

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN ESPECIES Y VARIEDADES
NATIVAS DE MAMEY Y CAMBIOS DURANTE LA MADURACIÓN.

PRESENTADO POR:
ALEJANDRINO SEVILLANO A.

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA

ASESOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE MURILLO

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

Asesor (Dr. Enrique Murillo)

Jurado (Dra. Eunice Molinar)

Jurado (Dr. Armando Durant)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa Rosalba, a mis hijos Eilyn Del Carmen, Alejandra Nicole y Alejandro Felipe, que son el motor en mi vida y me dan las fuerzas de seguir adelante día a día, también a mis padres Alejandrino Sevillano y Xiomara Arosemena, quienes con su esfuerzo me han apoyado todos los días de mi vida y a todos los miembros de mi familia que en todo momento me han llevado en sus mentes y en sus corazones.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Rosalba Moreno y a mis hijos Eilyn Del Carmen, Alejandra Nicole y Alejandro Felipe por ser mi más grande motivación y por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A mis padres Alejandrino y Xiomara gracias por todo su amor, paciencia y dedicación, por cada creer y confiar en mí y por todo el apoyo brindado para poder completar con esta meta profesional de mi vida. A mi hermana por estar presente no solo en esta etapa tan importante sino siempre.

A mi asesor de la tesis el Doctor Enrique Murillo primeramente por aceptarme como tesista y agradezco además todas sus enseñanzas, paciencia, dedicación y estar dispuesto aclarar mis dudas en el desarrollo de este proyecto.

A la Doctora Eunice Molinar por su apoyo y orientación, que fueron de gran ayuda para terminar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	8
2.1 Generalidades del mamey.....	8
2.2 Especies de mamey.....	9
2.2.1. <i>Pouteria sapota</i>	10
2.2.2. <i>Pouteria fossicola</i>	12
2.2.3. <i>Pouteria viridis</i>	13
2.3 Generalidades de los carotenoides.....	15
2.3.1. Clasificación de los carotenoides	16
2.3.2. Funciones biológicas de los carotenoides	18
2.3.3. Biosíntesis de carotenoides	21
2.3.4. Carotenoides en los alimentos.....	24
2.3.5. Variaciones del contenido de carotenoides durante el desarrollo del fruto	25
2.3.6. Carotenoides Identificados en el mamey	26
2.4 Análisis de Carotenoides	28
2.4.1 Extracción	28
2.4.2. Saponificación	29
2.4.3. Cuantificación por Espectroscopía Ultravioleta-Visible	30
2.4.4. Aislamiento y purificación de carotenoides.....	34
2.4.4.1. Cromatografía en columna abierta	35
2.4.4.2. Cromatografía semi preparativa	35
2.4.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
2.4.5. Identificación por Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	37

III.	JUSTIFICACIÓN	40
IV.	OBJETIVOS.....	41
4.1.	Objetivo general:	41
4.2.	Objetivos específicos:	41
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1	Reactivos y equipos.....	42
5.1.1	Equipos	42
5.1.2	Reactivos.....	42
5.2	Muestra de especies y variedades de mamey	43
5.3	Extracción de carotenoides	44
5.4.	Cuantificación de carotenoides totales	45
5.4.1.	Determinación espectrofotométrica de multicomponentes	46
5.4.2.	Carotenoides rojos y amarillos vs carotenoides totales a 450 nm.	47
5.5.	Saponificación	47
5.6.	Cuantificación de Carotenoides totales para HPLC semipreparativa.....	48
5.7.	Combinación de HPLC semipreparativa C18 con HPLC Analítica C30	49
5.9.	Identificación de los carotenoides del mamey.....	50
5.9.	Determinación del contenido de azúcares totales.....	51
5.10.	Análisis estadístico de los datos	52
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
6.1.	Optimización de técnicas para el análisis de los carotenoides del mamey.....	53
6.1.1.	Uso de antioxidante en la saponificación.....	53
6.1.2	Comparación de dos métodos espectrofotométricos en la determinación de carotenoides totales.....	54
6.1.3.	Combinación de HPLC-C18 semipreparativa y HPLC-C30 de la muestra PS-19.....	56
6.1.3.1.	Combinación de HPLC-C18 semipreparativa y HPLC-C30 analítica en el análisis de carotenoides.....	56
6.1.3.2.	Análisis de los carotenoides de F 1	58
6.1.3.3.	Análisis de los carotenoides en F 2	59
6.1.3.4.	Análisis de los carotenoides de F 3	60
6.1.3.5.	Análisis de los carotenoides de F 4.	61
6.1.3.6.	Análisis de los carotenoides de F 5	62
6.1.3.7.	Análisis de los carotenoides de F 6	64

6.1.3.8. Análisis de los carotenoides de F 7	64
6.1.4. Identificación de los carotenoides en la misma fracción de varios extracto por HPLC-DAD.....	66
6.2. Perfil vs cantidad de carotenoides en mameyes maduros.....	67
6.3. Cambios en los carotenoides del mamey durante la maduración.....	72
6.4. Comparación el perfil de carotenoides a diferentes estados de maduración	78
6.5. Perfil de carotenoides presente entre especies de mamey.	80
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. RECOMENDACIONES	93
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores nutricionales de la pulpa del <i>Pouteria sapota</i>	12
Tabla 2. Valores nutricionales de la pulpa del <i>Pouteria viridis</i>	14
Tabla 3. Coeficientes de absorción (A1%1cm) de carotenoides comunes.	32
Tabla 4. Muestra PS-36 con y sin antioxidante durante la saponificación.	54
Tabla 5. Carotenoides expresados como β -caroteno y como amarillos y rojos.....	55
Tabla 6. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-1.....	68
Tabla 7. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-3.....	68
Tabla 8. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-5.....	69
Tabla 9. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-6.....	69
Tabla 10. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-7.....	70
Tabla 11. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-9.....	70
Tabla 12. Variabilidad en el contenido de carotenoides de <i>Pouteria sapota</i> maduros. ..	71
Tabla 13. Variabilidad de carotenoides específicos en frutos del árbol PS-9.....	72
Tabla 14. Cambios del perfil (%) de carotenoides durante la maduración del mamey. .	79
Tabla 15. Perfil (%) de carotenoides en 6 variedades de mamey (<i>Pouteria sapota</i>).....	82
Tabla 16. Caracterización de variedades de <i>Pouteria sapota</i> (PS).....	83
Tabla 17. Perfil (%) de carotenoides en 6 variedades de mamey (<i>Pouteria fossicola</i>). .	85
Tabla 18. Caracterización de variedades de <i>Pouteria fossicola</i> (PF).	86
Tabla 19. Perfil (%) de carotenoides en 5 variedades de mamey (<i>Pouteria viridis</i>).	88
Tabla 20. Caracterización de variedades de <i>Pouteria viridis</i> (PV).....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de mamey, especie <i>Pouteria sapota</i>	8
Figura 2. Especies de mamey nativos de Panamá.....	10
Figura 3. Ejemplos de carotenos.....	17
Figura 4. Ejemplos de xantófilas.....	17
Figura 5. Carotenoides y su posible conversión a vitamina A.....	19
Figura 6. Ruta biosintética de los carotenoides.....	23
Figura 7. Algunos carotenoides rojos y los amarillos del mamey.....	27
Figura 8. Identificación de carotenoides por UV-Vis.....	39
Figura 9. Variabilidad morfológica entre frutos de mamey.....	43
Figura 10. Concentración del extracto cetónico.....	44
Figura 11. Partición con una mezcla de éter dietílico: n-hexano (1:1).....	45
Figura 12. Esquema del fraccionamiento de los extractos de carotenoides.....	50
Figura 13. Cromatograma y fraccionamiento por HPLC-C18 de los carotenoides del mamey de la muestra PS-19.....	57
Figura 14. Separación HPLC-C30 e identificación de los carotenoides del mamey de la muestra PS-19.....	58
Figura 15. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 1.....	59
Figura 16. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 2.....	60
Figura 17. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 3.....	61
Figura 18. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 4.....	62
Figura 19. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 5.....	63
Figura 20. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 6.....	64
Figura 21. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 7.....	65
Figura 22. Espectros de absorción superpuestos de la 3'-deoxicapsantina.....	67
Figura 23. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-21.....	74
Figura 24. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-22.....	74
Figura 25. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-23.....	75
Figura 26. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-24.....	75
Figura 27. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-25.....	76
Figura 28. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-26.....	76
Figura 29. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PF-1.....	77
Figura 30. Mamey del árbol PS-21 a diferentes etapas de maduración.....	77
Figura 31. Mamey del árbol PS-24 a diferentes etapas de maduración.....	78
Figura 32. Muestras estudiadas de <i>Pouteria sapota</i> (PS).....	84
Figura 33. Muestras estudiadas de <i>Pouteria fossicola</i> (PF).....	87
Figura 34. Muestras estudiadas de <i>Pouteria viridis</i> (PV).....	90
Figura 35. Cromatograma HPLC analítica C-30 de muestras de <i>Pouteria sapota</i>	91

