,3 ± 2,0
120	85,4 ± 2,0	79,2 ± 2,6	82,8 ± 2,2
168	73,3 ± 3,5	63,3 ± 1,7	69,2 ± 1,4
216	66,3 ± 4,7	58,6 ± 4,6	63,2 ± 4,7
288	56,1 ± 3,1	46,5 ± 5,7	52,2 ± 4,2
360	34,0 ± 0,6	24,6 ± 2,8	30,1 ± 1,5
456	27,5 ± 0,6	18,6 ± 0,5	23,8 ± 0,2
552	20,4 ± 0,3	12,4 ± 1,0	17,1 ± 0,2
648	14,8 ± 0,3	8,5 ± 0,6	12,2 ± 0,4
816	8,0 ± 0,3	4,2 ± 0,6	6,4 ± 0,5
1032	5,1 ± 0,3	2,2 ± 0,1	3,9 ± 0,2

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 11.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 2,2 ^a	100,0 ± 3,9	100,0 ± 3,1
24	100,0 ± 2,3	100,0 ± 3,3	100,0 ± 2,8
48	99,8 ± 5,3	93,9 ± 3,2	97,4 ± 2,9
72	93,1 ± 2,7	92,3 ± 3,2	92,8 ± 2,9
120	82,4 ± 1,7	80,1 ± 4,6	81,4 ± 2,3
168	71,0 ± 1,6	61,8 ± 1,4	67,2 ± 1,4
216	63,0 ± 0,6	52,3 ± 1,7	58,6 ± 1,1
288	57,3 ± 2,8	42,5 ± 1,9	51,1 ± 2,4
360	38,8 ± 0,2	28,7 ± 0,8	34,6 ± 0,2
456	26,0 ± 1,3	18,0 ± 2,9	22,7 ± 2,0
552	17,9 ± 1,4	10,2 ± 1,2	14,7 ± 1,3
648	7,7 ± 0,6	5,7 ± 0,1	6,9 ± 0,3
816	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1
1032	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 12.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido con un 60% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 0,9 ^a	100,0 ± 1,9	100,0 ± 1,2
24	100,0 ± 1,4	99,7 ± 1,9	100,0 ± 1,7
48	100,0 ± 1,5	100,0 ± 2,3	100,0 ± 2,0
72	100,0 ± 2,1	97,2 ± 1,1	100,0 ± 1,6
120	91,2 ± 2,8	77,2 ± 2,4	85,4 ± 2,5
168	81,6 ± 0,5	70,2 ± 1,6	76,9 ± 0,9
216	79,1 ± 0,2	66,5 ± 0,4	73,9 ± 0,2
288	63,3 ± 1,3	49,2 ± 1,9	57,5 ± 1,8
360	37,0 ± 1,2	28,9 ± 0,5	33,6 ± 0,7
456	28,4 ± 0,2	19,9 ± 0,7	24,9 ± 0,4
552	14,4 ± 1,4	9,3 ± 0,7	12,3 ± 1,1
648	5,1 ± 0,1	2,9 ± 0,6	4,2 ± 0,2
816	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1
1032	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

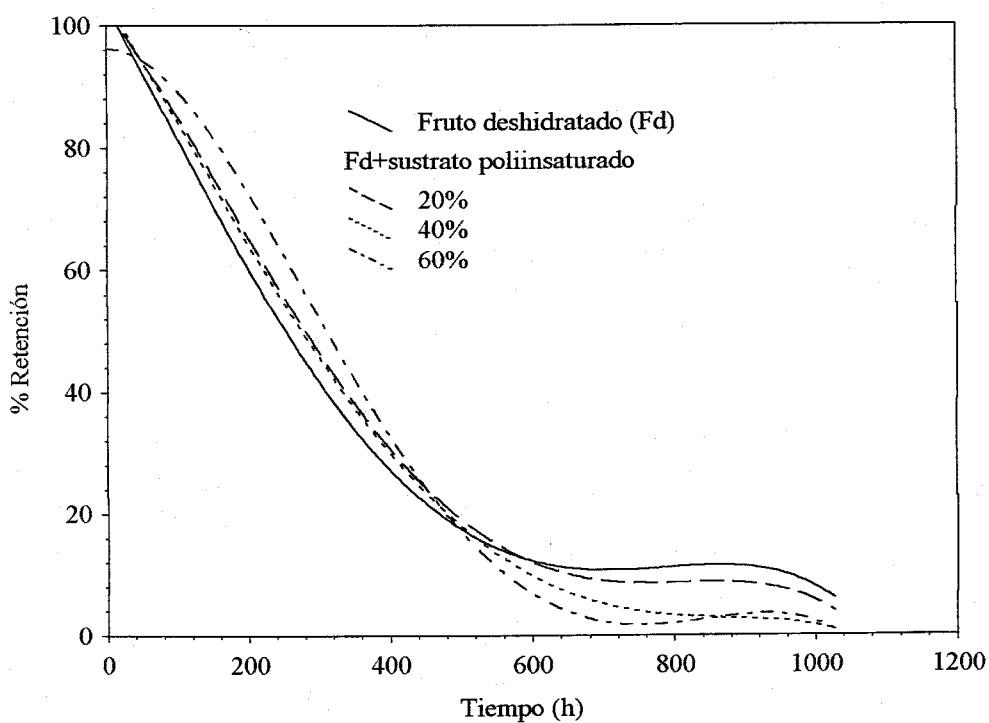


Figura 19.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales de las cuatro mezclas, de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado, elaboradas. Ajuste a polinomios de orden 4.

El hecho de que la pigmentación total no experimente modificaciones no quiere decir que la composición carotenoide individual no se haya modificado, como se expondrá más adelante. Sin embargo se corrobora que en la primera etapa de la oxidación, un mayor aporte de sustrato lipídico es beneficioso puesto que se retrasa la pérdida carotenoide.

Hay que recordar que la inclusión de semillas en la fabricación comercial del pimentón, como ya se ha comentado anteriormente, se realiza debido al efecto beneficioso en el producto obtenido, ya que el aceite de las semillas le confiere un mejor color aparente y, por otra parte, al aporte de tocoferoles, que al ser antioxidantes naturales, ejerce de primera barrera a la posible oxidación carotenoide y ello supone protección de la capacidad colorante durante más tiempo (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). Sin embargo, tanto en el fruto deshidratado como en las semillas, la presencia de ácidos grasos representa la materia prima en la formación de radicales peroxilo, que a su vez son los que propician la degradación de carotenoides a compuestos decolorados y como consecuencia, en último término, responsables de tales pérdidas pigmentarias.

Cuando se dispone del fruto deshidratado y molido, las pequeñas partículas del triturado poseen una gran superficie expuesta al aire, luz y calor, y los carotenoides incluidos se hallan sometidos a esas condiciones. Cuando se adicionan las semillas, el aceite procedente de las mismas, impregna de una fina película a estas partículas, pudiendo servir de relleno a las oquedades que presentan disminuyendo enormemente la superficie libre expuesta, en especial al oxígeno. Esto puede justificar, en primera instancia, la demora en la degradación de pigmentos en las mezclas con mayor "película de aceite" rodeando a las partículas de fruto deshidratado. El otro factor coadyuvante es la presencia de tocoferoles en el aceite, que ejerza de freno a la acción de los radicales peroxilo, cuando éstos se formen, e impida que lleguen a afectar directamente a los pigmentos. Pero el límite de esta acción antioxidante vendrá dado por la propia concentración que haya de estos componentes, ya que una vez que su acción no sea efectiva, la cadena oxidativa seguirá su camino, pero ahora de una forma más rápida y sin impedimento.

De conformidad con las consideraciones anteriores, en el triturado del fruto deshidratado sin adición de semillas, existe una asequibilidad de oxígeno más inmediata y los radicales peroxilo que se formen pueden alcanzar más fácilmente a los carotenoides próximos. Como factor favorable a la oxidación se puede reseñar la composición mayoritaria en ácidos poliinsaturados, ácido linoleico y ácido linolénico. Por otro lado, se parte de una concentración

en α -tocoferol menos elevada que en las mezclas con semillas. Todo ello parece justificar la mayor velocidad en la degradación de pigmentos. Pero como se observa en las Tablas 9 a 12 y en la Figura 19, cuando el avance de la reacción de oxidación supera el 60-70%, los valores de retención carotenoide en mezclas con semillas empiezan a disminuir más rápidamente hasta que se produce un cambio en el orden de estabilidad. En relación con este hecho cabe preguntarse qué es lo que ocurre en aquellas mezclas con mayor riqueza en sustrato poliinsaturado. La explicación más inmediata es el mayor aporte de antioxidantes que la adición de semillas proporciona, lo que genera una protección más duradera que cuando no se aporta sustrato lipídico. Cuando estos componentes decaigan en su acción, neutralizando radicales peroxilo, éstos no tendrán ya impedimento a su acción sobre otros compuestos, como por ejemplo pueden ser los carotenoides.

La mayor presencia de aceite, con sus ácidos grasos constituyentes, mayoritariamente ácido linoleico, puede incrementar en principio y de manera notable, los efectos degradativos sobre los pigmentos. A medida que avanza la reacción, las mezclas con más sustrato poliinsaturado tendrán una gran concentración de elementos prooxidantes y poca efectividad antioxidante, lo cual indica que, una vez desencadenadas las reacciones oxidativas, éstas van a disponer de gran cantidad de materia prima para su expansión.

En conclusión existen dos etapas como consecuencia del efecto que los dos constituyentes del fruto deshidratado y semillas ejercen sobre los pigmentos carotenoides. Por un lado los antioxidantes liposolubles y por otro los ácidos grasos poliinsaturados como generadores de radicales peroxilo. En la primera etapa de la oxidación la mayor adición de semillas es beneficiosa por el aporte en antioxidantes, pero en la segunda etapa el aporte en exceso de ácidos grasos poliinsaturados, provoca una aceleración en la degradación, máxime si los antioxidantes ya no se encuentran en concentración suficiente para ejercer su acción de forma efectiva.

El estudio cinético en este caso, tiene como objetivo concretar las diferencias observadas anteriormente, para establecer más claramente la influencia de un mayor o menor aporte de semillas en la estabilidad de pigmentos carotenoides y por tanto, en la estabilidad del color.

La aplicación del método integral a la evolución de la fracción de pigmentos rojos, amarillos y totales en cada mezcla ensayada concluye en que el modelo de evolución que mejor

se ajusta a los datos experimentales es el de primer orden. Los parámetros cinéticos obtenidos junto con el coeficiente de correlación, se muestran en la Tabla 13.

El valor de la constante cinética κ , es el que marca la mayor o menor velocidad de degradación y en base a él se realizan las comparaciones y se determina la influencia de la distinta presencia de sustrato lipídico en la mezcla. De esta forma, la velocidad de degradación de pigmentos totales es proporcional al porcentaje de semillas en la mezcla. El análisis estadístico comparativo indica que las diferencias entre las constantes cinéticas son significativas, aumentando su valor de forma considerable respecto a la mezcla exenta de semillas, a partir de la inclusión de un 40% de sustrato lipídico, llegando dicho aumento a ser de un 52% cuando el porcentaje en la mezcla es del 60%. Las mezclas de referencia (0%) y 20% muestran valores de κ muy similares (6,5% de aumento respecto a la mezcla del 0%).

Una mayor proporción de sustrato lipídico en la mezcla tiene una clara incidencia en el aumento de la velocidad de oxidación carotenoide.

En la Figura 20 se representa, en escala semilogarítmica, el modelo cinético obtenido para la evolución de pigmentos totales de cada mezcla ensayada. Se puede observar como a menor porcentaje de sustrato lipídico poliinsaturado, la evolución oxidativa es más lenta. Por tanto este estudio cinético sustenta que una adición excesiva de semillas conforma un medio lipídico poco adecuado para la estabilidad de la fracción carotenoide.

Por fracciones de pigmentos, se mantiene un aumento en la velocidad de oxidación al aumentar la presencia de semillas en la mezcla. La comparación de las constantes cinéticas de cada fracción en función del porcentaje de semillas adicionado, son significativas excepto entre los valores de κ en la fracción isocrómica amarilla de las mezclas 40% y 60%.

Se observa que la fracción roja, independientemente de la cantidad de semillas incorporada, presenta valores de κ inferiores a los de la fracción amarilla (diferencias estadísticamente significativas en todos los casos). Las diferencias entre los valores de κ para ambas fracciones disminuyen a medida que el porcentaje de sustrato lipídico en la mezcla aumenta incluyendo diferencias desde un 22% en la mezcla del 0% hasta un 5% en la mezcla del 60%. Esta diferencia de comportamiento según la fracción de pigmentos y porcentaje de semillas adicionado se analizará posteriormente.

Tabla 13.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado ensayadas.

pigmentos	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
		0%
rojos	26,91 \pm 2,48	0,990
amarillos	34,37 \pm 2,96	0,985
totales	29,63 \pm 2,72	0,989
		20%
rojos	29,09 \pm 1,28	0,992
amarillos	36,96 \pm 1,71	0,991
totales	31,56 \pm 1,42	0,991
		40%
rojos	38,33 \pm 1,30	0,972
amarillos	45,99 \pm 1,57 *	0,984
totales	41,31 \pm 1,35	0,979
		60%
rojos	43,71 \pm 2,61	0,950
amarillos	46,08 \pm 1,66 *	0,971
totales	45,11 \pm 2,21	0,963

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\% \text{Ret}) = 4,605 - \kappa \times t$.
E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos ($p < 0,05$), excepto en los indicados (*).

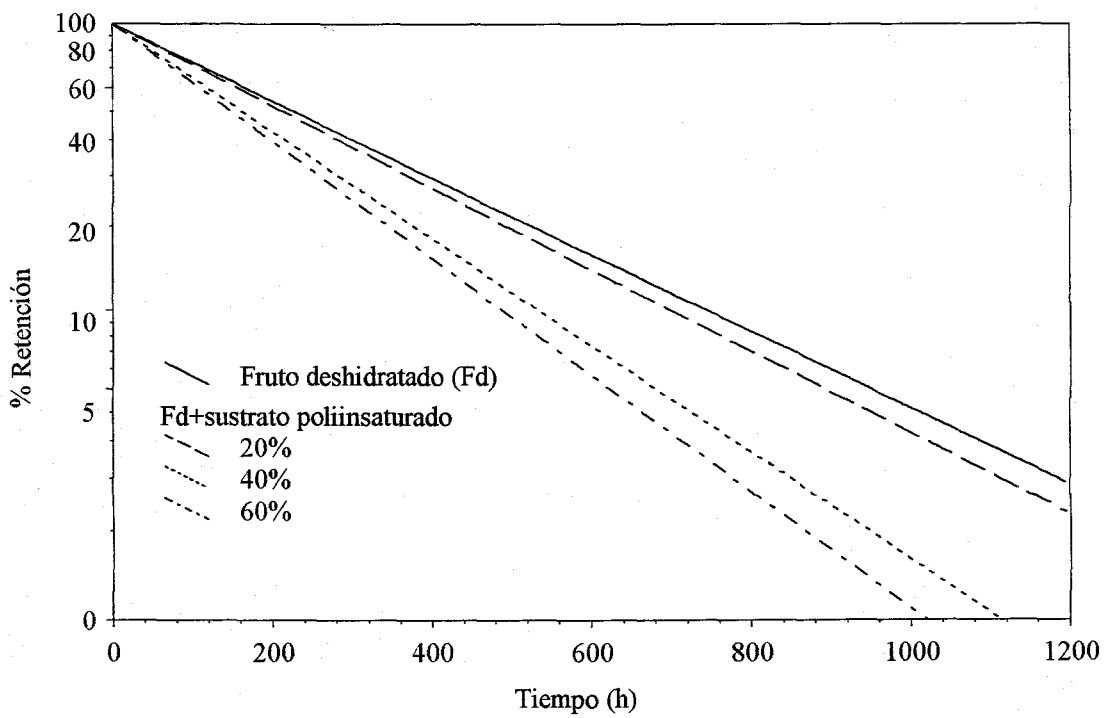


Figura 20.- Modelos cinéticos obtenidos para la evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales en la reacción de oxidación a 343K en cada mezcla de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado.

En base a este estudio se puede interpretar que un aporte excesivo de semillas en la mezcla no mejora la estabilidad de los pigmentos carotenoides y, por tanto, la capacidad colorante. Sin embargo como se observa en la Figura 19 esta situación se corresponde con los estadios finales de la reacción, cuando el avance de la misma ha superado el 60-70%, pero el estudio cinético no refleja, en este caso, la evolución experimentada por los pigmentos carotenoides de cada mezcla en la etapa previa, en la que, como se puede observar en dicha figura, las mezclas más estables son las de mayor aporte en semillas. Esto indica que la consideración de ambas etapas en su conjunto, para el estudio cinético, no se identifica con lo que tiene lugar en cada una por separado (tan solo muestra coherencia con la etapa final). Lo que además, permite concluir que dentro de que la velocidad de ambas etapas sea diferente, para el estudio global realizado tiene más influencia la velocidad de la etapa final. Los radicales peroxilo, degradan a la fracción carotenoide y la velocidad con la que lo hacen marca la tendencia global.

Además de las consideraciones anteriores, se tiene en cuenta la aplicación práctica del estudio realizado puesto que incluye datos de retención carotenoide que, por criterios de calidad del producto, nunca se alcanzan. Un pimentón de capacidad colorante inferior al 50% de su valor inicial es rechazable por su color, por lo que resulta más realista llevar a cabo el estudio cinético de la evolución considerando los datos hasta el 50% de retención. Teniendo en cuenta dichos datos y aplicando el método integral, resulta que el modelo cinético que mejor se ajusta a los datos experimentales considerados sigue siendo de primer orden. Los parámetros cinéticos obtenidos así como los coeficientes de correlación, se presentan en la Tabla 14.

Según los valores de κ , la velocidad de oxidación carotenoide es inversamente proporcional al porcentaje de semillas empleado en la mezcla. En este caso se tienen descensos, respecto a la mezcla de referencia, desde el 11% en la mezcla con un 20% de semillas, hasta el 22% en la mezcla del 60%. El análisis estadístico sigue indicando diferencias significativas en todos los casos.

La Figura 21, que representa el modelo cinético, en escala semilogarítmica, obtenido para la evolución de pigmentos totales de cada mezcla ensayada, hasta el 50% de pérdida de retención, constata la conclusión anterior, una mayor presencia de sustrato lipídico implica una menor velocidad de oxidación.

Tabla 14.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales en todas las mezclas ensayadas, considerando los datos hasta el 50% de retención.

pigmentos	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
		0%
rojos	27,84 \pm 0,68	0,966
amarillos	38,42 \pm 1,21	0,973
totales	31,80 \pm 0,88	0,970
		20%
rojos	25,01 \pm 0,55	0,952
amarillos	32,82 \pm 0,84	0,953
totales	28,23 \pm 0,62	0,956
		40%
rojos	24,22 \pm 1,51	0,976
amarillos	30,70 \pm 1,32	0,970
totales	26,69 \pm 1,44	0,977
		60%
rojos	21,51 \pm 2,36	0,901
amarillos	28,90 \pm 1,84	0,948
totales	24,69 \pm 2,10	0,927

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\% \text{Ret}) = 4,605 - \kappa \times t$.
E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos ($p < 0,05$).

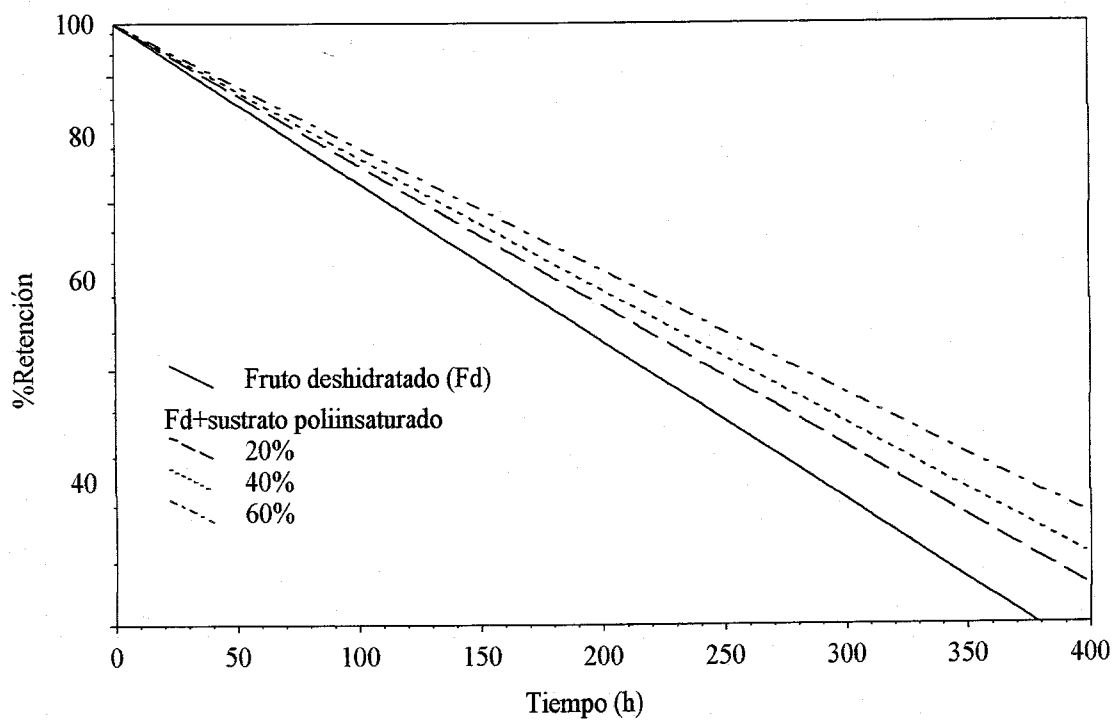


Figura 21.- Modelos cinéticos obtenidos para la evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales en la reacción de oxidación a 343K en cada mezcla de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado, considerando hasta el 50% de pérdida carotenoides.

La evolución de las fracciones de pigmentos rojos y amarillos sigue la línea de mayor oxidación en los pigmentos amarillos y menor en los rojos, independientemente del porcentaje de semillas en la mezcla. Las diferencias entre los valores de κ de ambas fracciones se sitúan entre un 27% en la mezcla 0% y un 21% en la mezcla del 40%. Aunque se produce un descenso en las diferencias de los valores de κ de las dos fracciones, a medida que aumenta la presencia de semillas, este descenso no es continuado, ya que en la mezcla del 60% las diferencias vuelven a aumentar hasta un 25%.

El estudio cinético de los datos hasta el 50% de porcentaje de retención refleja lo observado en la primera etapa de la oxidación de pigmentos carotenoides (Figura 19), en la que la velocidad de oxidación por la acción de radicales peroxilo se compensa con la acción antioxidante en el sustrato lipídico.

- Velocidad de oxidación de pigmentos individuales. Estudio cinético.

Las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de oxidación, posibilitan los mecanismos de autooxidación de pigmentos mediante los cuales se generan más radicales al medio, continuando la cadena de propagación radicalaria. En la estabilidad de las especies radicalarias intermedias que se forman en el proceso autooxidativo, estriba la velocidad con que cada pigmento se degrada y, dicha estabilidad está condicionada, *a priori*, por las características estructurales del pigmento.

Como se ha comentado en la sección anterior, independientemente del porcentaje de sustrato poliinsaturado empleado en la mezcla, la fracción de pigmentos rojos muestra mayor estabilidad, frente a las reacciones de oxidación, que la fracción de pigmentos amarillos. En las Tablas 15 a 22 se expone la evolución del porcentaje de retención de cada pigmento individual y en cada mezcla de fruto deshidratado y semillas.

De la evolución individual de cada pigmento se pretende obtener una relación entre la degradación oxidativa y las características estructurales de cada uno de ellos. Hay que considerar que la reacción de oxidación se lleva a cabo en un sistema real en el que está presente la mezcla carotenoide del pimiento al completo y, se producen varias reacciones sobre cada pigmento cuyos productos de oxidación, pueden repercutir en el resto de la composición carotenoide. El estudio de datos se realizará teniendo en cuenta la principal distinción estructural entre las fracciones de pigmentos rojos y amarillos: la presencia de grupos cetónicos.



Tabla 15.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado sin sustrato lipídico.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido		<i>cis</i> -capsanteno
		capsanteno	capsanteno	
0	100,0 ± 2,1 ^a	100,0 ± 3,5	100,0 ± 2,6	100,0 ± 3,1
24	100,0 ± 2,4	99,1 ± 1,4	90,5 ± 0,6	125,9 ± 2,4
48	100,0 ± 2,7	100,0 ± 1,8	80,7 ± 2,8	159,8 ± 1,2
72	100,0 ± 2,5	100,0 ± 0,2	68,9 ± 3,8	152,5 ± 3,7
120	98,7 ± 2,2	84,3 ± 0,9	60,9 ± 3,1	128,2 ± 4,6
168	97,8 ± 1,5	69,7 ± 3,6	55,3 ± 2,9	108,8 ± 6,1
216	87,7 ± 1,4	52,3 ± 3,6	50,1 ± 3,7	99,1 ± 3,9
288	75,0 ± 2,5	34,3 ± 0,8	32,5 ± 1,2	67,1 ± 1,2
360	52,9 ± 1,4	29,2 ± 1,5	24,6 ± 1,3	49,3 ± 2,2
456	49,0 ± 0,9	23,2 ± 1,8	18,8 ± 0,7	38,5 ± 1,6
552	36,9 ± 2,2	18,8 ± 0,2	15,3 ± 0,9	28,4 ± 2,0
648	30,6 ± 0,1	15,7 ± 0,1	12,6 ± 0,2	22,3 ± 0,7
816	18,2 ± 0,9	9,1 ± 0,2	6,8 ± 0,3	12,4 ± 0,9
1032	16,3 ± 0,4	7,3 ± 0,1	5,9 ± 0,1	8,8 ± 0,7

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 16.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido sin sustrato lipídico.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 2,1 ^a	100,0 \pm 1,7	100,0 \pm 1,4	100,0 \pm 1,5	100,0 \pm 3,5	100,0 \pm 3,4	100,0 \pm 3,9
24	100,0 \pm 2,5	98,9 \pm 2,3	87,4 \pm 2,2	244,0 \pm 8,3	100,0 \pm 3,9	90,7 \pm 1,3	147,2 \pm 2,1
48	100,0 \pm 1,4	94,1 \pm 3,8	83,9 \pm 2,1	228,0 \pm 2,1	98,5 \pm 4,8	85,2 \pm 4,1	142,7 \pm 2,2
72	95,5 \pm 0,8	81,0 \pm 0,7	72,1 \pm 3,6	192,0 \pm 7,1	81,3 \pm 3,6	68,6 \pm 0,6	114,1 \pm 0,5
120	82,6 \pm 3,2	74,6 \pm 3,5	67,1 \pm 3,1	151,9 \pm 8,2	71,1 \pm 3,3	60,4 \pm 3,2	97,7 \pm 2,5
168	70,9 \pm 2,6	58,8 \pm 3,3	51,8 \pm 1,3	108,1 \pm 8,3	57,8 \pm 2,7	51,0 \pm 1,8	81,4 \pm 3,7
216	58,9 \pm 1,5	43,5 \pm 1,4	44,9 \pm 3,2	93,5 \pm 0,6	50,7 \pm 1,7	44,9 \pm 2,0	67,1 \pm 1,3
288	32,6 \pm 0,9	31,2 \pm 1,0	30,0 \pm 0,4	64,6 \pm 2,0	32,9 \pm 1,6	29,5 \pm 0,9	38,8 \pm 1,0
360	15,1 \pm 0,4	24,6 \pm 1,6	22,6 \pm 0,8	41,3 \pm 1,2	23,2 \pm 0,5	25,4 \pm 0,4	- ^b
456	14,4 \pm 2,2	15,9 \pm 0,5	15,1 \pm 0,5	15,3 \pm 0,2	16,2 \pm 0,9	18,3 \pm 0,4	-
552	15,2 \pm 0,4	13,0 \pm 1,6	11,0 \pm 0,8	10,2 \pm 1,7	11,7 \pm 0,1	12,7 \pm 1,2	-
648	13,3 \pm 0,9	12,1 \pm 0,2	10,2 \pm 0,2	5,6 \pm 0,6	10,2 \pm 0,2	10,3 \pm 0,9	-
816	8,8 \pm 0,1	6,7 \pm 0,1	5,5 \pm 0,3	5,6 \pm 0,3	5,1 \pm 0,2	5,7 \pm 0,1	-
1032	7,4 \pm 0,3	3,9 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	-

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.^b -, no detectado.

Tabla 17.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido capsanteno	capsanteno	<i>cis</i> -capsanteno
0	100,0 ± 2,1 ^a	100,0 ± 2,0	100,0 ± 2,3	100,0 ± 0,8
24	100,0 ± 3,1	100,0 ± 1,6	87,2 ± 0,9	149,9 ± 3,3
48	94,5 ± 0,5	97,0 ± 2,3	75,6 ± 1,0	158,6 ± 2,0
72	89,3 ± 1,6	81,5 ± 3,8	68,6 ± 3,4	148,6 ± 2,8
120	88,3 ± 2,1	80,7 ± 3,1	66,3 ± 1,1	137,6 ± 3,1
168	72,1 ± 2,1	62,1 ± 3,9	60,8 ± 1,4	109,2 ± 5,6
216	74,7 ± 3,3	47,8 ± 1,4	53,6 ± 2,6	97,7 ± 4,6
288	68,2 ± 2,4	39,4 ± 1,7	43,2 ± 2,9	86,2 ± 5,7
360	44,7 ± 2,5	26,3 ± 2,5	26,2 ± 0,5	50,1 ± 2,2
456	39,1 ± 1,1	22,1 ± 0,3	21,1 ± 1,0	39,4 ± 0,7
552	36,6 ± 3,5	17,2 ± 0,7	14,0 ± 0,3	30,1 ± 0,3
648	26,6 ± 0,5	11,8 ± 0,2	11,7 ± 0,2	17,1 ± 0,1
816	16,1 ± 0,1	6,7 ± 0,3	5,9 ± 0,3	9,6 ± 0,6
1032	13,6 ± 1,9	3,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	4,8 ± 0,4

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 18.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 2,1 ^a	100,0 \pm 0,9	100,0 \pm 3,4	100,0 \pm 2,0	100,0 \pm 3,0	100,0 \pm 1,6	100,0 \pm 0,8
24	99,2 \pm 3,4	100,0 \pm 2,5	87,7 \pm 1,6	245,5 \pm 8,5	100,0 \pm 1,9	93,3 \pm 2,8	155,2 \pm 4,1
48	100,0 \pm 1,4	92,5 \pm 3,9	81,7 \pm 1,1	236,3 \pm 7,5	93,8 \pm 1,4	82,4 \pm 2,7	132,9 \pm 3,8
72	92,1 \pm 2,6	93,7 \pm 2,1	80,9 \pm 2,2	247,5 \pm 4,7	92,7 \pm 2,6	78,6 \pm 2,1	130,4 \pm 0,6
120	87,2 \pm 3,4	79,5 \pm 1,5	66,9 \pm 3,0	192,2 \pm 4,8	76,8 \pm 1,6	63,0 \pm 2,6	105,4 \pm 2,4
168	71,0 \pm 2,3	59,9 \pm 2,5	55,0 \pm 1,2	130,5 \pm 6,4	62,1 \pm 0,3	53,6 \pm 2,3	84,8 \pm 1,7
216	57,5 \pm 3,1	54,8 \pm 3,6	53,6 \pm 3,3	129,5 \pm 8,6	61,2 \pm 4,5	50,9 \pm 3,7	76,0 \pm 2,5
288	51,0 \pm 2,9	41,1 \pm 4,7	44,2 \pm 1,1	161,6 \pm 8,5	40,9 \pm 1,8	36,1 \pm 1,3	59,3 \pm 3,5
360	30,9 \pm 1,8	24,7 \pm 2,5	22,8 \pm 2,3	51,7 \pm 3,7	24,4 \pm 1,6	23,6 \pm 1,1	- ^b
456	28,6 \pm 0,4	17,5 \pm 1,2	16,4 \pm 0,7	26,8 \pm 1,8	17,1 \pm 0,8	17,9 \pm 0,8	-
552	21,0 \pm 1,5	12,6 \pm 1,1	10,9 \pm 0,6	14,9 \pm 5,3	10,5 \pm 0,9	10,6 \pm 0,6	-
648	16,3 \pm 0,7	7,9 \pm 1,4	7,3 \pm 1,1	4,5 \pm 0,9	7,4 \pm 0,4	7,2 \pm 0,3	-
816	8,1 \pm 1,3	4,3 \pm 0,1	3,8 \pm 0,4	1,8 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	-
1032	4,9 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	-

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.^b -, no detectado.

Tabla 19.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido capsanteno	capsanteno	cis-capsanteno
0	100,0 ± 1,8 ^a	100,0 ± 0,3	100,0 ± 1,9	100,0 ± 0,9
24	96,6 ± 3,1	98,0 ± 3,6	89,3 ± 0,3	135,3 ± 2,5
48	91,3 ± 1,4	95,7 ± 2,6	87,3 ± 1,5	141,2 ± 7,3
72	85,9 ± 2,9	72,7 ± 3,6	76,1 ± 1,3	146,7 ± 6,7
120	79,6 ± 2,4	66,4 ± 3,8	67,5 ± 3,1	127,3 ± 4,4
168	72,3 ± 6,0	50,2 ± 2,5	61,4 ± 2,6	97,8 ± 3,2
216	64,5 ± 3,7	43,8 ± 1,6	50,9 ± 0,5	97,1 ± 3,4
288	63,4 ± 3,2	38,9 ± 1,9	44,8 ± 1,9	89,9 ± 3,7
360	56,4 ± 2,5	29,1 ± 0,7	29,2 ± 0,2	56,5 ± 1,4
456	37,3 ± 1,4	19,3 ± 0,8	19,7 ± 0,3	37,9 ± 3,1
552	25,9 ± 1,9	15,3 ± 1,5	13,2 ± 0,9	26,9 ± 1,8
648	14,0 ± 0,7	6,1 ± 0,4	6,7 ± 0,5	7,1 ± 0,1
816	8,1 ± 0,7	2,6 ± 0,4	2,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1
1032	5,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 20.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 0,6 ^a	100,0 \pm 2,5	100,0 \pm 2,2	100,0 \pm 4,1	100,0 \pm 2,0	100,0 \pm 0,3	100,0 \pm 0,7
24	100,0 \pm 0,5	100,0 \pm 1,7	92,7 \pm 4,2	222,8 \pm 2,3	100,0 \pm 1,6	90,9 \pm 3,7	162,6 \pm 7,6
48	95,4 \pm 1,3	92,9 \pm 3,1	79,7 \pm 1,1	181,4 \pm 4,1	95,5 \pm 1,5	81,5 \pm 1,6	135,1 \pm 2,3
72	90,7 \pm 2,6	89,7 \pm 1,9	85,4 \pm 3,0	180,8 \pm 7,5	92,6 \pm 3,4	78,0 \pm 2,9	133,3 \pm 6,4
120	81,8 \pm 2,3	80,9 \pm 5,8	68,2 \pm 4,2	169,2 \pm 2,2	81,1 \pm 4,2	66,9 \pm 1,2	109,4 \pm 3,2
168	53,1 \pm 2,5	58,0 \pm 1,3	56,3 \pm 3,9	100,8 \pm 1,6	68,4 \pm 0,5	58,5 \pm 0,5	92,5 \pm 1,4
216	46,0 \pm 0,4	49,5 \pm 1,4	49,1 \pm 2,3	85,2 \pm 4,2	57,2 \pm 2,5	46,6 \pm 2,4	80,8 \pm 3,1
288	40,1 \pm 1,9	42,8 \pm 3,4	40,9 \pm 3,3	55,5 \pm 2,3	45,2 \pm 0,5	37,1 \pm 2,2	58,3 \pm 2,3
360	37,5 \pm 1,4	29,5 \pm 0,6	26,0 \pm 0,6	44,5 \pm 3,7	27,5 \pm 0,5	24,2 \pm 2,0	15,2 \pm 0,4
456	25,8 \pm 2,9	17,6 \pm 0,8	16,4 \pm 1,7	29,3 \pm 1,3	16,7 \pm 2,2	14,3 \pm 0,3	9,9 \pm 0,1
552	20,4 \pm 1,1	9,7 \pm 0,6	9,4 \pm 0,5	9,7 \pm 0,4	7,4 \pm 0,4	7,5 \pm 0,5	-
648	16,3 \pm 1,0	5,3 \pm 0,3	3,6 \pm 0,5	4,4 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	-
816	6,4 \pm 1,5	1,5 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	-	1,0 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	-
1032	1,0 \pm 0,1	- ^b	-	-	-	-	-

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.

^b -, no detectado.