ABREVIATURAS

BHT: Butil-hidroxi-tolueno

DAD: Detector de arreglo de diodos

ER: Equivalentes de retinol

FN: Fase normal

FR: Fase reversa

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos

HPLC-C18: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de diodos con
columna C18

HPLC-C30: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de diodos con
columna C30

MTBE: metil terbutil éter

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

APCI-MS: Ionización Química a Presión Atmosférica – Espectrómetro de Masas

PS: *Pouteria sapota*

PF: *Pouteria fossicola*

PV: *Pouteria viridis*

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN ESPECIES Y VARIETADES NATIVAS DE MAMEY Y CAMBIOS DURANTE LA MADURACIÓN

En Panamá el nombre mamey es dado a un grupo de frutas de la familia Pouteria con pulpa naranjas a roja. En este grupo se incluyen las especies *Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* y *Pouteria fossicola*. Estas especies son nativas de México y América Central (Domínguez et al., 2010) y en Panamá se encuentran ampliamente distribuidas. El fruto de los mameyes posee un alto contenido de nutrientes, es de sabor dulce y se consume fresco y procesado como bebidas, helados (etc.). El color de la pulpa del mamey maduro se debe a la cantidad y tipo de carotenoides que contiene (Murillo, et al., 2010) . Los carotenoides de los alimentos se han asociado con beneficios para la salud, tales como protección contra el cáncer, prevención de enfermedades crónicas (enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración macular) y enfermedades degenerativas como (Fiedor y Burda, 2014; Kusmita et al., 2022; Lakey-beitia et al., 2017; Turcsi et al., 2016) Utilizando HPLC-DAD, se han observado 47 picos correspondientes a carotenoides, de los cuales 34 han sido plenamente identificados, (Murillo et. al. 2016). Por la diversidad de carotenoides de esta fruta, algunos carotenoides eluyen como mezclas y se hace difícil la identificación. Por otro lado, hasta el momento no se han estudiado los cambios en los carotenoides, de la pulpa, durante la maduración, ni los carotenoides presentes en las especies *P. viridis* y *P. fossicola* y sus variedades. En este estudio, cuantificamos simultáneamente los carotenoides amarillos y rojos y los comparamos con los cuantificados solo a 450 nm. Encontramos que, la cuantificación a una sola longitud de onda subestima los carotenoides totales. Observamos que, durante la maduración aumenta el contenido de los carotenoides, siendo la mayor proporción en los carotenoides rojos. Demostramos que, existe una gran variabilidad en el contenido de carotenoides, entre frutos de un mismo árbol, cuando los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ y demostramos que el perfil cromatográfico (%) es un mejor indicador de los carotenoides de esa variedad. Combinando la cromatografía semipreparativa con columna C18 y la cromatografía analítica con C30, logramos separar e identificar 11 carotenoides que generalmente se superponen utilizando cromatografía analítica con C30. Cuando se compara los carotenoides entre las tres especies de mamey (*Pouteria sapota*, *Pouteria fossicola* y *Pouteria viridis*), encontramos que en todas las variedades de estas especies están presentes los mismos carotenoides, aunque no se logró observar un patrón que caracteriza una especie determinada.

SUMMARY

EVALUATION OF CAROTENOIDS IN NATIVE SPECIES AND VARIETIES OF MAMEY AND CHANGES DURING RIPENING

In Panama the name mamey is given to a group of fruits from the Pouteria family with orange to red flesh. This group includes the species *Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* and *Pouteria fossicola*. These species are native to Mexico and Central America (Domínguez et al., 2010) and are widely distributed in Panama. The fruit of the mameyes has a high content of nutrients, has a sweet flavor and is consumed fresh and processed as drinks, ice creams (etc.). The color of the ripe mamey pulp is due to the amount and type of carotenoids it contains (Murillo, et al., 2010). Food carotenoids have been associated with health benefits, such as protection against cancer, prevention of chronic diseases (cardiovascular diseases, cataracts, macular degeneration) and degenerative diseases such as (Fiedor and Burda, 2014; Kusmita et al., 2022; Lakey-beitia et al., 2017; Turcsi et al., 2016) Using HPLC-DAD, 47 peaks corresponding to carotenoids have been observed, of which 34 have been fully identified, (Murillo et. al. 2016). Due to the diversity of carotenoids in this fruit, some carotenoids elute as mixtures and identification is difficult. On the other hand, changes in pulp carotenoids during ripening have not been studied so far, nor have the carotenoids present in the species *P. viridis* and *P. fossicola* and their varieties been studied. In this study, we simultaneously quantified yellow and red carotenoids and compared them to those quantified only at 450 nm. We found that quantification at a single wavelength underestimates total carotenoids. We observe that, during ripening, the content of carotenoids increases, being the highest proportion in red carotenoids. We show that there is great variability in the carotenoid content between fruits of the same tree, when the results are expressed in $\mu\text{g/g}$ and we show that the chromatographic profile (%) is a better indicator of the carotenoids of that variety. By combining semi-preparative C18 column chromatography and analytical C30 chromatography, we were able to separate and identify 11 generally overlapping carotenoids using analytical C30 chromatography. When comparing the carotenoids between the three species of mamey (*Pouteria sapota*, *Pouteria fossicola* and *Pouteria viridis*), we found that the same carotenoids are present in all the varieties of these species, although it was not possible to observe a pattern that characterizes a certain species.