Tabla 21.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 60% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido capsanteno	capsanteno	<i>cis</i> -capsanteno
0	100,0 ± 3,4 ^a	100,0 ± 0,9	100,0 ± 3,5	100,0 ± 4,1
24	100,0 ± 1,8	100,0 ± 1,1	88,5 ± 2,8	185,5 ± 8,6
48	100,0 ± 2,5	100,0 ± 1,5	84,9 ± 3,6	198,7 ± 9,8
72	100,0 ± 1,9	100,0 ± 1,8	76,9 ± 1,5	247,3 ± 1,5
120	96,7 ± 2,4	100,0 ± 1,3	65,1 ± 3,8	219,8 ± 5,5
168	84,4 ± 0,9	93,4 ± 3,6	60,7 ± 1,3	185,6 ± 4,2
216	84,0 ± 2,2	94,9 ± 0,4	54,9 ± 0,3	198,9 ± 0,8
288	83,9 ± 2,8	64,1 ± 3,5	44,3 ± 1,3	145,8 ± 5,2
360	54,3 ± 0,6	43,1 ± 1,8	25,4 ± 1,5	84,2 ± 0,4
456	53,6 ± 1,1	33,2 ± 1,8	18,6 ± 0,5	61,3 ± 2,1
552	28,7 ± 2,7	14,4 ± 0,5	10,9 ± 1,6	22,8 ± 0,5
648	13,1 ± 1,3	3,2 ± 0,5	4,8 ± 0,4	1,3 ± 0,2
816	4,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
1032	1,5 ± 0,1	- ^b	-	-

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

^b -, no detectado.

Tabla 22.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 60% de sustrato poliinsaturado en peso.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 2,9 ^a	100,0 \pm 1,0	100,0 \pm 2,8	100,0 \pm 3,8	100,0 \pm 2,7	100,0 \pm 2,7	100,0 \pm 3,6
24	100,0 \pm 1,3	85,8 \pm 2,9	85,9 \pm 2,7	228,7 \pm 1,3	100,0 \pm 2,4	90,5 \pm 1,9	139,5 \pm 4,8
48	100,0 \pm 4,4	89,3 \pm 3,8	84,7 \pm 1,1	272,8 \pm 9,5	100,0 \pm 0,7	91,5 \pm 1,0	134,5 \pm 1,0
72	99,0 \pm 1,8	89,6 \pm 0,8	87,6 \pm 0,9	244,3 \pm 9,9	97,9 \pm 0,6	84,8 \pm 0,3	128,9 \pm 3,5
120	60,2 \pm 2,1	75,5 \pm 4,4	69,9 \pm 0,2	197,1 \pm 4,7	80,8 \pm 4,5	71,5 \pm 3,9	102,1 \pm 9,0
168	48,2 \pm 1,3	66,9 \pm 4,2	67,2 \pm 3,5	157,6 \pm 6,4	77,8 \pm 1,1	64,8 \pm 1,9	96,3 \pm 3,3
216	48,2 \pm 0,6	65,2 \pm 1,1	62,4 \pm 3,6	174,2 \pm 6,3	71,8 \pm 0,6	58,2 \pm 1,2	89,3 \pm 1,7
288	44,4 \pm 1,3	44,8 \pm 6,4	47,9 \pm 4,3	70,9 \pm 2,0	53,2 \pm 2,2	47,6 \pm 1,0	62,0 \pm 3,1
360	36,6 \pm 1,9	25,6 \pm 0,2	25,6 \pm 0,5	58,4 \pm 3,1	27,9 \pm 0,4	26,2 \pm 1,8	33,2 \pm 1,4
456	34,5 \pm 1,7	16,8 \pm 1,9	17,7 \pm 0,5	38,7 \pm 0,6	18,7 \pm 1,1	19,8 \pm 1,5	-
552	25,3 \pm 2,5	4,5 \pm 0,8	7,3 \pm 1,3	6,9 \pm 0,8	9,2 \pm 1,7	8,5 \pm 1,1	-
648	4,9 \pm 1,2	2,2 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,8	3,3 \pm 0,1	-
816	- ^b	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	-	2,1 \pm 0,3	3,8 \pm 0,5	-
1032	-	-	-	-	-	1,0 \pm 0,1	-

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.

^b -, no detectado.

Por ello, para establecer comparaciones concretas, se realiza el estudio cinético de la evolución individual de pigmentos que, por su estructura y presencia en el perfil carotenóide, son los más representativos de ambas fracciones: β -caroteno, zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno. La obtención de los parámetros cinéticos (orden de reacción y constante cinética, κ) según el método integral indica un modelo cinético de primer orden para todos los pigmentos y en todas las mezclas ensayadas, mostrando los resultados en la Tabla 23.

β -caroteno y zeaxanteno presentan en todas las mezclas una evolución muy similar con diferencias (en valor absoluto) en la constante κ , de un 1% en la mezcla del 20% a un 15% en la mezcla del 60%. La degradación que experimenta capsanteno, se asemeja en algunos casos a la mostrada por β -caroteno y zeaxanteno, aunque adquiere valores de κ inferiores. La máxima similitud se produce en la mezcla del 60% (aunque siguen existiendo diferencias significativas). Finalmente capsorrubeno sigue una línea degradativa menos acelerada en todos los casos, con diferencias notables que disminuyen, respecto a capsanteno, a medida que aumenta el porcentaje de sustrato poliinsaturado en la mezcla (de una diferencia del 45% en la mezcla del 0% a una del 32% en la mezcla del 60%).

Las comparaciones establecidas anteriormente reflejan los resultados obtenidos en los estudios de oxidación de los citados pigmentos por radicales peróxido, tomando en consideración que las comparaciones han de establecerse entre pigmentos en forma esterificada puesto que es la forma en la que se encuentran originariamente y, por tanto, durante la reacción de oxidación de las mezclas de fruto deshidratado y semillas. Así, en aquellas experiencias, β -caroteno y zeaxanteno diesterificados mostraban los mayores valores de κ' , seguidos de capsanteno y capsorrubeno mostrando éste la línea degradativa más lenta, destacando por tanto una distinción básica entre pigmentos cetónicos y no cetónicos.

Aunque esta distinción (con significación estadística) también se repite en las experiencias de este apartado, se aprecia una mayor semejanza entre los valores de κ para capsanteno y aquellos correspondientes a β -caroteno y zeaxanteno al aumentar el porcentaje de sustrato lipídico en la mezcla. Este hecho indica que el entorno lipídico modula las reacciones de oxidación al margen de las características estructurales de cada pigmento e incluso del ácido graso por el que se esterifican.

Tabla 23.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de β -caroteno, zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado ensayadas.

pigmento	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
0 %		
β -caroteno	34,29 \pm 0,81	0,988
zeaxanteno	35,89 \pm 0,93	0,990
capsanteno	31,73 \pm 0,86	0,981
capsorrubeno	17,59 \pm 0,74	0,960
20 %		
β -caroteno	39,40 \pm 0,91	0,995
zeaxanteno	38,95 \pm 0,75	0,995
capsanteno	33,43 \pm 0,60	0,995
capsorrubeno	20,02 \pm 0,66	0,985
40 %		
β -caroteno	48,38 \pm 1,74	0,983
zeaxanteno	49,77 \pm 1,80	0,980
capsanteno	44,26 \pm 1,67	0,977
capsorrubeno	27,18 \pm 1,14	0,976
60 %		
β -caroteno	41,57 \pm 1,74	0,977
zeaxanteno	47,96 \pm 1,75	0,977
capsanteno	47,08 \pm 1,65	0,979
capsorrubeno	31,84 \pm 2,31	0,920

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\% \text{Ret}) = 4,605 - \kappa \times t$. E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$).

Capsanteno, esterificado por ácidos grasos saturados y zeaxanteno, esterificado por ácidos grasos poliinsaturados, muestran velocidades de degradación similares. Ambos se encuentran en un sustrato lipídico poliinsaturado y es la naturaleza de dicho entorno común la que marca una evolución en la degradación de todos los pigmentos que tiende a ser más homogénea a medida que el aporte lipídico es mayor.

Las peculiaridades estructurales de cada pigmento no se muestran entonces tan determinantes, lo que apunta a que las reacciones de oxidación que tienen lugar en la cadena polienoica (estructura idéntica en todos los pigmentos del perfil carotenoides estudiado) son las que adquieren mayor relevancia, y transcurren para todos los pigmentos bajo idénticos mecanismos y, a igual velocidad a medida que la presencia del sustrato lipídico poliinsaturado se hace mayor. Tan solo capsorrubeno se desmarca de esta tendencia y sigue mostrando mayor estabilidad en todas las mezclas ensayadas y con diferencias similares en el valor de κ respecto a los de β -caroteno, zeaxanteno y capsanteno.

Del resto de pigmentos que componen la fracción amarilla, β -criptoxanteno y cucurbitaxanteno A, muestran velocidades de degradación similares a β -caroteno y zeaxanteno, en todas las mezclas ensayadas, mientras que violaxanteno se degrada a velocidades que se asemejan más a las de capsanteno. En todos los casos apuntados se mantiene la tónica de que a medida que aumenta el porcentaje de sustrato lipídico en la mezcla, la similitud en la velocidad de degradación es mayor. Como ejemplo de este acercamiento en los valores de κ , en la Figura 22 se representa, en escala semilogarítmica, el modelo cinético obtenido para capsorrubeno y violaxanteno en las mezclas del 0% y 60%. Tomando como referencia a violaxanteno, que en ambas mezclas toma valores de κ superiores ($30,65 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ y $46,44 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ respectivamente), en la mezcla de referencia, la diferencia entre las constantes cinéticas de ambos pigmentos es del 43%, mientras que en la más concentrada en sustrato lipídico poliinsaturado, la diferencia es del 31%.

Al margen de las reacciones de oxidación, destacan las reacciones de isomerización que tienen lugar en todas las mezclas, durante un periodo de 120-168 horas de reacción, aunque en algunos casos como la formación de isómeros *cis* de capsanteno en la mezcla del 60%, estas reacciones son constatables hasta 288 horas después del inicio de la oxidación.

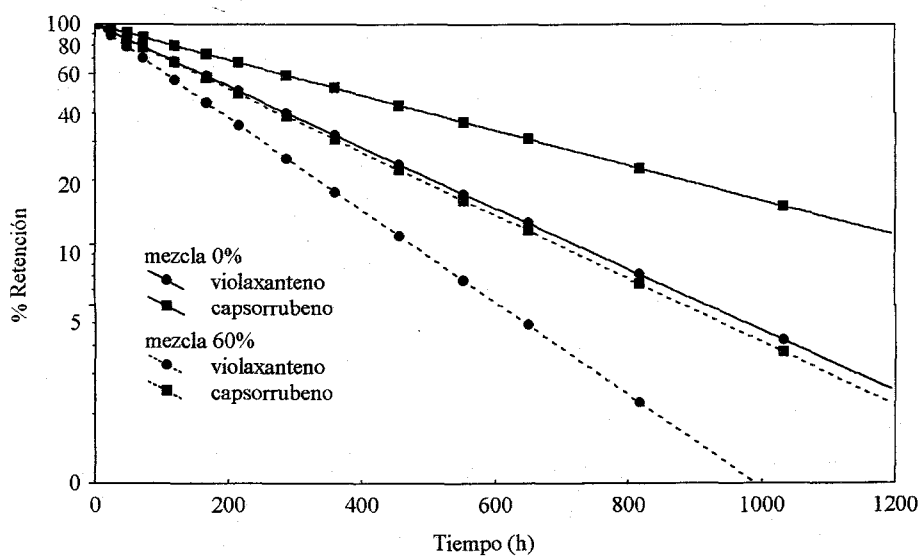


Figura 22.- Evolución del porcentaje de retención según el modelo cinético de primer orden obtenido para los pigmentos capsorrubeno y violaxanteno en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato poliinsaturado al 0% y 60%.

En esta etapa, los pigmentos capsanteno, zeaxanteno y β -caroteno experimentan mayoritariamente, al margen de la degradación, una transformación a sus correspondientes isómeros *cis*, siendo éste el paso previo a la oxidación definitiva a productos incoloros. Los isómeros *cis* que se forman, constituyen una pérdida de la capacidad colorante puesto que su intensidad en color es menor que la proporcionada por las formas *trans*. Por ello estas reacciones se consideran reacciones degradativas siendo las que tienen lugar predominantemente en los estadios iniciales de la experiencia.

En paralelo se producen reacciones de degradación a la vista de los descensos en xantofilas amarillas como β -criptoxanteno, cucurbitaxanteno A y violaxanteno, pero en esta primera etapa tienen lugar a menor velocidad, debido al efecto protector que la presencia de antioxidantes produce, sobre todo en las mezclas más enriquecidas en sustrato lipídico y, precisamente debido a este efecto protector, la isomerización ocurre con mayor extensión en las mezclas con mayor porcentaje de semillas.

Una vez superada esta etapa, las reacciones de isomerización continúan pero la velocidad de oxidación a productos incoloros transcurre a mayor velocidad siendo imposible constatar aumentos en la presencia de isómeros. Queda por tanto reflejado que un mantenimiento en el porcentaje de retención de pigmentos, no implica que no se hayan producido cambios en la composición carotenoide, que son consecuencia del inicio de reacciones degradativas.

2.- Sustrato lipídico monoinsaturado.

- Velocidad de oxidación según fracciones isocrómicas de pigmentos. Estudio cinético.

En la Figura 23 se muestra la evolución del porcentaje de retención del total de pigmentos en el tiempo, para las mezclas de fruto deshidratado con un 20% y un 40% de sustrato monoinsaturado añadido y para la de referencia (mezcla 0%). Las líneas se corresponden con ajustes a los datos de polinomios de orden cuatro, que son los que mejor representan la evolución experimentada por el porcentaje de retención de pigmentos. Ocurre una clara diferenciación entre la secuencia seguida por la concentración carotenoide del fruto deshidratado y molido sin semillas y la que presentan las distintas mezclas que incluyen sustrato lipídico, mostrando éstas últimas entre sí un comportamiento más próximo, aunque también se puede apreciar una tendencia a una mayor estabilidad a medida que se incrementa el porcentaje de sustrato.

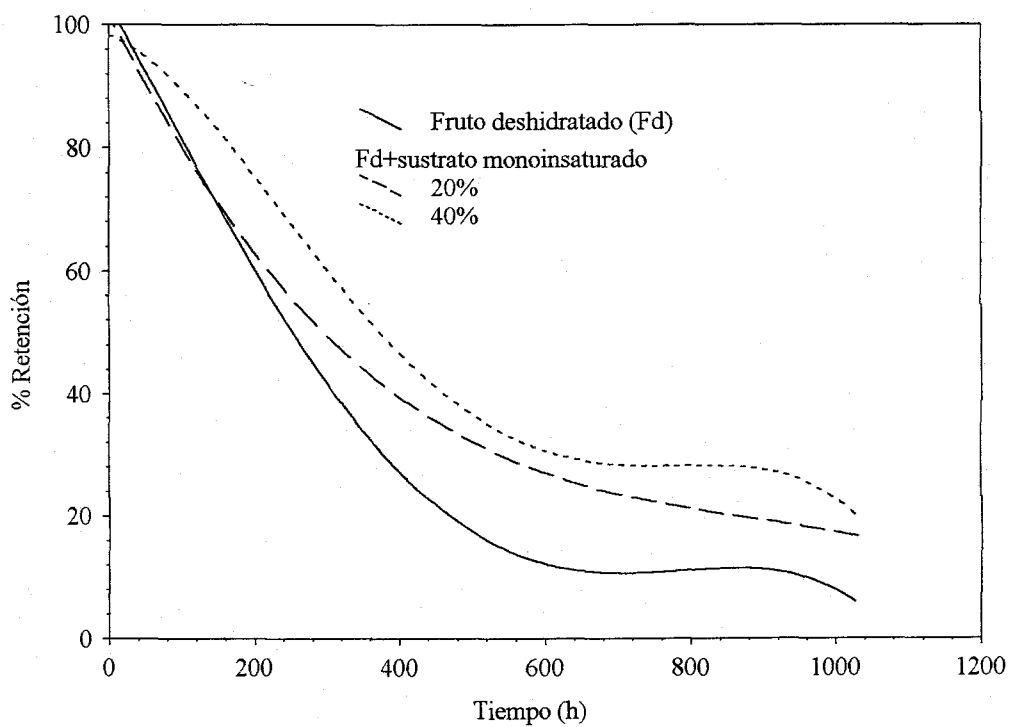


Figura 23.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales de las mezclas, de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado, elaboradas. Ajuste a polinomios de orden 4.

En las Tablas 24 y 25 se muestran los datos de evolución del porcentaje de retención para pigmentos rojos, amarillos y totales en las mezclas ensayadas. La evolución de las fracciones de pigmentos en la mezcla de referencia es la mostrada en la Tabla 9.

Como se ha establecido en el apartado 1 de este capítulo, en una primera etapa, que abarca la vida útil del producto, la estabilidad de la capacidad colorante se incrementa con el aumento de la presencia de semillas de pimiento, aunque ello constituya un enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, cuando la reacción alcanza un avance del 60-70%, las velocidades degradativas se invierten, siendo las mezclas con más proporción en sustrato lipídico las que muestran la menor retención. Este efecto diferenciado al principio y al final de la experiencia no se ha observado en este caso, utilizando sustrato monoinsaturado, presentándose una estabilidad superior a mayor porcentaje de semillas, desde el principio hasta el final, sin observar una etapa en la que las líneas de evolución se crucen.

No se puede concluir por tanto en la existencia de una etapa en la que las reacciones degradativas del medio lipídico se aceleren y contribuyan a la oxidación de pigmentos, aumentando su velocidad de reacción. En este caso, al tratarse de un medio lipídico menos sensible a la oxidación, ésta tiene lugar pero en progresión uniforme a lo largo de toda la experiencia.

Para cuantificar el efecto observado gráficamente y por las tablas de evolución, se realiza el estudio cinético de los datos obtenidos, que además permitirá comparar y deducir la mejora que produce la adición de un sustrato lipídico de naturaleza distinta al habitual. La aplicación del método integral a los datos obtenidos permite obtener los parámetros cinéticos de la reacción de degradación. En todos los casos el modelo cinético que mejor representa la degradación de pigmentos carotenoides es el de primer orden.

La Figura 24 representa, en escala semilogarítmica, los modelos cinéticos obtenidos incluyendo el de la mezcla de referencia (0%). La Tabla 26 expone los parámetros cinéticos así como el coeficiente de correlación.

Los valores que adopta la constante de velocidad κ , en cada caso, confirman las apreciaciones anteriores, es decir, la degradación carotenoide tiene lugar más lentamente a mayor presencia de sustrato lipídico monoinsaturado en la mezcla.

Tabla 24.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 2,7 ^a	100,0 ± 2,5	100,0 ± 2,6
24	100,0 ± 2,8	95,8 ± 3,9	99,4 ± 3,4
48	93,1 ± 2,5	85,6 ± 1,6	90,0 ± 2,1
72	85,7 ± 1,1	86,6 ± 2,7	86,1 ± 1,8
120	77,8 ± 0,9	67,8 ± 1,0	73,6 ± 0,9
168	71,2 ± 2,3	64,1 ± 3,1	68,2 ± 2,6
216	69,1 ± 1,3	60,4 ± 1,4	65,5 ± 1,3
288	52,6 ± 2,3	49,3 ± 2,7	51,2 ± 2,5
360	41,6 ± 1,2	36,2 ± 1,0	39,3 ± 1,1
456	35,1 ± 0,6	30,2 ± 0,2	33,0 ± 0,4
552	33,9 ± 2,3	28,3 ± 1,7	31,5 ± 2,0
648	29,6 ± 0,9	23,2 ± 0,6	26,9 ± 0,8
816	22,3 ± 1,5	15,9 ± 0,8	19,6 ± 1,2
1032	19,5 ± 1,1	13,3 ± 0,4	16,9 ± 0,8

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 25.- Evolución del porcentaje de retención de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales durante la degradación térmica a 343 K del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	Rojos	Amarillos	Totales
0	100,0 ± 2,6 ^a	100,0 ± 1,9	100,0 ± 2,3
24	100,0 ± 0,9	100,0 ± 0,3	100,0 ± 0,6
48	98,0 ± 3,1	96,6 ± 1,5	97,4 ± 2,4
72	93,8 ± 1,3	94,3 ± 0,8	94,0 ± 0,9
120	86,6 ± 0,2	82,2 ± 2,4	84,7 ± 1,1
168	82,6 ± 1,1	75,8 ± 1,8	79,8 ± 1,4
216	79,5 ± 3,0	72,6 ± 1,1	76,7 ± 2,2
288	63,0 ± 1,4	57,5 ± 1,9	60,7 ± 1,5
360	51,5 ± 0,5	45,6 ± 1,3	49,0 ± 0,8
456	41,9 ± 0,8	37,9 ± 1,0	40,2 ± 0,8
552	36,7 ± 0,4	31,5 ± 0,2	34,5 ± 0,4
648	32,9 ± 0,4	28,2 ± 0,6	30,9 ± 0,5
816	29,2 ± 0,6	22,7 ± 0,3	26,5 ± 0,5
1032	23,1 ± 0,8	15,3 ± 0,1	19,8 ± 0,4

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

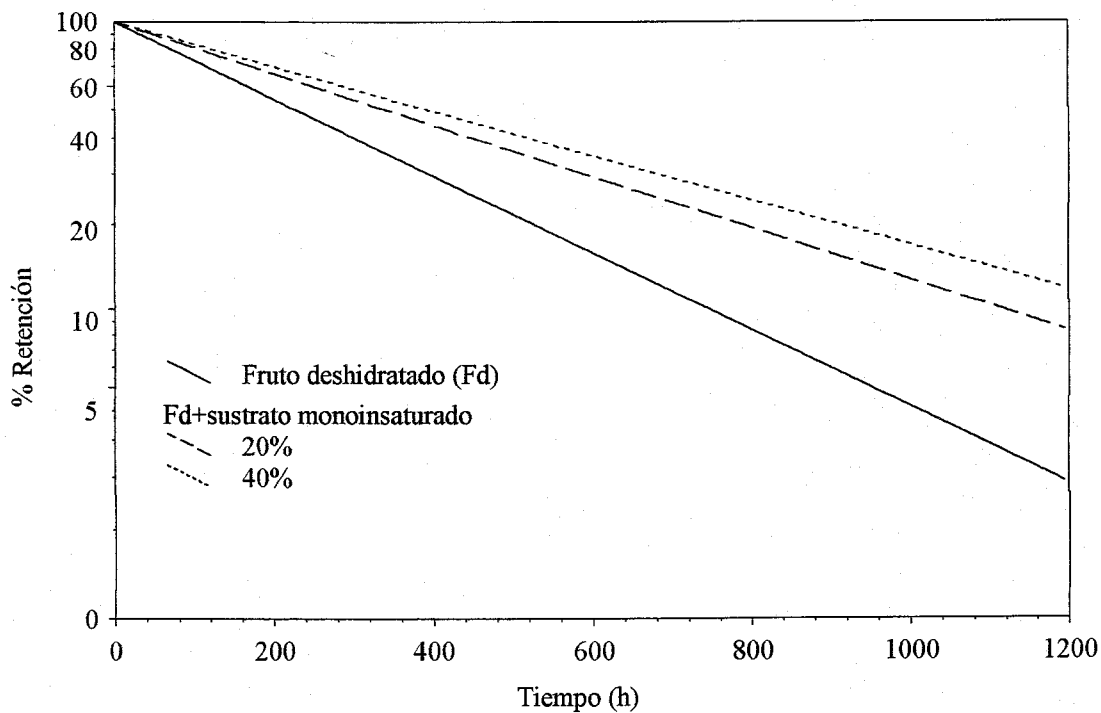


Figura 24.- Modelos cinéticos obtenidos para la evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales en la reacción de oxidación a 343K en cada mezcla de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado.



Tabla 26.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado ensayadas.

pigmentos	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
		0%
rojos	26,91 \pm 2,48	0,990
amarillos	34,37 \pm 2,96	0,985
totales	29,63 \pm 2,72	0,989
		20%
rojos	18,37 \pm 0,65	0,977
amarillos	22,17 \pm 0,72	0,983
totales	19,85 \pm 0,67	0,980
		40%
rojos	15,69 \pm 0,61	0,981
amarillos	18,96 \pm 0,49	0,992
totales	17,18 \pm 0,60	0,987

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\% \text{Ret}) = 4,605 - \kappa \times t$.
E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$).

Respecto a la mezcla de referencia (0%) y considerando el total de pigmentos, se producen descensos en el valor de κ del 33% en el caso de la mezcla con un 20% de semillas y del 42% para la mezcla del 40% (diferencias significativas). También existen diferencias significativas al comparar la constante cinética de degradación de cada fracción de pigmentos en función del porcentaje de semillas adicionado.

Se sigue produciendo una distinta evolución de las fracciones de pigmentos rojos y amarillos que se refleja en el valor de la correspondiente constante cinética κ , que toma valores inferiores entre un 17% y un 20% para la fracción roja, respecto a la constante cinética de la fracción amarilla (valores con diferencias significativas).

- Velocidad de oxidación de pigmentos individuales. Estudio cinético.

En las Tablas 27 a 30 se muestran los datos de porcentaje de retención de cada pigmento en el transcurso de la experiencia para las mezclas de fruto deshidratado con sustrato monoinsaturado al 20% y 40%. De igual forma que en el apartado 1 de este capítulo, se obtienen los parámetros cinéticos correspondientes a la degradación de β -caroteno, zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno. El modelo cinético que mejor se ajusta a los datos experimentales (en función del coeficiente de correlación) sigue siendo de primer orden y los valores de la constante cinética κ para los pigmentos citados se muestran en la Tabla 31.

Al igual que en las mezclas con sustrato poliinsaturado, la evolución que experimentan los pigmentos con grupos ceto en los extremos de la cadena polienoica es diferente del resto aunque con diferencias menos acusadas. β -caroteno muestra la mayor velocidad de degradación (con valores de κ idénticos en las dos mezclas) seguido de zeaxanteno y capsanteno, mostrando éstos últimos, valores de κ más próximos en la mezcla del 40%. Capsorrubeno tampoco modifica su velocidad de degradación al aumentar la presencia de semillas (del 20% al 40%) en la mezcla, pero en cualquier caso muestra los valores de κ más bajos.

Se puede concluir que al aumentar el porcentaje de sustrato lipídico adicionado, al margen de que la velocidad de degradación de pigmentos descienda (salvo las excepciones comentadas de β -caroteno y capsorrubeno), ésta es más homogénea en todos los pigmentos.

Tabla 27.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido capsanteno	capsanteno	<i>cis</i> -capsanteno
0	100,0 ± 2,3 ^a	100,0 ± 4,3	100,0 ± 2,4	100,0 ± 2,9
24	98,4 ± 2,6	100,0 ± 1,1	84,3 ± 2,6	152,3 ± 6,4
48	88,1 ± 1,9	100,0 ± 1,3	75,0 ± 2,4	145,5 ± 1,8
72	86,5 ± 1,2	94,4 ± 3,0	71,0 ± 1,7	126,0 ± 4,8
120	78,8 ± 2,7	82,5 ± 2,2	65,8 ± 2,4	110,2 ± 3,7
168	71,1 ± 2,3	71,5 ± 2,1	60,9 ± 4,2	99,7 ± 5,7
216	71,9 ± 1,9	70,3 ± 1,4	53,0 ± 1,2	112,0 ± 3,1
288	64,1 ± 3,3	44,0 ± 3,2	41,3 ± 3,8	78,0 ± 2,1
360	47,0 ± 0,9	38,0 ± 0,7	34,2 ± 0,8	59,4 ± 2,5
456	41,5 ± 1,4	30,4 ± 0,8	26,3 ± 0,6	55,8 ± 1,6
552	39,9 ± 0,9	29,2 ± 1,1	25,6 ± 2,4	53,6 ± 2,9
648	37,4 ± 1,3	26,5 ± 1,1	22,9 ± 1,9	43,7 ± 2,0
816	31,5 ± 0,3	18,4 ± 0,3	18,1 ± 1,9	29,1 ± 1,7
1032	27,2 ± 1,6	16,2 ± 0,4	16,1 ± 1,0	24,9 ± 0,9

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 28.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 20% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 1,0 ^a	100,0 \pm 0,7	100,0 \pm 2,4	100,0 \pm 2,3	100,0 \pm 4,3	100,0 \pm 3,7	100,0 \pm 2,4
24	96,7 \pm 3,7	100,0 \pm 0,5	81,0 \pm 2,9	159,9 \pm 9,3	97,9 \pm 3,5	82,0 \pm 2,6	145,4 \pm 9,7
48	86,4 \pm 4,4	90,0 \pm 1,0	73,4 \pm 0,7	146,2 \pm 2,5	86,2 \pm 0,4	73,3 \pm 0,1	129,4 \pm 2,0
72	82,6 \pm 2,1	93,5 \pm 2,2	73,7 \pm 2,6	172,6 \pm 6,5	86,7 \pm 2,7	71,9 \pm 0,3	135,5 \pm 5,8
120	73,7 \pm 2,2	68,2 \pm 3,4	54,0 \pm 2,6	116,7 \pm 4,3	68,8 \pm 2,8	59,7 \pm 3,0	101,4 \pm 4,7
168	68,4 \pm 3,6	63,1 \pm 0,8	54,3 \pm 1,6	117,2 \pm 7,9	65,0 \pm 0,7	53,8 \pm 0,4	96,8 \pm 3,2
216	64,9 \pm 3,2	66,0 \pm 0,7	49,1 \pm 1,2	103,3 \pm 5,8	61,3 \pm 0,8	49,3 \pm 0,4	87,1 \pm 4,0
288	46,0 \pm 1,9	54,3 \pm 3,5	45,5 \pm 3,9	86,8 \pm 3,1	49,0 \pm 3,1	39,7 \pm 1,7	76,1 \pm 2,1
360	38,3 \pm 1,6	37,1 \pm 0,9	31,0 \pm 0,7	58,4 \pm 1,3	34,2 \pm 0,9	34,3 \pm 0,5	50,0 \pm 2,6
456	31,4 \pm 1,5	33,4 \pm 1,6	26,0 \pm 1,2	50,0 \pm 3,0	28,1 \pm 1,4	27,4 \pm 1,1	40,9 \pm 2,8
552	30,9 \pm 1,8	29,7 \pm 1,8	25,5 \pm 1,4	48,3 \pm 1,1	27,5 \pm 1,1	24,3 \pm 1,1	31,8 \pm 2,2
648	27,3 \pm 0,2	24,3 \pm 0,9	20,4 \pm 0,4	37,1 \pm 3,2	21,0 \pm 1,0	22,8 \pm 1,3	20,3 \pm 2,7
816	18,8 \pm 0,4	17,4 \pm 0,8	14,6 \pm 0,8	27,9 \pm 1,3	15,0 \pm 0,9	11,3 \pm 0,7	19,2 \pm 1,2
1032	16,9 \pm 1,2	14,4 \pm 1,1	12,2 \pm 0,9	23,5 \pm 1,1	11,8 \pm 0,9	9,9 \pm 0,1	15,0 \pm 0,6

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.

Tabla 29.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos rojos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	capsorrubeno	5,6-epóxido capsanteno	capsanteno	<i>cis</i> -capsanteno
0	100,0 ± 2,9 ^a	100,0 ± 0,9	100,0 ± 1,7	100,0 ± 5,7
24	97,2 ± 0,5	100,0 ± 0,5	88,9 ± 1,6	137,2 ± 7,8
48	95,9 ± 3,7	100,0 ± 1,3	82,3 ± 0,7	141,4 ± 8,6
72	89,0 ± 3,7	100,0 ± 3,5	78,1 ± 0,7	138,9 ± 9,2
120	83,3 ± 1,3	87,0 ± 0,6	75,1 ± 3,7	119,4 ± 9,8
168	76,6 ± 1,4	93,7 ± 1,1	73,8 ± 2,9	109,6 ± 2,2
216	70,6 ± 0,9	72,3 ± 5,4	66,0 ± 1,2	121,3 ± 9,0
288	63,1 ± 2,1	52,3 ± 1,1	51,3 ± 4,2	94,4 ± 3,9
360	56,9 ± 2,5	47,9 ± 0,6	42,9 ± 0,1	71,7 ± 3,8
456	45,7 ± 0,8	41,4 ± 2,7	35,3 ± 2,6	57,7 ± 2,6
552	40,9 ± 1,7	35,0 ± 1,3	28,6 ± 2,2	56,3 ± 4,1
648	37,5 ± 1,0	33,8 ± 1,1	25,9 ± 0,8	49,4 ± 0,7
816	33,9 ± 0,3	24,9 ± 0,9	23,3 ± 1,6	42,6 ± 1,9
1032	28,1 ± 2,2	21,8 ± 3,0	21,2 ± 0,5	25,5 ± 0,6

^a valor medio ± desviación estándar, n=4.

Tabla 30.- Evolución del porcentaje de retención de pigmentos amarillos durante la oxidación del fruto deshidratado y molido con un 40% de sustrato monoinsaturado en peso.

tiempo (h)	violaxanteno	cucurbitaxanteno A	zeaxanteno	cis-zeaxanteno	β -criptoxanteno	β -caroteno	cis- β -caroteno
0	100,0 \pm 1,0 ^a	100,0 \pm 0,7	100,0 \pm 2,4	100,0 \pm 4,3	100,0 \pm 0,9	100,0 \pm 0,3	100,0 \pm 3,9
24	97,9 \pm 1,6	97,0 \pm 1,3	92,5 \pm 0,5	186,5 \pm 3,7	100,0 \pm 2,4	79,6 \pm 1,4	285,4 \pm 3,5
48	98,3 \pm 2,8	94,9 \pm 0,6	86,6 \pm 0,8	185,0 \pm 8,9	98,3 \pm 4,6	71,9 \pm 1,1	268,9 \pm 8,7
72	95,0 \pm 1,9	96,5 \pm 0,9	83,4 \pm 2,3	204,9 \pm 2,5	96,4 \pm 2,6	66,4 \pm 0,3	256,5 \pm 7,4
120	80,4 \pm 4,7	81,9 \pm 4,3	76,3 \pm 4,5	158,1 \pm 8,1	87,9 \pm 0,4	57,6 \pm 0,6	222,5 \pm 9,7
168	74,6 \pm 2,2	73,8 \pm 2,8	70,3 \pm 1,0	148,2 \pm 9,3	79,3 \pm 1,0	50,7 \pm 1,2	208,7 \pm 5,7
216	73,5 \pm 2,1	71,4 \pm 3,2	67,6 \pm 3,3	125,2 \pm 9,8	82,0 \pm 1,2	49,1 \pm 0,6	192,2 \pm 5,2
288	60,6 \pm 2,1	54,9 \pm 2,9	56,1 \pm 2,9	101,8 \pm 7,5	62,9 \pm 5,7	40,1 \pm 3,5	131,9 \pm 4,3
360	56,6 \pm 1,2	44,2 \pm 1,0	41,6 \pm 0,1	77,4 \pm 4,2	45,4 \pm 1,3	34,5 \pm 1,3	85,9 \pm 3,3
456	47,8 \pm 0,6	36,9 \pm 1,1	34,1 \pm 0,1	66,9 \pm 2,0	36,4 \pm 0,2	28,6 \pm 2,9	76,8 \pm 1,5
552	38,2 \pm 2,4	29,4 \pm 4,7	29,5 \pm 2,3	51,3 \pm 3,6	29,0 \pm 4,1	24,8 \pm 0,9	76,2 \pm 3,7
648	36,0 \pm 0,9	28,6 \pm 0,3	26,7 \pm 0,5	45,0 \pm 3,1	27,6 \pm 0,6	18,8 \pm 2,4	61,6 \pm 1,7
816	30,9 \pm 0,2	23,4 \pm 1,6	22,3 \pm 0,3	38,1 \pm 3,2	22,3 \pm 0,1	13,1 \pm 0,1	49,0 \pm 3,2
1032	21,7 \pm 1,2	16,1 \pm 0,6	15,4 \pm 0,4	23,2 \pm 2,3	14,9 \pm 0,3	8,5 \pm 0,1	28,9 \pm 0,7

^a valor medio \pm desviación estándar, n=4.

Tabla 31.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de β -caroteno, zeaxanteno, capsanteno y capsorrubeno en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado ensayadas.

pigmento	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
20 %		
β -caroteno	25,27 \pm 0,73	0,987
zeaxanteno	24,09 \pm 0,75	0,979
capsanteno	22,05 \pm 1,04	0,965
capsorrubeno	14,85 \pm 0,66	0,968
40 %		
β -caroteno	25,76 \pm 0,51	0,993
zeaxanteno	19,70 \pm 0,64	0,989
capsanteno	18,63 \pm 0,87	0,966
capsorrubeno	14,03 \pm 0,51	0,982

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\%Ret) = 4,605 - \kappa \times t$. E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$).