I. INTRODUCCIÓN

El mamey es una fruta redonda a ovoide con una corteza firme y resistente con pulpa de color salmón a rojo y 1 a 4 semillas grandes (Solano Rivera, 1999). Se encuentra comúnmente en América Central, donde generalmente se consume crudo, aunque también se puede preparar en helados o mermeladas (Crans Yoon et al., 2015). Sus pulpas son de tonalidad rojizas que se debe a la presencia de carotenoides y se ha reportado que durante la maduración la concentración de estos pigmentos aumenta (Alia-Tejacal et al., 2017). Entre las especies relacionadas a la *Pouteria sapota* están también la *Pouteria fossicola* y *Pouteria viridis* (Quesada y Vargas, 2002).

Estas frutas alcanzan el climaterio de 3.5 a 7 días después de la cosecha y almacenaje en condiciones ordinarias 20 a 27 °C, lo cual repercute en una muy corta vida comercial (Téllez et al., 2009) Es difícil determinar el dato de madurez óptimo para la cosecha ya que los árboles presentan un hábito de floración errático, por lo que es posible encontrar flores y frutos en varias etapas de maduración en un mismo árbol. Cuando algunas frutas se cosechan antes de la madurez óptima, estas no maduran debidamente (Quesada y Vargas, 2002).

Los carotenoides constituyen una gran familia de pigmentos isoprenoides solubles en grasa, ampliamente reconocidos como bioactivos (Saini et al., 2015a), responsables de muchos de los colores amarillos a rojo de flores, frutas, vegetales, microorganismos y algunos productos animales como el salmón y la yema de huevo (D. Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

Los carotenoides presentan una estructura básica que consiste en un esqueleto de carbono simétrico y lineal con una serie de dobles enlaces conjugados, que genera un sistema de resonancia de electrones π que corresponde al cromóforo de la molécula, (Bobrowski et al., 2019). Se han reportado más de 750 diferentes carotenoides en la naturaleza, de los cuales se conoce que más de 100 se encuentran presentes en la cadena alimentaria y en la dieta humana (Ma et al., 2018). Los humanos no sintetizan carotenoides; en su lugar, deben ingerirse en alimentos o mediante suplementos (Eggersdorfer y Wyss, 2018).

Los carotenoides se dividen en carotenos o xantofilas. Las xantofilas a menudo están esterificadas con ácidos grasos. Es por esto por lo que generalmente el estudio de los carotenoides se lleva a cabo después de una saponificación, para liberarlas xantofilas, eliminando los lípidos y destruyendo las clorofilas y facilitar el análisis. Sin embargo, se ha reportado que durante la saponificación puede ocurrir procesos de degradación de los carotenoides. (Giuffrida et al., 2015). Por lo tanto, algunos autores recomiendan el uso de sustancias antioxidantes como el Butilhidroxitolueno (BHT), ácido gálico, entre otros.

Los carotenoides desempeñan una serie de funciones, tales como pigmentos accesorios en el proceso de recolectar luz para la fotosíntesis, participan en el proceso de fotoprotección para proteger las plantas del daño causado por el exceso de luz en la fotosíntesis, decorar flores y frutas con distintos colores para atraer a los polinizadores y distribuidores de semillas (Zhang et al., 2019).

Los carotenoides son nutrientes esenciales en las dietas humanas, como fuente de vitamina A principalmente β -caroteno, β -criptoxantina y α -caroteno (Saini et al.,

2015b). La luteína y la zeaxantina, se ha reportado que pueden reducir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Prado-cabrero et al., 2016). El consumo de carotenoides también se ha asociado con varios beneficios para la salud, incluido un riesgo reducido de degeneración macular relacionada con la edad y cataratas, algunos cánceres y enfermedades coronarias (Murillo et al., 2013a), algunos de estos efectos se atribuyen a su actividad antioxidante, debido a la capacidad que presentan de eliminar los radicales libres.

La técnica HPLC-DAD, se utiliza ampliamente para separar e identificar isómeros E/Z de carotenoides (Murillo, 2018a). La fase estacionaria más utilizada es la fase reversa, ya sea utilizando columna C₁₈ o C₃₀, para lograr separaciones de moléculas que difieren en hidrofobicidad dentro de una clase estructural dada. Las fases móviles utilizadas consisten en mezcla de solventes como metil-t-butiléter, acetonitrilo, diclorometano, isopropanol o metanol. Sin embargo, estas condiciones a veces no proporcionan suficiente poder de resolución para la separación de analitos en muchas muestras complejas (Cacciola et al., 2016a).

Recientemente Murillo y colaboradores han publicado varios estudios en donde demuestran que el color de la pulpa de *Pouteria sapota*, se debe a la presencia de novedosos carotenoides con anillos κ (Murillo et al., 2016). En la naturaleza, generalmente el anillo κ de los carotenoides se encuentra hidroxilado, pero se han encontrados carotenoides con el anillo κ no hidroxilado (Murillo et al., 2010). En experiencias realizadas por cromatografía HPLC-DAD-APCI-MS, se han detectado y caracterizados entre otros, carotenoides como la sapotexantina, la criptocapsina, seis mono ésteres de criptocapsina diferentes y un mono éster de criptocapsina 5,6-

epóxido, los cuales se identificaron como carotenoides rojos. Además, β -criptoxantina 5,6-epóxido, y β -criptoxantina 5,8-epóxido, β -criptoxantina 5,6,5',6'-diepóxido y β -caroteno 5,8-epóxido, clasificados como carotenoides amarillos (Turcsi et al., 2015).

Recientemente utilizando pruebas químicas, fraccionamiento con cromatografía en columna y cromatografía HPLC-DAD-MS se detectaron un total 47 componentes de los cuales fueron identificaron 34 componentes carotenoides. Los principales carotenoides fueron Criptocapsina, Sapotexantina y Capsantina 5,6-epóxido (Murillo et al., 2016). Sin embargo, no se logró una identificación completa y extensa de los más de 40 carotenoides que comprenden el perfil cromatográfico del extracto de mamey rojo (*Pouteria sapota*), probablemente debido a la presencia de picos que se superponen posiblemente por las similitudes de polaridad que existen entre dichas sustancias (Murillo et al., 2016). Otro dato importante para mencionar es que no se han reportado datos sobre cómo cambian los carotenoides durante la maduración de la fruta, además como varían las concentraciones con diferentes variedades y especies de *Pouteria*.

El objetivo de este estudio fue cuantificar e identificar los carotenoides presentes en diferentes especies de mamey existentes en Panamá, como son la *Pouteria sapota*, *Pouteria fossicola* y la *Pouteria viridis*, observando los perfiles de carotenoides a diferentes etapas de maduración. Además, se separaron e identificaron algunos carotenoides que se superponen durante la separación por HPLC-DAD, empleando dos técnicas cromatográficas como son la HPLC-C18 semipreparativa junto con la cromatografía HPLC-C30 analítica. También evaluamos el proceso de

saponificación, utilizando una sustancia antioxidante para mejorar el rendimiento durante el proceso.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del Mamey

El género *Pouteria* pertenece a la familia de las sapotáceas, originarias de las regiones de América Central y México, que fueron llevadas por los españoles a las regiones tropicales de Filipinas, Malasia e India (Nava y Ricker, 2005).