Salvo la más clara distinción entre pigmentos cetónicos y no cetónicos (que sí marca diferencias de comportamiento) las características estructurales de cada pigmento adquieren menos importancia para determinar su velocidad de oxidación. Como ejemplo de esta situación, se expone el mismo que en el apartado 1 de este capítulo representando, en la Figura 25 en escala semilogarítmica, los modelos cinéticos para capsorrubeno y violaxanteno en las mezclas del 20% (κ violaxanteno= $20,19 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, Figura 25A) y 40% (κ violaxanteno= $15,35 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, Figura 25B). La similitud entre ambas constantes es mayor al aumentar la presencia de semillas en la mezcla.

Además de capsanteno, β -caroteno y zeaxanteno experimentan reacciones de isomerización. Estas reacciones transcurren a mayor velocidad que las degradativas hasta las 168-216 horas de reacción. En la mezcla del 40% la isomerización alcanza las cotas superiores llegando los isómeros *cis* de zeaxanteno y β -caroteno a superar el 200% de retención en algunos puntos concretos de la reacción.

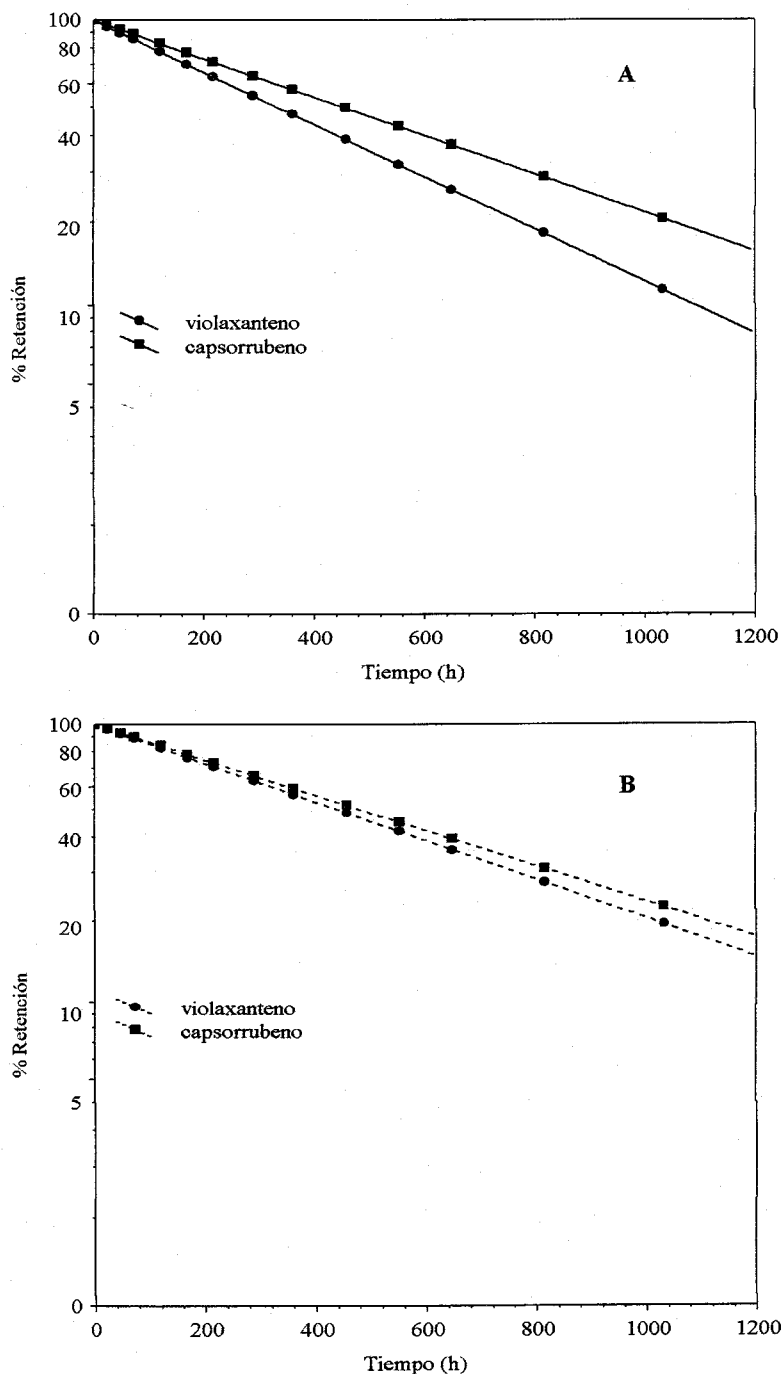


Figura 25.- Evolución del porcentaje de retención según el modelo cinético de primer orden obtenido para los pigmentos capsorrubeno y violaxanteno en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado al 20% (A) y 40% (B).

3.- Estudio comparativo de la velocidad de oxidación carotenoides en ambos sustratos lipídicos.

La aplicación del estudio cinético a la oxidación de pigmentos carotenoides en ambos tipos de mezcla (sustrato lipídico monoinsaturado y poliinsaturado), permite la obtención de los correspondientes parámetros que pueden ser comparados, para establecer la mejora que supone un cambio en la naturaleza del sustrato lipídico en la estabilidad de pigmentos carotenoides. Como se puede deducir de los apartados 1 y 2, la degradación de pigmentos sigue la misma línea en ambos tipos de mezcla. Sin embargo, de la comparación de las constantes cinéticas de degradación se deduce que la velocidad a la que transcurre la oxidación de pigmentos no es la misma en un sustrato lipídico y otro.

Las mezclas a comparar son las del 20% y 40% con ambos tipos de sustrato lipídico. Considerando la totalidad de la experiencia de oxidación y para pigmentos totales, la constante cinética κ adquiere valores de $31,56 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ y $41,31 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ en el caso de las mezclas ricas en ácido linoleico y $19,85 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ y $17,18 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ para las mezclas enriquecidas con ácido oleico. El descenso en el valor de la constante cinética κ para pigmentos totales en las mezclas del 20% y 40% es de un 37% y un 58% respectivamente.

El medio lipídico, aportado por las semillas, que rodea e impregna a la pigmentación del fruto es diferente en un caso y en otro y, su mayor presencia, también tiene un efecto diferenciado en cuanto a las reacciones degradativas, que se hacen más o menos patentes. Las semillas de pimiento aportan un medio poliinsaturado, cuyo principal componente es ácido linoleico (18:2) mientras que las semillas de girasol empleadas aportan ácido oleico (18:1). Es por tanto la diferencia en composición del medio lipídico lo que provoca tan acusadas diferencias.

Los ácidos grasos como responsables mayoritarios de la generación de radicales peroxilo a través de mecanismos de autooxidación tienen, por tanto, un papel primordial en la estabilidad del color de las mezclas ensayadas. En dichos mecanismos, el paso limitante de velocidad global del proceso es la reacción de propagación, cuya velocidad depende de la fuerza del enlace C-H a romper. La energía de disociación de dicho enlace, si el hidrógeno es de tipo *alílico*, es aproximadamente 10 kcal/mol mayor que la de un hidrógeno tipo *bis-alílico*. Como consecuencia, sólo se consiguen velocidades de autooxidación de ácidos monoenoicos,

razonables a elevadas temperaturas mientras que en el caso de ácidos dienoicos ocurren a temperatura ambiente (Porter y colaboradores, 1995).

Por tanto, el tipo de ácido graso que compone mayoritariamente el sustrato lipídico es determinante para la velocidad con la que los procesos de oxidación tienen lugar. Un cambio de composición cualitativa produce cambios muy sustanciales en la velocidad de degradación. No es que el proceso de degradación no tenga lugar, sino que se adiciona un soporte lipídico protector que a pesar de generar productos oxidantes, como se ha comentado anteriormente, lo hace más lentamente.

Es importante destacar que un cambio en el sustrato lipídico afecta a la velocidad con que las reacciones de oxidación de pigmentos transcurren pero no modifica el orden de estabilidad establecido en un tipo de mezcla y otro. Los pigmentos rojos muestran la mayor estabilidad en ambos sustratos y, dentro de cada fracción, las conclusiones que del estudio individualizado de pigmentos se obtienen, se mantienen también en ambos sustratos. Este hecho indica que los mecanismos por los que transcurre la oxidación de pigmentos no se modifican, tan solo se modifica la velocidad a la que tienen lugar las reacciones.

Un claro ejemplo de esta conclusión es la diferente evolución de las reacciones de isomerización en ambos tipos de sustratos. La Figura 26 muestra la evolución del porcentaje de retención de los isómeros *cis* de capsanteno en las mezclas al 20% (Figura 26A) y 40% (Figura 26B) diferenciando sustrato monoinsaturado y sustrato poliinsaturado.

En los dos casos las cotas máximas de porcentaje de retención se alcanzan al mismo tiempo, entre las 48 y 72 horas de reacción. A partir de ese momento se observa un descenso diferenciado. En la mezcla enriquecida con ácido linoleico el porcentaje de retención desciende a mayor velocidad que en la mezcla enriquecida con ácido oleico. La evolución del porcentaje de retención de isómeros *cis* de capsanteno es similar en las mezclas del 40%. Este hecho corrobora que las reacciones que tienen lugar en ambos sustratos son las mismas pero transcurren a velocidad diferente. También pone de manifiesto que el sustrato monoinsaturado constituye un entorno menos oxidante puesto que el balance entre las reacciones de isomerización y de degradación es más compensado en la mezcla con un sustrato lipídico menos susceptible a la oxidación.

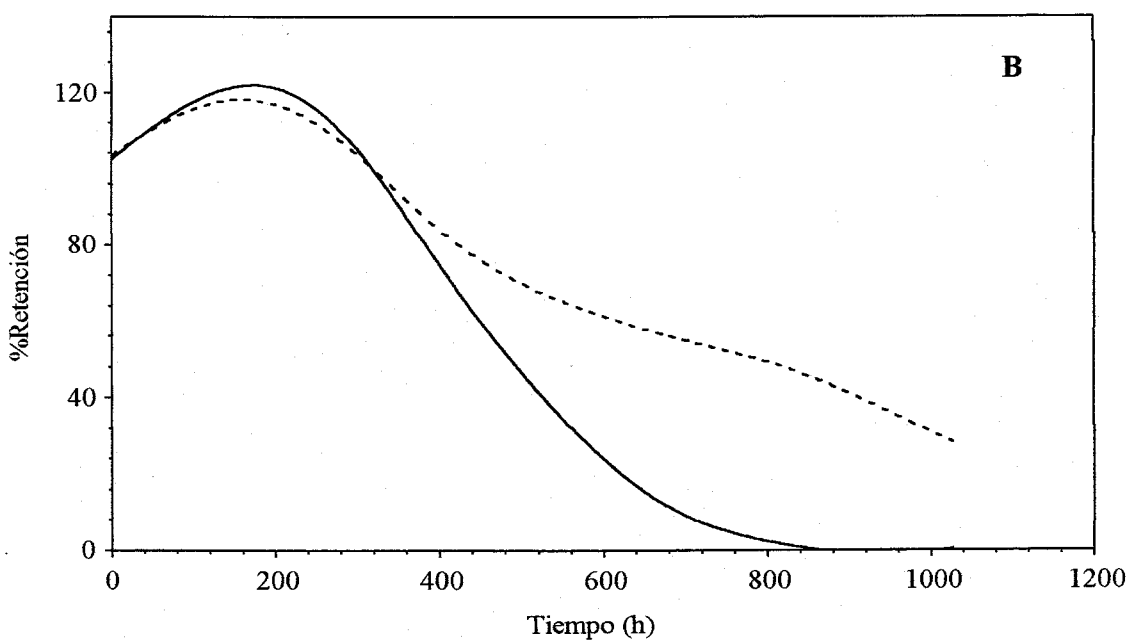
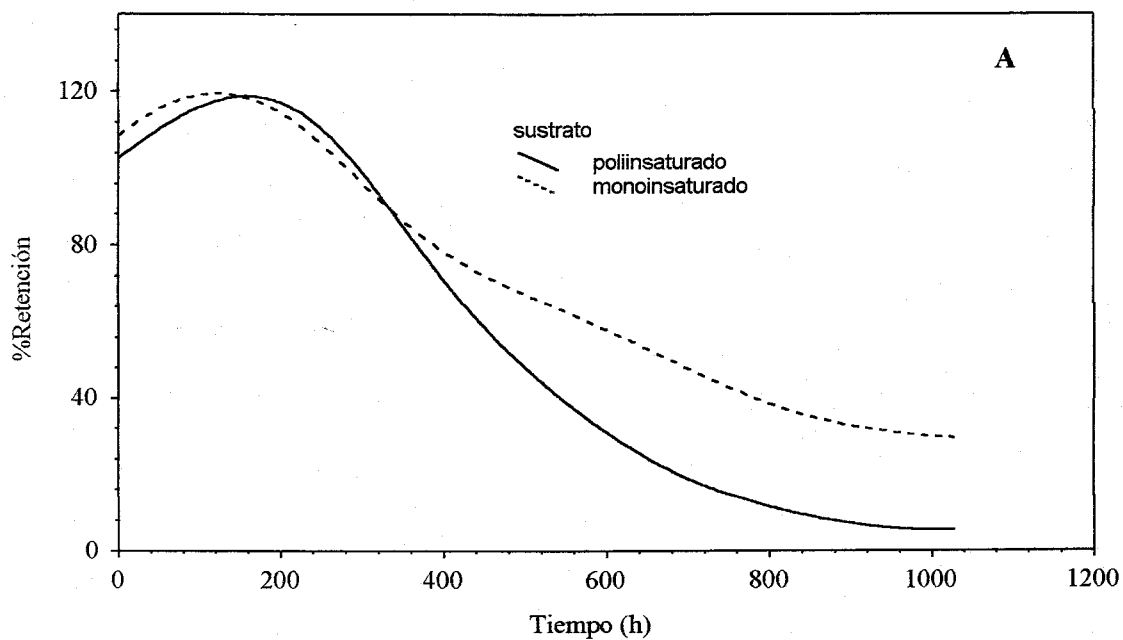


Figura 26.- Evolución del porcentaje de retención de isómeros *cis* de capsanteno en las mezclas del 20% (A) y 40% (B) con ambos tipos de sustratos. Ajuste a polinomios de orden 4.

Con porcentajes de semillas análogos, aunque se obtiene la misma dilución del color y la misma concentración de tocoferoles, la presencia real de aceite no es la misma, debido a la distinta riqueza grasa de ambos tipos de semillas, siendo del 18% en las semillas de pimiento y del 50% en el germen de girasol. Este hecho puede aumentar la efectividad de la acción antioxidante de los tocoferoles ya que aun estando en igualdad de concentración en los dos tipos de mezcla, un medio más oleoso puede facilitar su acción. No obstante, las diferencias sustanciales de comportamiento deben proceder principalmente de la clara diferencia cualitativa que ambos tipos de aceites poseen, particularmente en lo que se refiere a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Un dato a tener en cuenta en los dos tipos de mezclas ensayadas es que la grasa de la materia prima utilizada, es decir el fruto deshidratado, ya por sí misma posee un 24% de ácido linolénico, (18:3) muy proclive a la formación de radicales peroxilo. Con la adición de uno u otro tipo de semillas, de hecho se está llevando a cabo una dilución de dicho ácido en la mezcla obtenida pero, según la clase de semillas adicionadas, se mejora la proporción de ácidos grasos presentes, en el sentido de menor porcentaje de poliinsaturados con las semillas de girasol.

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado 1 de este capítulo, en la reacción de degradación de pigmentos carotenoides en las mezclas con sustrato poliinsaturado existen dos etapas de diferente comportamiento. En aquella que representa el periodo de vida útil del producto, la adición de semillas de pimiento resulta beneficiosa y, un mayor aporte de este sustrato, aun siendo rico en ácido linoleico, mejora la estabilidad de la fracción carotenoide. El estudio cinético de esta etapa concluye en valores de la constante cinética κ , para pigmentos totales, desde $24,69 \times 10^{-4}$ hasta $28,23 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ en orden creciente al disminuir el porcentaje de semillas.

En el caso de los sustratos monoinsaturados, el estudio diferenciado de datos no estaba justificado puesto que no se distinguen zonas de diferente comportamiento y la cinética degradativa obtenida sí representa a la totalidad de la experiencia. Sin embargo para establecer, en igualdad de condiciones, si un cambio en el sustrato lipídico, de uno poliinsaturado a otro monoinsaturado, mejora la estabilidad de la fracción carotenoide en la etapa que se considera como de vida útil del producto, también se realiza el estudio cinético de los datos de evolución del porcentaje de retención de pigmentos en las mezclas enriquecidas con oleico hasta un avance de reacción del 50%.

De la aplicación del método integral resulta que el modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales es el de primer orden, y en la Tabla 32 se exponen los parámetros cinéticos obtenidos para cada mezcla, incluyendo la de referencia (0%), y fracción de pigmentos. Estos valores se comparan con los mostrados en la Tabla 14 (parámetros cinéticos de las mezclas con sustrato poliinsaturado considerando hasta el 50% de avance de reacción). Para las mezclas al 20% el cambio de sustrato lipídico supone un descenso en la constante cinética κ para pigmentos totales del 16% y del 30% para las mezclas al 40%. Las diferencias en todos los casos son estadísticamente significativas. Cada fracción de pigmentos también experimenta descensos en su velocidad de oxidación, al modificar la naturaleza del sustrato lipídico e igualmente con diferencias estadísticamente significativas.

El descenso en la constante cinética κ , supone una mejora en la estabilidad, lo que implica que el periodo de vida útil se prolonga en las mezclas con sustrato lipídico monoinsaturado. La dilución al 40% es la comúnmente empleada en la industria pimentonera. La Tabla 33, muestra la evolución del porcentaje de retención de pigmentos totales para las mezclas con semillas de pimiento y girasol alto oleico al 40% junto con la de referencia (0%).

De esta forma se puede comparar en qué momento, aproximadamente, cada mezcla deja de tener utilidad comercial (porcentaje de retención inferior al 50%). En la citada tabla se puede observar como el utilizar un sustrato lipídico ya sea monoinsaturado o poliinsaturado prolonga la vida útil del pimentón, en las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de oxidación, en 72 horas para la mezcla rica en ácido linoleico y en 168 horas para la mezcla rica en ácido oleico. Además también constata el incremento en horas de vida útil, que implica utilizar una mezcla con sustrato lipídico monoinsaturado, al compararla con la correspondiente mezcla rica en linoleico (en las condiciones de almacenamiento a 343 K).