Los árboles de estas especies son de gran tamaño, llegando a tener entre 20 a 40 m de altura, por lo que la recolección de las frutas debe realizarse a mano, usando varillas y escaleras, en la figura 1 se aprecia un árbol de Mamey de la especie *Pouteria sapota*. Estos árboles de Mamey crecen satisfactoriamente en las tierras bajas y calientes de América Central y México, entre los 0-1200 m de altitud, y en regiones de trópicos húmedos. En general, el árbol de mamey es estrictamente tropical, no soportan las bajas temperaturas y a mayores altitudes sufre daños por frío y se desarrollan poco (Solano Rivera, 1999).



Figura 1. Árbol de mamey, especie *Pouteria sapota*.

La familia Sapotáceas proporcionan productos económicamente importantes como el látex (tronco, ramas y frutos, generalmente blanco y raramente amarillo), madera y frutas para consumo humano de alto valor nutritivo (Martínez-Sovero y Iglesias-Osores, 2020; Velázquez Paulín et al., 2015).

Estudios recientes sugieren, que el consumo de los frutos de algunas sapotáceas puede ayudar en la prevención del daño celular y de tejidos (Chacón-Ordóñez et al., 2017; Rodríguez et al., 2018; Velázquez Paulín et al., 2015). Además, protege contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, alzheimer (Alia-Tejacal et al., 2017; Britton, 2009; Chacón-Ordóñez y Esquivel, 2013).

Las pouterias son frutas climatéricas que alcanzan el climaterio de cuatro a siete días después de la cosecha y almacenaje en condiciones estándar de temperatura y presión (Téllez et al., 2009). Es difícil determinar el estado óptimo para la cosecha de estas frutas, ya que los árboles de estas especies presentan un hábito de floración errático (florece todo el año), por lo que es posible encontrar simultáneamente flores y frutos en árbol. Además, cuando algunas frutas son cosechadas antes del estado óptimo, estas no maduran, o lo hacen con características no deseables (Saucedo Veloz et al., 2001).

2.2 Especies de Mamey

El término Mamey también se utiliza, para identificar los frutos de tres especies del género *Pouteria*: *Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* y *Pouteria fossicola*, en la

figura 2 se puede observar la imagen de estas tres especies, las cuales se pueden encontrar en Panamá.

a)



b)



c)



Figura 2. Especies de Mamey nativos de Panamá. a) *Pouteria sapota*, b) *Pouteria fossicola* y c) *Pouteria viridis*.

2.2.1. *Pouteria sapota*

La especie *Pouteria sapota* es nativa del sur de México y de toda Centroamérica, incluyendo a Panamá (Espinosa-zaragoza et al., 2016). El árbol de esta especie también se puede encontrar en Cuba y en regiones del norte de América del Sur. Esta

planta es cultivada principalmente por sus frutos, que están enriquecidos con abundantes nutrientes (Prabhu et al., 2018). En la tabla 1, se pueden apreciar valores nutricionales de la pulpa del *Pouteria Sapota*.

El fruto mide 10-25 cm de largo y 8-12 cm de ancho, presentan una forma variable entre esféricas a elipsoides (Rodríguez et al., 2018), de piel dura, rugosa y quebradiza, de color pardo rojizo o herrumbre (Solano Rivera, 1999), en su interior suele haber de una a dos semillas (Cariço et al., 2014).

La *Pouteria sapota* es valorada por sus características sensoriales y alto valor nutricional (carbohidratos, fibra, minerales, vitaminas A, C y E, y compuestos antioxidantes), como podemos observar en la tabla 1. Su pulpa de color rojo salmón, textura suave y sabor dulce, se consume fresca (para su mejor sabor es necesario comerlos cuando maduran bien), y a menudo es utilizada como ingrediente en mermelada, sorbete, paletas, gelatina, yogur, postres y panadería (González et al., 2021). Esta fruta tiene actualmente una gran demanda no solo en México y Centroamérica, sino también en Sudamérica, España, Australia, Israel, Filipinas y Florida (EE. UU.) (Rodríguez et al., 2018).

El rango de pH de la pulpa es de 4.5 a 6.0, por el bajo contenido de ácidos orgánicos. El componente de mayor influencia en la acidez del mamey es el ácido ascórbico. Por otra parte, se han identificado compuestos con actividad antioxidante como ácido gálico, catequina, polifenoles y flavonoides, así como cantidades significativas de fibra dietética total y pectina (0.77 g/100 g) (Velázquez Paulín et al., 2015). El Color de la pulpa se debe principalmente a los carotenoides que contiene (Murillo et al., 2013b; Velázquez Paulín et al., 2015).

Tabla 1. Valores nutricionales de la pulpa del *Pouteria Sapota*

Valores nutricionales del mamey (para 100 gramos de pulpa)	
Constituyente	Valor aproximado
Humedad	63.8 %
Calorías	126.0 Kcal
Proteínas	3.1 g
grasas	0.1 g
Carbohidratos	31.8
Fibra	1.2 g
Cenizas	1.2 g
Calcio	121 mg
Fosforo	30 mg
Hierro	0.8 mg
Vitamina A	70 IU
Tiamina	0.01 mg
Riboflavina	0.05 mg
Niacina	1.9 mg
Ácido ascórbico	40 mg

*Análisis realizados en Guatemala (Morton, 1987).

2.2.2. *Pouteria fossicola*

Esta especie crece de forma silvestre desde la región central de Costa Rica hasta Panamá, a bajas y medianas elevaciones, en bosques húmedos o muy húmedos en las provincias de Coclé, Colón, Darién, Panamá y Veraguas. Es una especie rara y poco frecuente dentro del bosque. Florece y fructifica durante todo el año. Los árboles son de 30 m de altura aproximadamente, hojas densamente aglomeradas, arregladas

espiralmente y flores creciendo axiales y en grupos debajo de las hojas (Pennington, 1990; Solano Rivera, 1999).

Los frutos van de formas elipsoides a ovoides y esféricas, de ápice agudo a obtuso, de finamente a groseramente lenticeladas, de color de piel verde y gris. Su pulpa es de color salmón claro con fuerte olor a almendras, contiene de una a dos semillas de forma elipsoide a ovoide, de color café. Generalmente se come como fruta fresca o en conserva (León Hurtado, 1987; Pennington, 1990; Solano Rivera, 1999). No aparecen registros de tablas nutricionales, ni de los carotenoides presentes en esta especie.

2.2.3. *Pouteria viridis*

Dentro de las frutas menos conocidas y estudiadas de la familia Sapotaceae, está el *Pouteria viridis*, también conocido como zapote injerto en Guatemala o zapote verde en otras regiones de Centro América. Se distribuye desde México sureste y tierras altas en Guatemala a altitudes entre 1,000 a 1,500 m.s.n.m. y Honduras hasta Costa Rica y Panamá a altitudes entre 100 a 200 m.s.n.m., siendo nativa de Guatemala (Morton, 1987; Pennington, 1990; Solano Rivera, 1999).

Los frutos van de forma redonda a ovoides, de piel suave y lisa de color verde olivo a verde amarillo y amarillo café, a menudo parcial o completamente cubiertas por gran cantidad de lenticelas café rojizas. Los frutos, que poseen áreas libres de lenticelas, en la madurez son amarillo verdoso, lisos y brillantes. El color de la pulpa varía de tonos crema a salmón oscuro (Morton, 1987). La pulpa es por lo general de

fina textura, dulce y jugosa, con fuerte olor a almendras, se deshace en la boca y es de mejor sabor que el *Pouteria. sapota*. Presenta de una a dos semillas, de forma elipsoide a poco ovoide, de color café oscuro brillante en la parte dorsal y canela en la parte central, más pequeñas que las del *Pouteria sapota* (Quesada y Vargas, 2002). En la tabla 2 se presentan resultados de la tabla nutricional para el *Pouteria viridis*. No aparecen registros de los carotenoides presentes en esta especie.

Tabla 2. Valores nutricionales de la pulpa del *Pouteria viridis*

Valores nutricionales del <i>Pouteria viridis</i>	
(para 100 gramos de pulpa)	
Constituyente	Valor aproximado
Humedad	68,1-69,5 g
Proteína	0,152-0,283 g
Grasa	0,24-0,28 g
Fibra	1,2-1,6 g
Ceniza	0,69-1,38 g
Calcio	18,6-35,7 mg
Fósforo	22,1-23,6 mg
Hierro	0,57-0,74 mg
Caroteno	0,031-0,069 mg
Tiamina	0,009-0,011 mg
Riboflavina	0,027 mg
Niacina	1,88-1,189 mg
Ácido ascórbico	49,9-62,3 mg

*Análisis realizados en Guatemala (Morton, 1987).

2.3 Generalidades de los carotenoides

Los carotenoides (junto con la clorofila) son los pigmentos orgánicos más extendidos en la naturaleza. En este momento, se han reportado más de 799 carotenoides diferentes (Yaroshevich et al., 2015), de los cuales se conoce que más de 100 se encuentran presentes en los alimentos que ingerimos (Kulczyński et al., 2017; Ma et al., 2018). Las plantas y algunos microorganismos son capaces de sintetizarlos, pero los humanos y los animales no pueden. En cambio, necesitamos obtenerlos a través de los alimentos y por medio de suplementos (Agócs et al., 2018b; Yoon et al., 2016).

El componente estructural clave de los carotenoides es su estructura base formada por 8 unidades de isopreno compuestas por 40 átomos de carbono, generalmente (Kulczyński et al., 2017). Ellos presentan una que consiste en un esqueleto de carbono simétrico y lineal con una serie de dobles enlaces conjugados, que genera un sistema de resonancia de electrones π que corresponde al cromóforo de la molécula (Bobrowski et al., 2019). En los carotenoides, los cromóforos más comunes contienen de 7 a 11 dobles enlaces (D. Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004)

El cromóforo que se presenta en la molécula de carotenoide determina las propiedades de absorción y captación de la luz. Por tanto, el cromóforo es la parte de una molécula del carotenoide responsable de muchos de los colores amarillos a rojo de flores, frutas, vegetales, microorganismos y algunos productos de origen animales como por ejemplo el salmón y la yema de huevo (Amaya-Rodríguez, 2001) y también

de la coloración de raíces (zanahorias y mandioca) y semillas (maíz, achiote), (Zhang et al., 2019). Además de ayudar en acciones fotoprotectoras (Saini et al., 2015a).

En la mayoría de los carotenoides naturales, todos los enlaces dobles tienen la configuración E (*trans*) y se identifican como forma totalmente E, aunque se han encontrado algunas fuentes naturales con alto contenido de isómeros Z (*cis*) (Yaroshevich et al., 2015). Además, el procesamiento de alimentos y la manipulación de muestras durante el análisis puede provocar la isomerización E/Z. Por esta razón, es muy común encontrar carotenoides con configuración Z cuando se analizan muestras de alimentos (D. Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

La estructura básica de los carotenoides se puede modificar de muchas formas como ciclación, hidrogenación, deshidrogenación, introducción de funciones de oxígeno (grupos funcionales carbonilo o hidroxilo, anillos epóxido y furanoide), acortamiento de la cadena o combinación de estos (Turcsi et al., 2016).

2.3.1. Clasificación de los carotenoides

Los carotenoides, debido a las diferencias en sus estructuras químicas, se pueden dividir en carotenos y xantofilas. Los carotenos contienen una cadena formada por solos átomos de carbono e hidrógeno, como ejemplos de carotenos tenemos al licopeno, α -caroteno y β -caroteno (figura 3). Las xantofilas contienen además de átomos de carbono e hidrógeno, átomos de oxígeno en su estructura, por ejemplo, la β -criptoxantina y la zeaxantina (figura 4), entre otros (Kulczyński et al., 2017; Saini et al., 2015a)

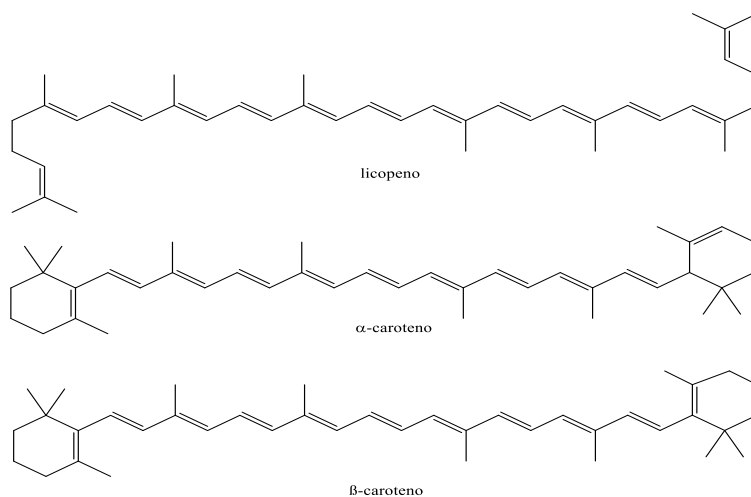


Figura 3. Ejemplos de carotenos.

a) lycopeno, b) α -caroteno y c) β -caroteno

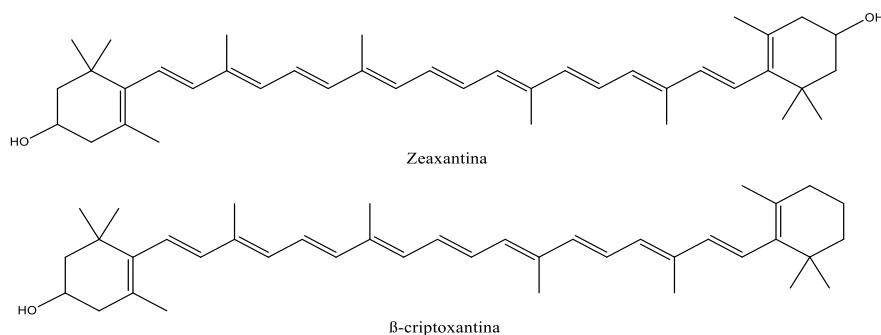


Figura 4. Ejemplos de xantófilas.

a) β -criptoxantina y b) Zeaxantina

El oxígeno en la xantofila en la mayoría de los casos se puede presentar en grupos hidroxilo (OH), cetona (C=O) y epóxido (epóxidos 5,6- ó 5,8). También se encuentran los grupos aldehído (CHO), ceto, carboxi (CO₂H), carbometoxi (CO₂Me) y metoxi (OMe) (D. B. Rodríguez-Amaya, 1999; Yaroshevich et al., 2015).