Se puede concluir que el perfil del sustrato lipídico juega un papel importante en el proceso oxidativo y en el caso concreto del pimentón, la presencia de ácido linoleico favorece dicho proceso, en comparación con otras mezclas basadas en ácido oleico como principal componente del sustrato lipídico aportado, si bien hay que matizar que según el estudio previo, la adición de sustrato poliinsaturado tiene un efecto beneficioso en la conservación del color, puesto que la vida útil del producto termina antes de que se llegue a la etapa a partir de la cual el efecto de la adición de dicho sustrato es perjudicial.

Tabla 32.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de las fracciones de pigmentos rojos, amarillos y totales en las mezclas de fruto deshidratado y sustrato monoinsaturado ensayadas, considerando los datos hasta el 50% de retención.

pigmentos	Constante cinética ($\kappa \pm \text{E.E.}$) $\times 10^{-4}$ ^a	Coefficiente de correlación
		0%
rojos	27,84 \pm 0,68	0,966
amarillos	38,42 \pm 1,21	0,973
totales	31,80 \pm 0,88	0,970
		20%
rojos	21,99 \pm 1,14	0,978
amarillos	26,42 \pm 1,08	0,986
totales	23,79 \pm 0,96	0,985
		40%
rojos	15,39 \pm 1,80	0,942
amarillos	18,95 \pm 0,95	0,968
totales	16,88 \pm 1,21	0,957

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\% \text{Ret}) = 4,605 - \kappa \times t$.
E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$).

Tabla 33.- Evolución comparativa del porcentaje de retención de pigmentos totales en mezclas con sustrato lipídico poliinsaturado (18:2), monoinsaturado (18:1) y de referencia.

tiempo (h)	0%	40% (18:2)	40% (18:1)
0	100,0 ^a	100,0	100,0
24	100,0	100,0	100,0
48	100,0	97,4	97,4
72	88,9	92,8	94,0
120	78,1	81,4	84,7
168	67,3	67,2	79,8
216	59,2	58,6	76,7
288	38,8	51,1	60,7
360	28,5	34,6	50,0
456	21,8	22,7	40,2

^a valor medio, n=4.



La tendencia generalizada para retardar el proceso degradativo es la adición de antioxidantes, como el ácido ascórbico o tocoferoles. Frente a esta tendencia, con esta experiencia se dispone de una alternativa para retardar el efecto negativo del sustrato lipídico: cambiar su naturaleza de poliinsaturada a monoinsaturada.

Un cambio en el tipo de semilla empleada en la molienda (semilla del propio fruto por semilla de girasol alto oleico) no tiene por qué ser la única solución, incluso puede plantear problemas de tipo económico en la fabricación del pimentón, pues la semilla de girasol alto oleico habría que comprarla y generaría un subproducto que sería la semilla del pimiento. Lo más adecuado es desarrollar nuevas variedades de pimiento cuyo perfil lipídico sea distinto al actual, tratando de obtener frutos con menor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo reprimiendo los enzimas desaturasas que producen dichos ácidos grasos (Harwood, 1996). Esta línea de trabajo iría en paralelo con el movimiento actual hacia grasas y aceites mejorados genéticamente, que ofrecen ventajas en diversos aspectos como su estabilidad, salubridad y flexibilidad funcional (Katz, 1997).

III. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN CAROTENOIDE.

Las características del procesado para la obtención del pimentón, que en determinadas zonas sigue unas pautas artesanales, no promueven la inclusión de cambios en las dos operaciones básicas de las que consta: secado y molienda (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1996). Sin embargo para la obtención de la oleoresina de pimentón, sí se requiere de una mayor complejidad en las operaciones del procesado así como el empleo de condiciones físicas de presión y temperatura más drásticas, sobre todo en las etapas de extracción con disolvente y posterior eliminación del mismo. Estas condiciones pueden alterar la composición inicial de la materia prima, sobre todo en cuanto a su capacidad colorante.

Pero no sólo se ha de tener en cuenta la influencia de las condiciones durante el proceso de obtención de ambos concentrados de pigmentos, sobre la concentración carotenoide, sino también, la posible incidencia en dicha concentración de las condiciones empleadas en los procesos industriales que utilizan al pimentón y su oleoresina para aportar color o corregirlo.

Para los dos concentrados, el criterio de calidad es sinónimo de color, que además lleva implícito el valor comercial del producto (Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998). Los estudios de oxidación de carotenoides del pimiento, ponen de manifiesto que, debido a la composición heterogénea en pigmentos del extracto que se obtiene del fruto, la velocidad de su degradación no es homogénea y, además de las características estructurales, depende de la naturaleza del sustrato lipídico en el que se desarrollan las reacciones de oxidación. Se ha establecido un patrón de comportamiento frente a los procesos oxidativos, por el que los pigmentos agrupados dentro de la fracción isocrómica roja, son más estables que aquellos agrupados dentro de la fracción isocrómica amarilla.

En este sentido, cabe preguntarse si unas condiciones más enérgicas de temperatura tienen influencia en el patrón degradativo, marcando mayores diferencias entre la estabilidad de una fracción y otra. Por ello se plantea un estudio de oxidación de carotenoides a distintas temperaturas, pero usando como concentrado de pigmentos para las experiencias a oleoresinas de pimentón.

Una vez determinada la cinética de oxidación de carotenoides hay que comprobar si se mantiene el mismo patrón de degradación a las temperaturas empleadas. El estudio

termodinámico de la reacción de oxidación permitirá deducir si existe o no una zona de temperaturas en la que se marquen mayores diferencias en la estabilidad de una y otra fracción.

1.- Estudio cinético.

Para realizar el estudio cinético de los datos se utiliza la misma reacción que en los estudios cinéticos de oxidación carotenoide en distintos sustratos lipídicos, incluyendo a reacciones de oxidación térmica, isomerización y reacciones de oxidación por radicales peroxilo (R-1). De esta forma se puede llevar a cabo un estudio cinético asequible, que permita realizar comparaciones de la velocidad de degradación para cada fracción de pigmentos, a cada temperatura y en cada oleorresina.



De la aplicación del método integral se obtiene que el modelo cinético que mejor se ajusta a los datos experimentales es el de primer orden. En la Tabla 34 se exponen los valores de las constantes de degradación para pigmentos totales, a cada temperatura y para cada oleorresina. El análisis comparativo en función de la temperatura, entre las constantes cinéticas de cada oleorresina, indica diferencias significativas (excepto entre las oleorresinas 1 y 6 a 373 K, 1 y 4 a 383 K y, 4 y 6 a 393 K). Salvo estas similitudes puntuales, el hecho de que cada oleorresina muestre una velocidad de degradación diferente, indica que cada una de ellas se puede considerar como un medio de reacción distinto en el que el resto de componentes modulan la oxidación de pigmentos carotenoides.

Este hecho, al igual que los estudios de estabilidad de carotenoides en pimentón, demuestra que las condiciones de procesado bajo las cuales se obtiene cada oleorresina, considerando desde la deshidratación de los frutos hasta la eliminación del disolvente, marcan y condicionan la estabilidad del producto final obtenido, determinada en este caso, por la mayor o menor velocidad de degradación carotenoide.

El orden de estabilidad para las oleorresinas estudiadas, según los valores que adquiere la constante cinética de degradación de pigmentos totales, permite establecer que tanto las características de los frutos como las condiciones de procesado fueron las más adecuadas en las oleorresinas 1, 4 y 6 (que son las que muestran velocidades degradativas más bajas e idénticas en algunos casos) mientras que las características del fruto y/o las condiciones de procesado en la

oleorresina 5 no fueron las más favorables. Las oleorresinas 2 y 3 se sitúan en una escala degradativa intermedia.

El aumento de temperatura también marca, para cada oleorresina, un aumento significativo de velocidad en todos los casos. Los incrementos de temperatura seleccionados son por tanto suficientes para obtener cinéticas degradativas significativamente diferentes en todas las oleorresinas.

En las Tablas 35 y 36 se exponen los valores de la constante cinética κ para las fracciones de pigmentos rojos y amarillos respectivamente. La velocidad de degradación de pigmentos rojos es distinta, excepto en las oleorresinas 1 y 4, 4 y 6, a la temperatura de 373 K. La fracción amarilla también se degrada a velocidades significativamente diferentes en todas las oleorresinas y para cada temperatura (excepto las oleorresinas 1 y 4 a la temperatura de 393 K). Para ambas fracciones, la temperatura también marca un aumento significativo de la velocidad de degradación.

Comparando las constantes de degradación de las fracciones de pigmentos rojos y amarillos se observa, en todas las oleorresinas y a todas las temperaturas, aumentos significativos de la velocidad de degradación de los carotenoides rojos frente a los amarillos. Las diferencias en el valor de κ aumentan proporcionalmente con la temperatura de degradación. De esta forma, la oleorresina 4 que es la que muestra, a 373 K, mayor similitud de degradación en ambas fracciones, a 393 K presenta un aumento, respecto a la fracción amarilla, del 64% en el valor de κ para pigmentos rojos.

El medio lipídico que disuelve a la fracción carotenoide, mayoritariamente poliinsaturado, junto con la temperatura empleada en cada experiencia, provoca reacciones oxidativas, dando lugar a la pérdida en la composición carotenoide. Sin embargo estas reacciones afectan de forma diferente a una y otra fracción, no en cuanto a la formalidad de la reacción, que se ajusta a un modelo cinético de primer orden en todos los casos, sino a la velocidad de la misma. La degradación tiene una especial incidencia sobre los pigmentos rojos, que son los que cuentan con grupos ceto en su estructura, mientras que el resto de pigmentos, que conforman la fracción amarilla en la que mayoritariamente están presentes xantofilas hidroxiladas y β -caroteno, siguen una degradación más lenta.

Tabla 34.- Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de pigmentos totales, según modelo de primer orden para las seis oleorresinas y a las tres temperaturas empleadas.

pigmentos totales	$\kappa \pm \text{E.E.}^a$	Coeficiente de correlación
373 K		
Oleorresina 1	11,38 \pm 0,47 *	0,970
Oleorresina 2	20,84 \pm 0,57	0,986
Oleorresina 3	19,62 \pm 0,57	0,986
Oleorresina 4	12,52 \pm 0,47	0,976
Oleorresina 5	34,79 \pm 3,92	0,947
Oleorresina 6	11,18 \pm 0,52 *	0,962
383 K		
Oleorresina 1	18,66 \pm 0,67 *	0,973
Oleorresina 2	35,43 \pm 1,00	0,983
Oleorresina 3	30,35 \pm 1,12	0,972
Oleorresina 4	18,55 \pm 1,01 *	0,942
Oleorresina 5	52,83 \pm 3,17	0,958
Oleorresina 6	18,03 \pm 0,90	0,954
393 K		
Oleorresina 1	38,13 \pm 2,10	0,956
Oleorresina 2	65,26 \pm 2,18	0,983
Oleorresina 3	57,45 \pm 2,38	0,975
Oleorresina 4	36,78 \pm 2,12 *	0,952
Oleorresina 5	80,19 \pm 4,24	0,961
Oleorresina 6	35,87 \pm 1,95 *	0,957

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\%Ret) = 4,605 - \kappa \times t$. E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$), excepto en los indicados (*).

Tabla 35.- Parámetros cinéticos de la degradación de la fracción de pigmentos rojos, según modelo de primer orden para las seis oleorresinas y a las tres temperaturas empleadas.

pigmentos rojos	$k \pm E.E.$ ^a	Coefficiente de correlación
373 K		
Oleorresina 1	12,59 \pm 0,56 *	0,965
Oleorresina 2	22,75 \pm 0,68	0,984
Oleorresina 3	20,87 \pm 0,62	0,986
Oleorresina 4	12,82 \pm 0,44 * ^o	0,979
Oleorresina 5	41,33 \pm 4,06	0,942
Oleorresina 6	12,92 \pm 0,57 ^o	0,966
383 K		
Oleorresina 1	22,86 \pm 0,72	0,980
Oleorresina 2	42,47 \pm 1,21	0,983
Oleorresina 3	33,51 \pm 1,18	0,974
Oleorresina 4	21,34 \pm 1,10	0,948
Oleorresina 5	62,74 \pm 3,08	0,968
Oleorresina 6	22,14 \pm 0,99	0,962
393 K		
Oleorresina 1	51,68 \pm 2,11	0,976
Oleorresina 2	85,38 \pm 2,83	0,983
Oleorresina 3	70,87 \pm 2,74	0,978
Oleorresina 4	45,29 \pm 2,22	0,965
Oleorresina 5	95,23 \pm 4,33	0,975
Oleorresina 6	47,91 \pm 2,00	0,974

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\%Ret) = 4,605 - k \times t$. E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$), excepto en los indicados (* y ^o).

Tabla 36.- Parámetros cinéticos de la degradación de la fracción de pigmentos amarillos, según modelo de primer orden para las seis oleorresinas y a las tres temperaturas empleadas.

<u>pigmentos amarillos</u>	<u>$\kappa \pm \text{E.E.}^a$</u>	<u>Coefficiente de correlación</u>
373 K		
Oleorresina 1	9,99 \pm 0,42	0,969
Oleorresina 2	18,73 \pm 0,67	0,977
Oleorresina 3	17,79 \pm 0,59	0,982
Oleorresina 4	11,93 \pm 0,55	0,964
Oleorresina 5	24,90 \pm 4,71	0,931
Oleorresina 6	9,20 \pm 0,49	0,952
383 K		
Oleorresina 1	14,23 \pm 0,69	0,954
Oleorresina 2	28,60 \pm 0,89	0,980
Oleorresina 3	26,00 \pm 1,11	0,963
Oleorresina 4	14,71 \pm 0,93	0,923
Oleorresina 5	36,46 \pm 3,42	0,933
Oleorresina 6	13,35 \pm 0,85	0,928
393 K		
Oleorresina 1	27,52 \pm 2,04 *	0,924
Oleorresina 2	51,45 \pm 2,11	0,975
Oleorresina 3	44,69 \pm 2,35	0,960
Oleorresina 4	27,56 \pm 1,95 *	0,931
Oleorresina 5	48,17 \pm 4,06	0,922
Oleorresina 6	25,38 \pm 1,79	0,931

^a Reacción de orden 1, modelo cinético: $\ln(\%Ret)=4,605-\kappa \times t$. E.E., error estándar. Diferencias significativas en todos los casos, ($p < 0,05$) excepto en los indicados (*).

Los valores de la constante cinética junto con el aumento significativo en la velocidad de degradación de la fracción de pigmentos rojos frente a los pigmentos amarillos, en todas las oleorresinas y a cada temperatura, indican que existe una selectividad de la reacción de oxidación hacia los cetocarotenoides.

Esta apreciación puede parecer contradictoria con los estudios de oxidación de pigmentos carotenoides por los que se concluye que los cetocarotenoides, son más estables a los procesos oxidativos, mientras que otros pigmentos, como β -caroteno y zeaxanteno y, en general, aquellos que componen la fracción amarilla, tienden a degradarse a mayor velocidad. Esta distinción se fundamenta en las características estructurales de cada pigmento, que tienen una clara influencia en la oxidación, posibilitando que uno o más mecanismos degradativos tengan lugar. Las características del sustrato lipídico, modulan la velocidad de degradación acelerando los procesos oxidativos cuando el sustrato es poliinsaturado.

El planteamiento inicial de esta experiencia era destacar la estabilidad de los cetocarotenoides a temperaturas de oxidación más altas. Sin embargo los resultados indican todo lo contrario. Por tanto, es necesario añadir a las conclusiones anteriores que, el patrón de estabilidad de pigmentos carotenoides en procesos oxidativos también depende de las condiciones de temperatura en las que se lleve a cabo la reacción.

Se podría plantear si este nuevo patrón de estabilidad (fracción roja menos estable que la fracción amarilla) se establece sólo en las oleorresinas de pimentón. Esta hipótesis no se puede fundamentar en que existan distintos mecanismos de reacción de oxidación de pigmentos, que son los mismos independientemente del medio en el que se encuentren y de las condiciones. En este caso lo que se observa es una modificación de la velocidad a la que tienen lugar. Esta apreciación da cabida a la existencia de un rango de temperaturas (distinto al empleado en estas experiencias) en el que la velocidad a la que transcurren los procesos degradativos origine el patrón de estabilidad establecido inicialmente en los estudios de oxidación carotenoides en distintos sustratos lipídicos (fracción roja más estable que la fracción amarilla). Para deducir el margen de temperaturas en el que prevalece cada patrón de estabilidad es necesario realizar un estudio termodinámico de los datos obtenidos.

2.- Estudio termodinámico.

En las Figuras 27 y 28 se representa en escala semilogarítmica, los valores de κ para las fracciones roja y amarilla frente a T^{-1} en un rango de temperaturas de 298 K a 400 K, para las seis oleorresinas estudiadas. Las líneas representan el ajuste a los datos experimentales de la ecuación E-6 (modelo de Arrhenius). En cada oleorresina, se pueden observar 3 zonas diferenciadas. La zona 1 en la que los valores de la constante cinética κ para la fracción roja son superiores a los de la fracción amarilla. En la zona 2 sucede lo contrario y, por tanto, se corresponde con un patrón de estabilidad en el que los cetocarotenoides son más estables que el resto de xantofilas y carotenos amarillos.

La distinción entre ambas zonas surge a partir de un punto común, en el que la constante cinética κ toma un valor único para las dos fracciones de pigmentos. Este punto, distinto para cada oleorresina, se corresponde con una temperatura que oscila entre 368 K para la oleorresina 4 y 326 K para la oleorresina 5. En ambas figuras, para cada oleorresina se incluye la temperatura a la que los valores de κ de ambas fracciones coinciden. El hecho de que cada oleorresina muestre un punto de intersección distinto, es muestra de que cada una de ellas constituye un medio de reacción diferente, cuyos componentes modulan la velocidad de las reacciones de oxidación de pigmentos, que transcurren bajo los mismos mecanismos en todos los casos.

Por tanto, en función de la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de oxidación, se manifiesta uno u otro patrón de estabilidad. A temperaturas inferiores a la del punto de intersección, los pigmentos rojos son más estables, mientras que por encima de dicho punto los pigmentos amarillos se degradan a menor velocidad.

El punto de cruce de las líneas de Arrhenius se denomina punto isocinético y, matemáticamente, conduce a una relación lineal entre la energía de activación y el factor preexponencial (Labuza, 1980; Linnert, 1994). Diversos estudios termodinámicos (Searle y Williams, 1993; Gupta y Viswanath, 1996; Galwey y Brown, 1997) emplean la determinación de la relación isocinética para diferenciar grupos de reacciones aparentemente similares, pero que agrupadas en torno a un parámetro, que puede tener significado físico o químico, transcurren bajo diferentes mecanismos de reacción o bien que un determinado paso de la reacción tiene especial relevancia.