Con respecto a los grupos terminales moleculares, los carotenoides se pueden encontrar en formas acíclicas y cíclicas. Los carotenoides cíclicos incluyen

estructuras que contienen al menos un grupo ciclado y, más a menudo, están representados por un anillo de β -ionona. En la figura 3, se muestra al licopeno, una estructura general de un carotenoide acíclicos y al α y β caroteno estructuras cíclicas (Yaroshevich et al., 2015).

2.3.2. Funciones biológicas de los carotenoides

La principal función de los pigmentos carotenoides, tanto en vegetales como en bacterias, es captar energía luminosa y transferirla a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis (Fiedor y Burda, 2014; Meléndez-Martínez et al., 2004; Turcsi et al., 2016).

Los carotenoides poseen actividad antioxidante, su función incluye la captura de radicales como el oxígeno singlete, grupos tiol y también se ha asociado a procesos que involucran expresión génica y de diferenciación celular (Fiedor y Burda, 2014; Kulczyński et al., 2017), por lo que pueden aportar efectos beneficiosos en la prevención o alivio de diversos tipos de cánceres (pulmón, mama, cuello uterino, colorrectal y próstata) trastornos oculares (Kusmita et al., 2022; Murillo et al., 2010; Saini et al., 2020), además de su participación en la estimulación del sistema inmunológico, la modulación de las vías de señalización intracelular, la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Fiedor y Burda, 2014).

Entre las principales funciones de los carotenoides está su actividad provitamina A, varios de ellos se convierten metabólicamente en vitamina A (Chacón-Ordóñez et al., 2017; Chacón-Ordóñez y Esquivel, 2013; Weber y Grune, 2012). El β -caroteno

por su estructura tiene un mejor rendimiento en retinol. Estructuralmente, la vitamina A es la mitad de la molécula de β -caroteno con una molécula adicional de agua en el extremo de la cadena lateral. Así, el β -caroteno es una fuente importante de provitamina A, a la cual se le asigna un 100% de actividad (Carranco et al., 2011). Los carotenoides como β -caroteno, β -criptoxantina y α -caroteno, son las principales fuentes dietéticas de vitamina A (Zhang et al., 2019). En el mamey las principales fuentes dietéticas de vitamina A son la sapotexantina y la criptocapsina (figura 5) (Chacón-ordóñez et al., 2017).

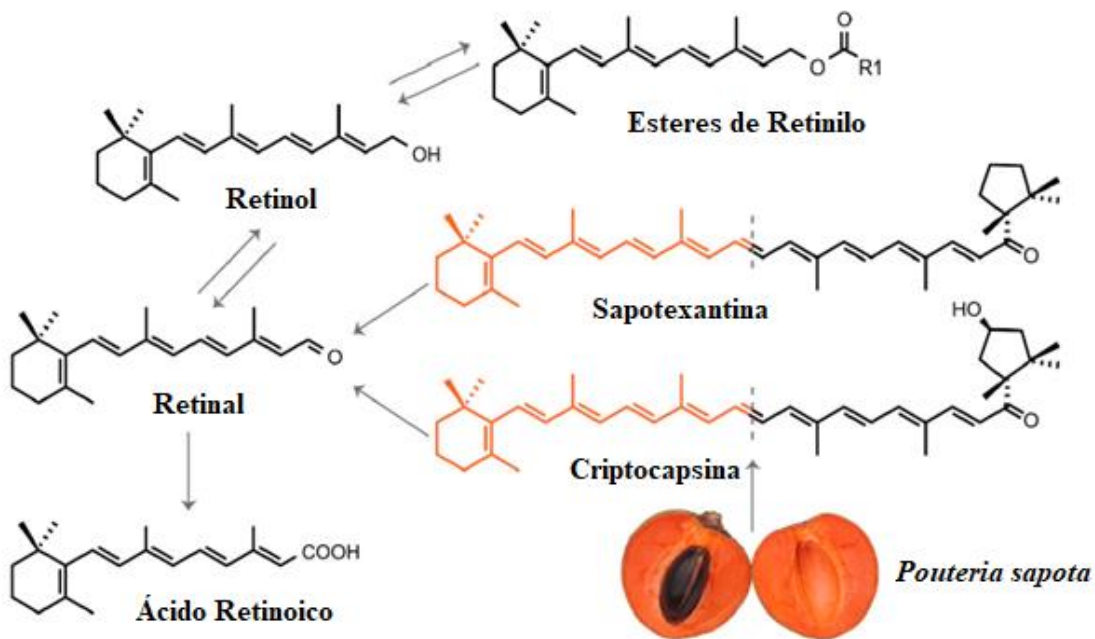


Figura 5. Carotenoides y su posible conversión a vitamina A

(Chacón-Ordóñez et al., 2017).

Los niños y las mujeres embarazadas tienen más probabilidades de sufrir deficiencia de vitamina A. La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que

la deficiencia de vitamina A (DAV) afecta a unos 190 millones de niños en edad preescolar y 19 millones de mujeres embarazadas, principalmente en África y el sudeste asiático (Nazrul et al., 2016).

Los carotenoides están relacionados también a la prevención de diversas enfermedades cardiovasculares (Zaghdoudi et al., 2015). Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de trastornos que son la principal causa de muerte en todo el mundo. La OMS estima que 17.3 millones de personas en todo el mundo murieron en 2008 debido a enfermedades cardiovasculares, lo que representa aproximadamente el 30% de todas las muertes (Kulczyński et al., 2017).

Dentro del grupo de carotenoides que se encuentran comúnmente en la dieta de los seres humanos, están la luteína y la zeaxantina (Figura 6). Estos carotenoides además de actuar como antioxidantes desempeñan un papel importante para la salud ocular, tanto la luteína como la zeaxantina se depositan selectivamente en la retina y previenen la degeneración macular asociada a la edad, principal causa de ceguera en humanos mayores de 60 años (Murillo et al., 2010).

Con la llegada de la pandemia por el COVID-19 causado por el virus SARS-CoV-2, se desarrollaron diferentes estrategias para su tratamiento, entre los cuales se pudo comprobar curiosamente, que dos de los apocarotenoides, la bixina y el ácido β -apo-8'carotenoico, ejercieron una notable actividad anti-SARS-CoV-2 (Bereczki et al., 2021). Se ha informado que los carotenoides alivian las respuestas inflamatorias que conducen al daño pulmonar durante la infección por COVID-19 (Khalil et al., 2021).

La vitamina A, también desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la morfología del epitelio, así como en la formación de una capa mucosa saludable del

tracto respiratorio y gastrointestinal, por lo se le considera importante en la lucha contra la infección por COVID-19 (Calcuttawala, 2022; Sherman, 1961).

2.3.3. Biosíntesis de carotenoides

La Biosíntesis de los carotenoides tiene lugar en los cloroplastos, en la figura 6, se presenta un esquema resumido de la biosíntesis de los carotenoides. Se inicia con la condensación del piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato para la obtención de 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) por medio de 2 enzimas 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXP) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2015). A partir de la reducción de la molécula de MEP se obtiene el hidroximetil butenil difosfato (HMBPP), esto origina a los isómeros pirofosfatos de isopentenilo (IPP) y el dimetil difosfato (DMAPP) (Chacón-Ordóñez y Esquivel, 2013).

A partir del pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el dimetil difosfato (DMAPP) se producen dos moléculas de geranyl geranyl difosfato (GGPP), catalizadas por la geranyl geranyl pirofosfato sintasa (GGPS). A continuación, dos moléculas de GGPP son condensadas en fitoeno por la fitoeno sintasa (PSY), posteriormente, el fitoeno es desaturado en licopeno por la ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y la fitoeno desaturasa (PDS), hasta formar licopeno (González Peña, 2021; Sun et al., 2020).

Terminada la condensación, inicia el proceso con la ciclación del licopeno, para la formación de α -caroteno (vía α) y β -caroteno (vía β), catalizado por las enzimas licopeno- ϵ (LYC- ϵ) y licopeno β -ciclase, (LYC- β), respectivamente. A partir de la vía

α es posible formar luteína por acción de la enzima anillo- ϵ hidroxilasa (CHY- ϵ), mientras que en la vía β , el β -caroteno es convertido a β -criptoxantina, catalizado por la enzima β -caroteno hidroxilasa (CHY- β), que a su vez también cataliza la conversión de este a zeaxantina. Por su parte, la zeaxantina puede ser transformada en violaxantina, reacción que es mediada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) y viceversa por la enzima violaxantina de epoxidasa (VDE). Por último, la violaxantina puede ser convertida en neoxantina por medio de la enzima neoxantina sintasa (NXS) (Antonio et al., 2021).

Biosíntesis de los carotenoides

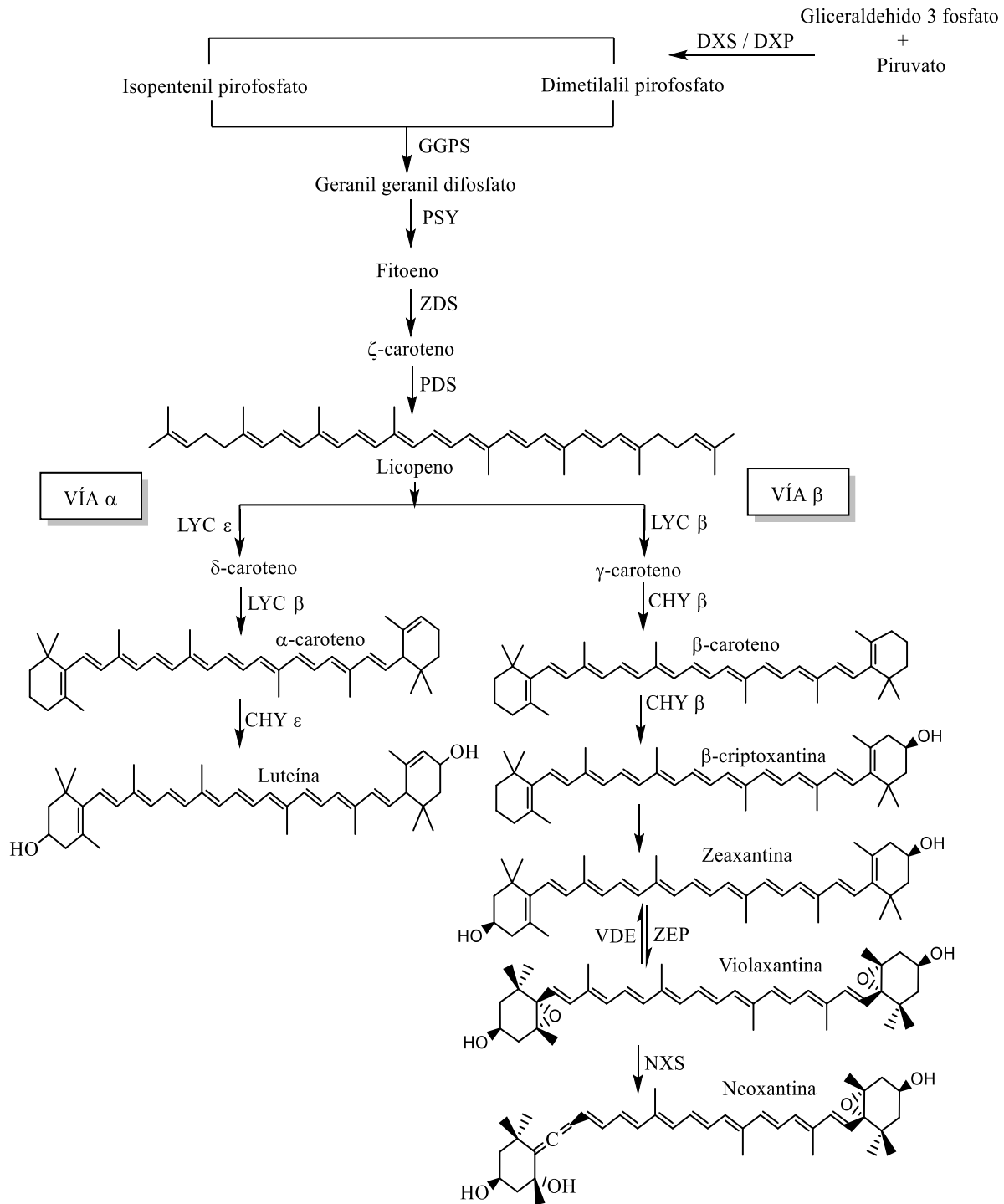


Figura 6. Ruta biosintética de los carotenoides.

(Chacón-Ordóñez y Esquivel, 2013).

2.3.4. Carotenoides en los alimentos

El licopeno es el principal pigmento de muchas frutas de pulpa rojas, como el tomate, sandía, papaya y guayaba roja. El ζ -caroteno generalmente acompaña al licopeno, pero está presente en niveles más bajos. El β -caroteno es el más extendido de todos los carotenoides en los alimentos, ya sea en menor cantidad o como el componente principal. Por ejemplo, el albaricoque, la zanahoria, mango, níspero. El α -caroteno y el γ -caroteno a veces acompañan al β -caroteno, las concentraciones generalmente mucho más bajas. Las mayores cantidades de α -caroteno se encuentran en la zanahoria y algunas variedades de zapallo (Beltrán et al., 2012).