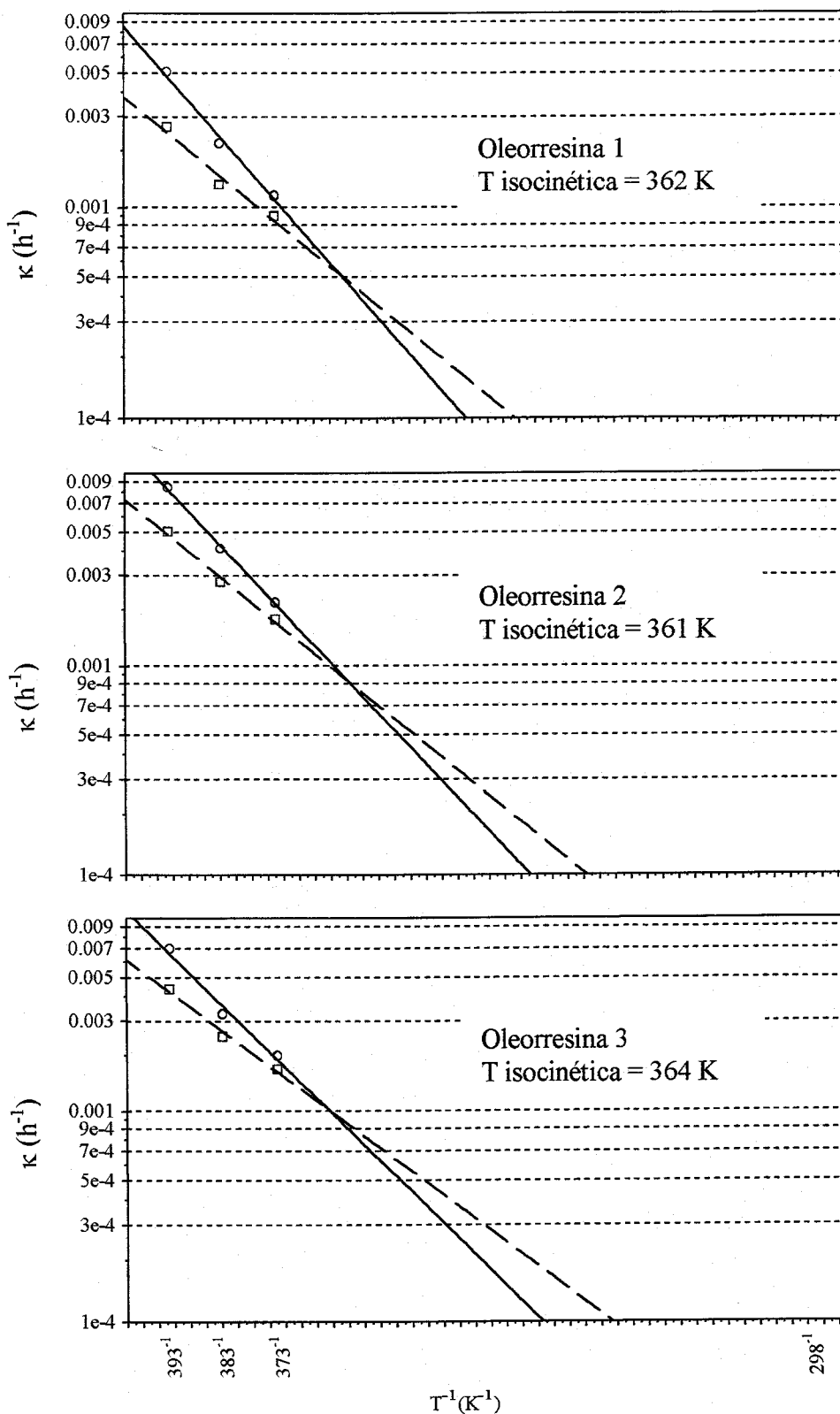


Figura 27.- Representación en escala semilogarítmica de los valores de la constante cinética κ para las fracciones de pigmentos rojos (○) y amarillos (□) (oleorresinas 1, 2 y 3) y su ajuste a un modelo lineal a partir de la ecuación de Arrhenius.

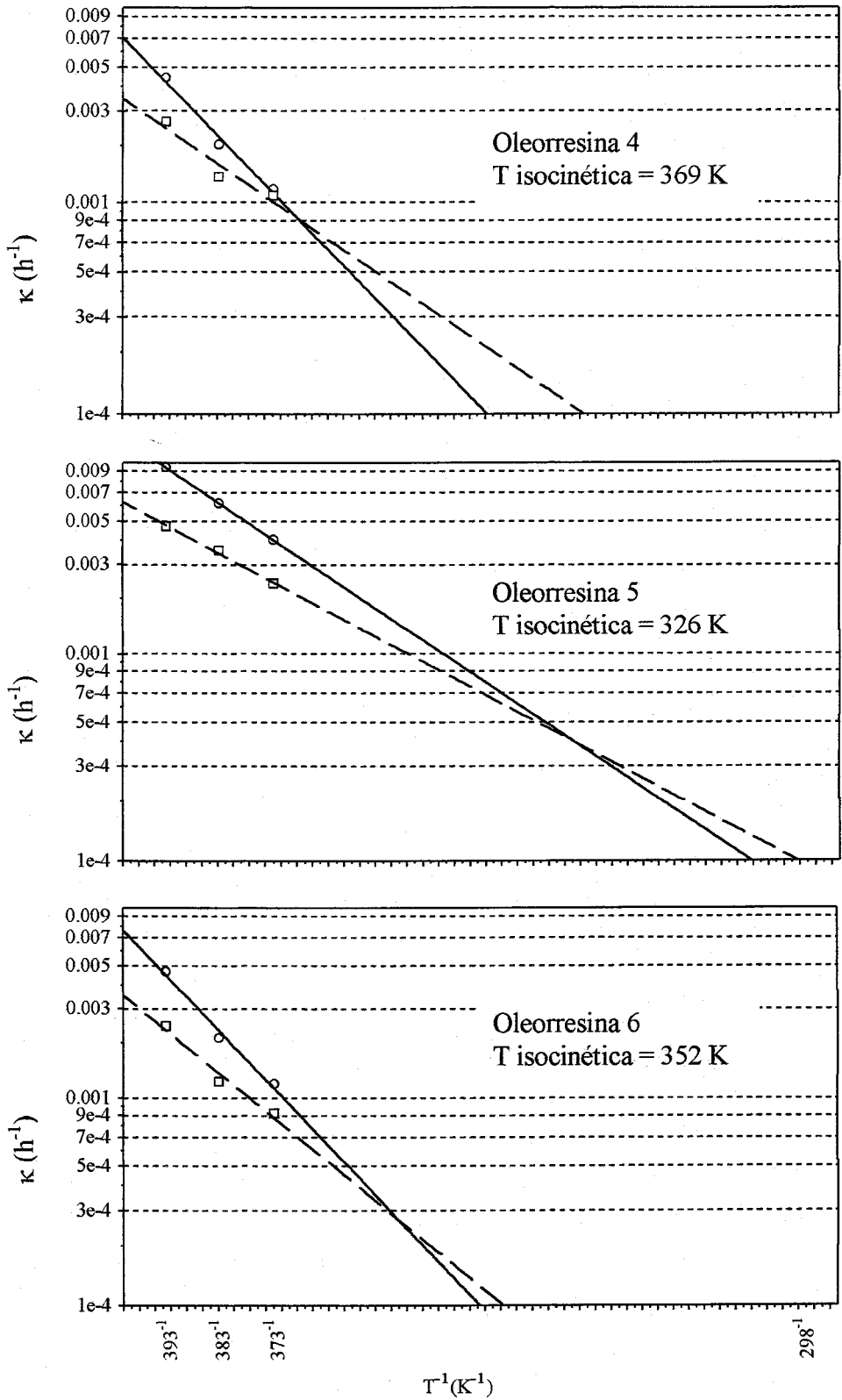


Figura 28.- Representación en escala semilogarítmica de los valores de la constante cinética κ para las fracciones de pigmentos rojos (○) y amarillos (□) (oleorresinas 4, 5 y 6) y su ajuste a un modelo lineal a partir de la ecuación de Arrhenius.



En el primer caso (debido a un cambio en el mecanismo de reacción e incluso a variaciones en la estructura del complejo activado) se producirían modificaciones en los valores de la energía de activación, (Boots y Bokx, 1989; Bokx y Boots, 1990).

En el segundo caso (mayor importancia de alguna etapa concreta del mecanismo) no se producirían modificaciones en los parámetros termodinámicos, sino que se observaría una selectividad de la reacción hacia alguno de los reactivos, diferenciado del resto por el parámetro en torno al cual se agrupan. Por tanto el estudio de la relación isocinética puede ser una excelente herramienta de trabajo para determinar si se producen cambios en el mecanismo de reacción bajo diferentes condiciones experimentales.

En función del mecanismo de reacción de pigmentos carotenoides, es previsible que sea ésta la situación en la que se enmarcan los resultados puesto que ambas fracciones de pigmentos, utilizando como parámetro (con significado químico) para su distinción a la presencia o ausencia de grupos ceto, mantienen una estructura común (la cadena polienoica), que interviene en las reacciones de oxidación bajo los mismos mecanismos. No es por tanto previsible la modificación del mecanismo, sino una mayor importancia de alguna etapa concreta del mismo en la oxidación de la fracción de pigmentos rojos.

En la Tabla 37 se presentan los parámetros termodinámicos, energía de activación y factor preexponencial, obtenidos según la ecuación E-7, para las fracciones de pigmentos rojos y amarillos. Con los resultados presentados en la Tabla 37, según la teoría del complejo activado, el requerimiento energético (valor de E_a) para que un pigmento cetocarotenoide alcance la estructura de complejo activado es superior al de carotenos y xantofilas amarillas.

El diferente valor en la barrera energética para alcanzar la estructura de complejo activado, es la causa de que a bajas temperaturas la mayor estabilidad la presenten los cetocarotenoides. Sin embargo, una vez que la energía suministrada al sistema de reacción, en este caso un medio oleoso en el que ambas fracciones de pigmentos se encuentran inmersas, es lo suficientemente elevada para que ambas fracciones alcancen la estructura de complejo activado, es el otro parámetro de la ecuación de Arrhenius, el factor preexponencial, el que determina el grado de avance de la reacción, resultando que para la fracción roja, el número de moléculas capaces de formar el complejo activado, es mayor que para la fracción amarilla.

Tabla 37.- Parámetros termodinámicos, de la reacción de oxidación de las fracciones de pigmentos rojos y amarillos de las seis oleorresinas estudiadas.

	$E_a \pm E.E. (kJ/mol)^a$	$\ln A \pm E.E. (s^{-1})^a$
pigmentos rojos		
Oleorresina 1	$85,92 \pm 9,00$	$21,00 \pm 2,83$
Oleorresina 2	$80,54 \pm 3,82$	$19,87 \pm 1,20$
Oleorresina 3	$74,34 \pm 10,8$	$17,75 \pm 3,40$
Oleorresina 4	$76,76 \pm 9,70$	$18,05 \pm 3,05$
Oleorresina 5	$50,86 \pm 0,76$	$10,91 \pm 0,25$
Oleorresina 6	$79,72 \pm 9,40$	$19,01 \pm 2,96$
pigmentos amarillos		
Oleorresina 1	$61,57 \pm 11,7$	$12,89 \pm 3,67$
Oleorresina 2	$61,48 \pm 6,69$	$13,51 \pm 2,10$
Oleorresina 3	$56,03 \pm 6,54$	$11,71 \pm 2,06$
Oleorresina 4	$50,78 \pm 15,5$	$9,58 \pm 4,98$
Oleorresina 5	$40,25 \pm 3,02$	$7,00 \pm 0,95$
Oleorresina 6	$61,68 \pm 10,4$	$12,85 \pm 3,28$

^a Energía de activación y factor preexponencial obtenidos a partir de la ecuación de Arrhenius (E-7). E.E., error estándar en la determinación ($p < 0,05$).

Por tanto, para las condiciones de reacción establecidas, se muestra una incidencia de la degradación sobre los pigmentos rojos. Si las condiciones de degradación fuesen menos agresivas (temperaturas inferiores) la incidencia de la oxidación sobre los cetocarotenoides tendría lugar, pero en menor extensión. A temperaturas por debajo del punto isocinético la incidencia sería mayor sobre la fracción amarilla y, ésta es la situación en la que se enmarcan los resultados obtenidos en los estudios de oxidación carotenoide en distintos sustratos lipídicos.

Por otro lado resulta interesante el hecho de que la temperatura isocinética, que para las seis oleorresinas estudiadas tendría un valor medio de 356 K, esté por debajo del rango de temperaturas experimentales (373 K-393 K). Este hecho implica que el cambio en el valor de la entalpía de reacción, al aumentar la temperatura del proceso degradativo, compensa al cambio en el valor de la entropía en mayor extensión, lo que conduce a que la selectividad de la reacción se incremente al aumentar la temperatura. En este caso el proceso termodegradativo incide más concretamente sobre los cetocarotenoides a altas temperaturas y, a mayor temperatura las reacciones degradativas tienen mayor incidencia aún. De igual forma, a temperaturas inferiores del punto isocinético, a menor temperatura del proceso oxidativo, mayor incidencia tendrá la degradación sobre la pigmentación amarilla.

La existencia de un punto isocinético se traduce en que es posible modular el efecto de un determinado proceso sobre un grupo de sustancias afines presentes en el mismo medio de reacción, pues en función de las condiciones empleadas, en este caso la temperatura, la incidencia del proceso será distinta.

Estos resultados hacen cambiar la idea estática de estabilidad de cada fracción carotenoide, transformándola en un concepto dinámico. La estructura de cada pigmento posibilita o impide que determinados mecanismos oxidativos tengan lugar, pero no es absolutamente determinante, puesto que el sustrato lipídico y las condiciones de temperatura en las que se lleva a cabo la reacción modulan la velocidad a la que dichas reacciones ocurren. Y lo pueden hacer a tal nivel que el patrón de estabilidad establecido en unas condiciones se modifique.

- 1.- Las características estructurales de capsanteno y capsorrubeno, carotenoides con uno o dos grupos ceto situados en la cadena polienoica y ausencia de hidrógenos alílicos por la presencia de anillos tipo κ , proporcionan a estos compuestos una capacidad antioxidante superior a la que muestra β -caroteno.
- 2.- La mejor capacidad antioxidante de capsorrubeno frente a capsanteno se asocia a la simetría de su estructura, localización de los grupos ceto y anillos tipo κ , que potencia dicha propiedad y los efectos beneficiosos que de ella se deriven.
- 3.- La capacidad antioxidante de las xantofilas se modifica en función del grado de insaturación del ácido graso que la esterifique. La presencia de insaturaciones merma dicha capacidad mientras que la esterificación con ácidos grasos saturados no la modifica.
- 4.- La adición de un entorno lipídico, protege de la oxidación a los pigmentos carotenoides, siendo este efecto más o menos acusado en función del grado de insaturación de dicho entorno. Un sustrato lipídico monoinsaturado constituye, frente al poliinsaturado, un entorno menos oxidante, que favorece la estabilidad de los pigmentos carotenoides.
- 5.- La termodegradación de carotenoides transcurre diferenciando aquellos pigmentos que presenten o no grupos ceto en su estructura, fracción roja y fracción amarilla, propiciando una degradación preferente de una u otra fracción en función de la temperatura. La existencia de un punto isocinético permite establecer el rango de temperaturas en el que prevalece cada patrón de estabilidad.
- 6.- Consecuentemente, en la fabricación del pimentón y su oleorresina, para mejorar la estabilidad de la fracción carotenoide se propone controlar la temperatura del proceso ya que se puede, en función de ésta, modificar la relación inicial entre pigmentos cetónicos y no cetónicos de la materia prima, y disminuir el grado de insaturación del sustrato lipídico en el que se encuentra inmersa dicha fracción.

- Almela, L.; López-Roca, J.; Candela, M. y Alcázar, M. "Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika". *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1606-1609.
- Ames, B. N. "Dietary carcinogens and anticarcinogens". *Science.* **1983**, *221*, 1256-1264.
- ASTA. Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association, 2nd ed.; **1986**.
- Bach, T. J. "Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants, a review". *Lipids.* **1995**, *30*, 191-202.
- Biacs, P. A.; Czinkotai, B. y Hoschke, A. "Factors affecting stability of colored substances in paprika powders". *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 363-367.
- Biacs, P. A.; Daood, H. G.; Pavisá, A. y Hadja, F. "Studies on the carotenoid pigments on paprika (*Capsicum annum*, L. var. Sz-20)". *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 350-353.
- Bokx, P. K. y Boots, H. M. J. "The compensating-mixture model for multicomponent systems and its application to ion exchange". *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 6489-6495.
- Boots, H. M. J. y Bokx, P. K. "Theory of enthalpy-entropy compensation". *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 8240-8243.
- Bouvier, F.; Hugueney, P.; d'Harlingue, A.; Kuntz, M. y Camara, B. "Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoids into ketocarotenoids". *Plant J.* **1994**, *6*, 45-54.
- Britton, G. "Carotenoid biosynthesis, an overview". En "*Carotenoids: Chemistry and Biology*". Ed. Krinsky, N. I.; Mathews-Roth, M. y Taylor, R. F. 167-184. Plenum, New York, **1990**.
- Britton, G. "Structure and properties of carotenoids in relation to function". *FASEB J.* **1995**, *9*, 1551-1558.
- Burton, G. W. e Ingold, K. U. "β-carotene: an unusual type of lipid antioxidant". *Science.* **1984**, *224*, 569-573.
- Camara, B. y Brangeon, J. "Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annum* fruit". *Planta*, **1981**, *151*, 359-364.
- Camara, B. y Monéger, R. "Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annum*". *Phytochem.* **1978**, *17*, 91-93.
- Carnevale, J.; Cole, E. y Crank, G. "Photocatalyzed oxidation of paprika pigments". *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 953-956.
- Cofield, E. P. "Solvent extraction of oilseed". *Chem. Eng.* **1951**, *58*, 127-140.
- Costa, J. "Pimiento pimentonero. Selección y mejora". *H. Técnica* 27; Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, **1979**.

- Cunningham, F. X. y Gantt, E. "Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 557-583.
- Curl, A. L. "The carotenoids of red bell pepper". *J. Agric. Food Chem.* **1962**, *10*, 504-508.
- Curl, A. L. "The carotenoids of green bell pepper". *J. Agric. Food Chem.* **1964**, *12*, 522-524.
- Daood, H. G. y Biacs, P. A. "Evidence for the presence of lipoxygenase and hydroperoxydecomposing enzyme in red pepper seeds". *Acta Alimentaria.* **1986**, *15*, 307-318.
- Daood, H. G.; Vinkler, M.; Márkus, f.; Hebshi, E. A. y Biacs, P. A. "Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors". *Food Chem.* **1996**, *55*, 365-372.
- Davies, B. H. "Carotenoids". En "*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*". Ed. Goodwin, T. W. Academic Press, London, 2ª edición, vol. 2, 149-155, **1976**.
- Davies, A. G.; Griller, D.; Ingold, K. U.; Lindsay, D. A. y Walton, J. C. "An electron spin resonance study of pentadienyl and related radicals: homolytic fission of cyclobut-2-enylmethyl radicals". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* **1981**, 633-641.
- 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.* **1992**, *40*, 2072-2076.
- Edge, R.; Land, E. J.; McGarvey, D.; Mulroy, L. y Truscott, T. G. "Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation". *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4087-4090.
- Escudero, A.; Montilla, J. C.; García, J. M.; Sanchez-Quevedo, M. C.; Periago, J. L.; Hortelano, P. y Suarez, M. D. "Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes". *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, *1394*, 65-73.
- Everett, S. A.; Dennis, F.; Patel, K. B.; Maddix, S.; Kundu, S. C. y Willson, R. L. "Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene". *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3988-3994.
- Fiksdahl, A.; Bjornland, T.; Liaaen-Jensen, S. "Algal carotenoids with novel end groups". *Phytochemistry.* **1984**, *23*, 649-655.
- Fogler, H. S. En "*Elements of chemical reaction engineering*". Ed. Amundson, N. R. Prentice Hall, New Jersey, 2ª edición, 200-205, **1992**.
- Foote, C. S. y Denny, R. W. "Chemistry of Singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene". *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6233-6235.
- Frankel, E. N. "Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids". *Prog. Lip. Res.* **1985**, *23*, 197-221.

- Fuente, T.; Serna, A. y Navarro, F. "Estudio de α -tocoferol en pimentón. II. Influencia del contenido de α -tocoferol en la estabilidad del color". *Anales de Química*. **1977**, *73*, 159-162.
- Galwey, A. K. y Brown, M. E. "Arrhenius parameters and compensation behaviour in solid-state decompositions". *Thermochim. Acta*. **1997**, *300*, 107-115.
- Goodwin, T. W. "Distribution of carotenoids". En "*Carotenoids*" Ed. Packer L. Methods in Enzymology, vol. 213, 167-172. Academic Press, San Diego, **1992**.
- Goodwin, T. W. y Britton, G. En "*Plant pigments*". Ed. Goodwin, T. W. 61-132. Academic Press, San Diego, **1988**.
- Govindarajan, V. S. "Capsicum – production, technology, chemistry, and quality – Part II. Processed products, standards, world production and trade". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1986**, *23*, 207-288.
- Grant, J. L.; Kramer, V. J.; Ding, R. y Kispert, L. D. "Carotenoid cation radicals: electrochemical, optical, and EPR Study". *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2151-2157.
- Gross, J. En "*Pigments in Fruits*". Ed. Schweigert, B. S. 126-162. Academic Press, Londres, **1987**.
- Gross, J. En "*Pigments in Vegetables*". Ed. Van Nostrand Reinhold. Van Nostrand Reinhold, New York, 134, **1991**.
- Gupta, M. C. y Viswanath, S. G. "Kinetic compensation effect in the thermal degradation of polymers". *J. Thermal Anal.* **1996**, *47*, 1081-1091.
- Halliwell, B. En "*Free Radicals in Biology and Medicine*". Ed. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. Clarendon Press, 139-154, **1989**.
- Handelman, G. J.; Dratz, E. A.; Collin, R. C.; Van Kuijk, F. J. "Carotenoids in the human macula and whole retina". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1988**, *29*, 850-855.
- Handelman, G. J.; Van Kuijk, F. J. G. M.; Chatterjee, A. y Krinsky, N. I. "Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene". *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 427-437.
- Harwood, J. L. "Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids". *Biochim. Biophys. Acta*. **1996**, *1301*, 7-56.
- Hayakawa, F.; Kimura, T.; Maeda, T.; Fujita, M.; Sohmiya, H.; Fujii, M. y Ando, T. "DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion". *Biochim. Biophys. Acta*. **1997**, *1336*, 123-131.
- Hill, C. G. y Grieger-Block, R. A. "Kinetic data: generation interpretation, and use". *Food Tech.* **1980**, *Feb*, 56-66.

Jarén-Galán, M.; Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M. I. "Prediction of decoloration in paprika oleoresins. Application to studies of stability in thermodynamically compensated systems". *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 945-951.

Jovanovic, S. V.; Jankovic, I. y Josimovic, L. "Electron-transfer reactions of alkylperoxy radicals". *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9018-9021.

Kamal-Eldin, A. y Appelqvist, L. "The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols". *Lipids.* **1996**, *31*, 671-701.

Katz, F. "The move towards genetically improved oils". *Food Technol.* **1997**, *51*, 66.

Kennedy, T. A. y Liebler, D. C. "Peroxy radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides". *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 290-295.

Krinsky, N. I. "Function". En "*Carotenoids*". Ed. Isler, O. 671-679. Birkhäuser Verlag, Basel, **1971**.

Krinsky, N. I. "Membrane antioxidants". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *551*, 17-33.

Krinsky, N. I.; Cornwell, D. G. y Oncley, J. L. "The transport of Vitamin A and carotenoids in human plasma". *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *73*, 233-246.

Labuza, T. P. "Enthalpy/entropy compensation in food reactions". *Food Tech.* **1980**, *Feb*, 67-77.

Lease, J. G. y Lease, E. J. "Factors affecting the retention of red color in peppers". *Food Technol.* **1956**, *10*, 368-373.

Levy, A.; Harel, D.; Palevitch, B.; Akiri, B.; Menagem, E. y Kanner, J. "Carotenoid pigments and β -carotene in paprika fruits (*Capsicum annuum* spp.) with different genotypes". *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 362-366.

Liebler, D. C. "Antioxidant reactions of carotenoids". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *669*, 20-31.

Lim, B. P.; Nagao, A.; Terao, J.; Tanaka, K.; Suzuki, T. y Takama, K. "Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation". *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1126*, 178-184.

Linert, W. "Mechanistic and structural investigations based on the isokinetic relationship". *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 429-438.

Lotan, T. y Hirschberg, J. "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the keto-carotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*". *FEBS, Lett.* **1995**, *364*, 125-128.

Louheranta, A. M.; Porkkala-Sarataho, E. K.; Nyyssonen, M. K.; Salonen, R. M. y Salonen, J. T. "Linoleic acid intake and susceptibility of very-low-density and low-density lipoproteins to oxidation in men". *American J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 698-703.

Malchev, E.; Ioncheva, N.; Tanchev, S. y Kalpakchieva, K. "Quantitative changes in carotenoids during the storage of dried pepper and red pepper powder". *Nahrung*, **1982**, *26*, 415-420.

Malchev, E.; Tanchev, S.; Ioncheva, N. y Kalpakchieva, K. "Changes in carotenoids during the storage of red pepper powder obtained by drying of red pepper paste". *Nahrung*, **1989**, *33*, 415-420.

Malone, W. F. "Studies evaluating antioxidants and β -carotene as chemopreventives". *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 305-313.

Mar de la, R. R. y Francis, F. J. "Carotenoid degradation in bleached paprika". *J. Food Sci.* **1969**, *34*, 287-290.

Martin, H. D.; Jäger, C.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Walsh, R. y Paust, J. "Anti- and prooxidant properties of carotenoids". *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 302-308.

Meerov, Y. S.; Katyuzhanskayaz, A. N. y Dyubankova, N. F. "Carbon dioxide extract from *Capsicum annuum* fruit". *Chem. Abstr.* **1975**, *82*, 10044j.

Miki, W. "Biological functions and activities of animal carotenoids". *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 141-146.

Mínguez-Mosquera, M. I.; Garrido-Fernández, J. y Pereda-Marín, J. "Pimiento pimentonero (*Capsicum annuum*). Relación entre los pigmentos carotenoides rojos y amarillos". *Grasas y Aceites*. **1984**, *35*, 4-10.

Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. "Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC". *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1616-1620.

Mínguez-Mosquera M. I. y Hornero-Méndez, D. "Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce". *J. Agric. Food Chem.* **1994a**, *42*, 38-44.

Mínguez-Mosquera M. I. y Hornero-Méndez, D. "Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola". *J. Agric. Food Chem.* **1994b**, *42*, 640-644.

Mínguez-Mosquera M. I. y Hornero-Méndez, D. "Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce varieties". *J. Agric. Food Chem.* **1994c**, *42*, 1555-1560.

Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. "Changes in provitamin A during paprika processing". *J. Food Protect.* **1997**, *60*, 853-857.

Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. "Isolation and identification of the carotenoid capsolutein from *Capsicum annuum* as cucurbitaxanthin A". *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4087-4090.

- Mínguez-Mosquera, M. I. y Jarén-Galán, M. "Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments". *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 153-161.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. "Color quality in paprika". *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2384-2388.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. "Effect of processing of paprika on the main carotenes and esterified xanthophylls present in the fresh fruit". *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2120-2124.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. "Influence of the industrial drying processes of pepper fruits (*Capsicum annuum* cv. *Bola*) for paprika on the carotenoid content". *J. Agric. Food Chem.* **1994a**, *42*, 1190-1193.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. "Carotenoid metabolism during the slow drying of pepper fruits of the *Agridulce* variety". *J. Agric. Food Chem.* **1994b**, *42*, 2260-2264.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J. y Hornero-Méndez, D. En "Carotenoides en el pimentón. Factores responsables de su degradación". Ed. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J. y Hornero-Méndez, D. CSIC, Madrid, **1996**.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Pérez-Gálvez, A. "Color quality in paprika oleoresins". *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5124-5127.
- Mínguez-Mosquera, M. I.; Pérez-Gálvez, A. y Garrido-Fernández, J. "Carotenoid content of the varieties Jaranda and Jariza (*Capsicum annuum* L.) and response during the industrial slow drying and grinding steps in paprika processing". *J. Agric. Food Chem.* **1999**, en proceso de revisión.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Servicio de Estadísticas Agrarias. En "Anuario de estadística agraria, 1994". Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica, Madrid, **1996**.
- Mo, F. "X-Ray crystallographic studies". En "Carotenoids: Isolation and Analysis". Ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. 321-342. Birkhäuser Verlag, Basel, **1995**.
- Mohri, I.; Morikawa, K.; Matseya, I. y Sato, M. Patente US5264212, **1993**.
- Mordi, R. C.; Walton, J. C.; Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U. y Lindsay, D. A. "Exploratory study of β -carotene autoxidation". *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4203-4206.
- Ohmacht, R.; Toth, G. y Voigt, G. "Separation of serum carotenoids and vitamin A on chromsil-amino and -cyano phases by a bidirectional gradient elution technique". *J. Chromatogr.* **1987**, *395*, 609-612.
- Okos, M.; Csorba, T. y Szabad, J. "The effect of paprika seed on the stability of the red colour of ground paprika". *Acta Alimentaria.* **1990**, *19*, 79-86.

- Olzilgen, S. y Olzilgen, M. "Kinetic model of lipid oxidation in foods". *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 498-501.
- Osuna-García, J. A.; Wall, M. M. y Waddell, C. A. "Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika". *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 1017-1021.
- Parkes, K. E. B.; Pattenden, G.; Baranyai, M.; Molnar, P.; Szabolcs, J. y Tóth, G. "Novel carotenoid 3,6-epoxides from red paprika (*Capsicum annuum*). *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2535-2538.
- Pérez-Gálvez, A. y Garrido-Fernández, J. "Termodegradación de carotenoides en el pimentón". *Grasas y Aceites*, **1997**, *48*, 290-296.
- Pérez-Gálvez, A.; Garrido-Fernández, J.; Mínguez-Mosquera, M. I.; Lozano-Ruiz, M. y Montero-de-Espinosa, V. "Fatty acids composition of two new pepper varieties (*Capsicum annuum* L. cv. *Jaranda* and *Jariza*). Effect of drying process and nutritional aspects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 205-208.
- Pesek, C. A. y Warthesen, J. J. "Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of β -carotenes". *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1313-1315.
- Pfander, H. "Carotenoids: an overview". En "*Carotenoids*" Ed. Packer L. Methods in Enzymology, vol. 213, 3-8. Academic Press, San Diego, **1992**.
- Philip, T. y Francis, F. J. "Oxidation of capsanthin". *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 96-97.
- Philip, T.; Nawar, W. W.; Francis, F. J. "The nature of fatty acids and capsanthin esters in paprika". *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 98-100.
- Pitt, G. A. J. "Vitamin A". En "*Carotenoids*". Ed. Isler, O. 717-724. Birkhäuser Verlag, Basel, **1971**.
- Platt, J. R. "Carotene-donor-acceptor complexes in photosynthesis". *Science.* **1959**, *129*, 372-374.
- Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; y Mills, K. A. "Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids". *Lipids.* **1995**, *30*, 277-290.
- Pryor, W. A.; Strickland, T. y Church, D. F. "Comparison of the efficiencies of several natural and antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions". *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2224-2229.
- Real Decreto 472/1990 (8949). *Boletín Oficial del Estado.* **1990**, *88*, 10163-10164.
- Real Decreto 226/1994 (6962). *Boletín Oficial del Estado.* **1994**, *72*, 9654-9655.

Rodríguez, A.; Guzmán, J. L.; González, J. A. y Jiménez, M. "Jaranda y Jariza: dos nuevas variedades de pimiento para pimentón". Actas del II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Zaragoza, 1993, 1362-1367.

Samokyszyn, V. M. y Marnett, L. J. "Hydroperoxide-dependent cooxidation of 13-cis-retinoic acid by prostaglandin H synthase". *J. Bio. Chem.* 1987, 262, 14119-14133.

Sandmann, G. "Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants". *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 7-24.

Sakai, T. y Kuwazuru, S. A. "Lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, contents in several fish meats". *Fish. Sci.* 1995, 61, 527-528.

Seale, M. S. y Williams, D. H. "On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy-entropy compensations, internal rotations and reversibility". *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 2051-2056.

Siefermann-Harms, D.; Hertzberg, S.; Borch, G. y Liaaen-Jensen, S. "Lactucaxanthin, and ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa*". *Phytochemistry.* 1981, 20, 85-88.

Skerget, M.; Knez, Z.; Novak, Z. y Bauman, D. "Separation of paprika components using dense CO₂". *Acta Alimentaria.* 1998, 27, 149-160.

Soldatov, K. I. Proc. 7th Int. Sunflower Conf. Krasndar USSR. Int. Sunflower Association, Vlaadingen, Netherlands. 1976, 352-357.

Soriano, M. C.; Navarro, F. y Costa, J. "Caracterización de nuevos cultivares de pimiento para pimentón". *Agric. Vergel.* 1990, 8, 630-632.

Specifications for oleoresin paprika, E. O. A. (239). Oleoresin red pepper, E. O. A. (244). Essential Oil Association, New York, 1975.

Stocker, R.; Yamamoto, Y.; McDonagh, A. F.; Glazer, A. N. y Ames, B. N. "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance". *Science.* 1987, 235, 1043-1046.

Stradi, R.; Celentano, G.; Rossi, E.; Rovati, G. y Pastore, M. "Carotenoids in bird plumage. I. The carotenoid pattern in a series of Palearctic *Carduelinae*". *Comp. Biochem. Physiol.* 1995, 110, 131-143.

Stratton, S. P.; Schaefer, W. H. y Liebler, D. C. "Isolation and identification of singlet oxidation products of β -carotene". *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6, 542-547.

Sun, Y. "Free Radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis". *Free Radical Biol. Med.* 1990, 8, 583-599.

Takaichi, S.; Sandmann, G.; Schnurr, G.; Satomi, Y.; Suzuki, A. y Misawa N. "The carotenoid 7,8-dihydro- ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*". *Eur. J. Biochem.* 1996, 241, 291-296.

Terao, J. "Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution". *Lipids.* 1989, 24, 659-661.

Trush, M. A. y Kensler, T. W. "An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis". *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 201-209.

Vámos-Vigyazó, L.; Polacsek-Ráck, M.; Schmidt, K.; Joó-Farkas, I.; Pauli, M.; Horváth, G.; Kiss, K. y Horváth, L. "Relation-ship between pigment content, peroxidase activity and sugar composition of red pepper (*Capsicum annuum*, L.)". *Acta Aliment.* **1985**, *14*, 173-189.

Weedon, B. C. L. "Stereochemistry". En "*Carotenoids*". Ed. Isler, O. 267-323. Birkhäuser Verlag, Basel, **1971**.

Weedon, B. C. L. y Moss, G. P. "Structure and nomenclature". En "*Carotenoids: Isolation and Analysis*". Ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. 27-70. Birkhäuser Verlag, Basel, **1995**.

Woodall, A. A.; Wai-Ming Lee, S.; Weesie, R. J.; Jackson, M. J.; Britton, G. "Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity". *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1336*, 33-42.

Yamauchi, R.; Miyake, N.; Inoue, H. y Kato, K. "Products formed by peroxy radical oxidation of β -carotene". *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 708-713.

Zechmeister, L. "Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes". *Chem. Rev.* **1944**, *34*, 267-322.

Zeevaart, J. A. D. y Creelman, R. A. "Metabolism and physiology of abscisic acid". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1988**, *39*, 439-473.

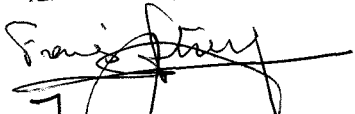
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. ANTONIO PÉREZ GÁLVEZ
titulada OXIDACIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES
EN FUNCIÓN DE SU ESTRUCTURA Y ENTORNO
LIPÍDICO.

Se acordó declarar a D. ANTONIO PÉREZ GÁLVEZ SOBRESALIENTE CUM LAUDE
CON CINCO VOTOS POR UNANIMIDAD

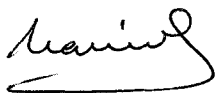
En fecha 18 de JULIO de 2000

El Vocal.

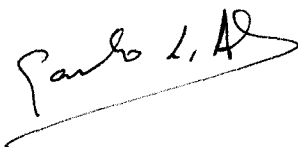


El Presidente

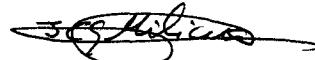
El Vocal.



El Secretario.



El Vocal.



El Doctorado.