Entre las xantofilas la β -criptoxantina es el pigmento principal de muchas frutas de pulpa anaranjada, como el melocotón, naranja, pulpa de papaya, tomate de árbol. La zeaxantina se encuentre en ciertos vegetales y en ciertas frutas amarillas o naranjas, como el maíz, nectarines, naranjas, papaya, zapallo. La luteína es el carotenoide predominante en las hojas, vegetales verdes y flores amarillas (Cepeda et al., 2014).

La astaxantina es el principal carotenoide de algunos peces, como el salmón y la trucha, y la mayoría de los crustáceos. Los carotenoides como equinenona, cantaxantina y tunaxantina son también importantes carotenoides del pescado. Existen carotenoides que se encuentran regularmente en algunas especies como son la capsantina y la capsorrubina, los pigmentos del pimiento rojo. Otros como la bixina lo encontramos en el achiote, y la crocetina, que es el principal componente del azafrán (Amaya-Rodríguez, 2001).

Por otra parte, Murillo y colaboradores lograron identificar carotenoides como la criptocapsina, la sapotexantina y la capsantina 5,6-epóxido como los principales carotenoides presentes en la pulpa del *Pouteria sapota*. Por otro lado, también se identificaron carotenoides menores, pero interesantes, que contienen el grupo del extremo κ con o sin un grupo hidroxilo y sus precursores (precursores 5,6-epoxi) (Murillo et al., 2016).

2.3.5. Variaciones del contenido de carotenoides durante el desarrollo del fruto

Los pigmentos son esenciales para que los frutos sean atractivos, se acumulan comúnmente en la cutícula durante el proceso de maduración, aunque muchos frutos climatéricos también acumulan pigmentos en el tejido de la pulpa durante la maduración postcosecha, a diferencia de los frutos no climatéricos (Martínez-González et al., 2017).

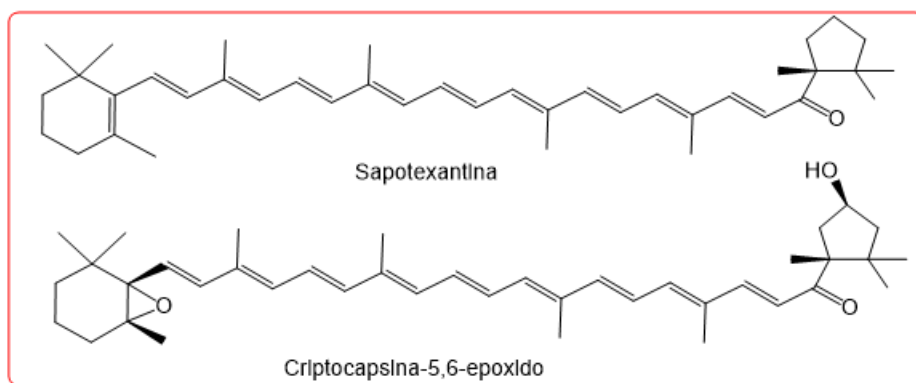
Los carotenoides a menudo llegan a su nivel más alto de concentración cuando los frutos están en su óptima madurez. Este dramático incremento de los carotenoides suele ir acompañado de un ablandamiento de los frutos y disminución de acidez y astringencia, que se traduce en una mejora en general de la palatabilidad (Rosas, 2011). En la mayoría de las frutas carotenogénicas, la maduración es acompañada de un aumento de la biosíntesis de carotenoides, la cual aumenta considerablemente los niveles de los carotenoides. (Rodríguez-Amaya, 1999), si bien parte de la intensificación del color de la fruta se debe a la pérdida de clorofila (Meléndez-Martínez et al., 2004).

2.3.6. Carotenoides identificados en el Mamey

Entre las especies de mamey solo se tiene información sobre los carotenoides de *Pouteria sapota*. Recientemente Murillo y colaboradores han publicado varios estudios en donde demuestran que el color de la pulpa de *Pouteria sapota*, se debe a la presencia de novedosos carotenoides con anillos κ (Murillo et al., 2016). En la naturaleza, generalmente el anillo κ de los carotenoides se encuentra hidroxilado, pero se han encontrado carotenoides con el anillo κ no hidroxilado (Murillo y Mclean y et al., 2010).

En experiencias realizadas por cromatografía HPLC-DAD-APCI-MS, se han detectado y caracterizados entre otros, carotenoides (Figura 7) como la sapotexantina, la criptocapsina, seis monoésteres de criptocapsina diferentes y un monoéster de criptocapsina 5,6-epóxido, los cuales se identificaron como carotenoides rojos. Además, β -criptoxantina 5,6-epóxido, y β -criptoxantina 5,8-epóxido, β -criptoxantina 5,6,5',6'-diepóxido y β -caroteno 5,8-epóxido, clasificados como carotenoides amarillos (Turcsi y Murillo y Kurta, 2015).

Rojos



Amarillos

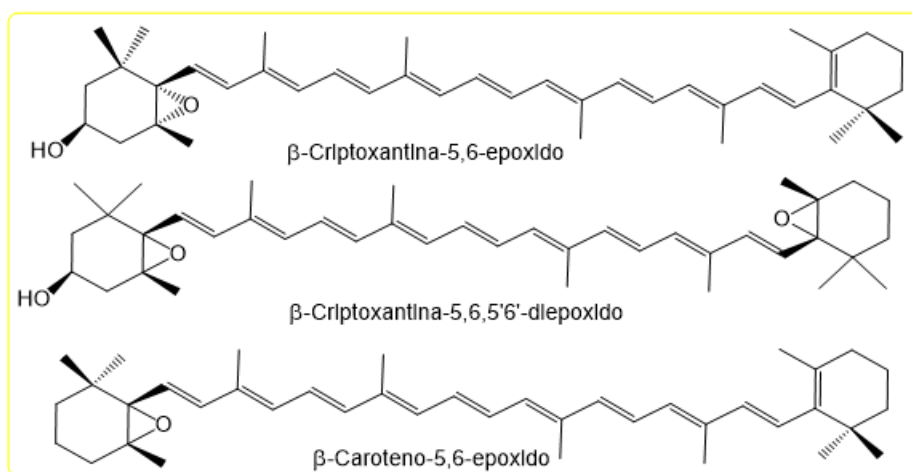


Figura 7. Algunos carotenoides rojos y los amarillos del mamey.

Recientemente utilizando pruebas químicas, fraccionamiento con cromatografía en columna y cromatografía HPLC-DAD-MS se detectaron un total 47 picos correspondientes a carotenoides, de los cuales 34 se identificaron plenamente. Los principales carotenoides identificados fueron criptocapsina, saptotexantina y capsantina 5,6-epóxido (Murillo et al., 2016).

También, se identificaron algunos componentes menores adicionales que contienen el anillo κ con o sin el grupo hidroxilo y sus precursores de 5,6-epoxi. Sin

embargo, no se ha logrado una identificación completa y extensa de los más de 40 carotenoides que comprenden el perfil cromatográfico del extracto de mamey rojo (*Pouteria sapota*), probablemente debido a la presencia de picos que se superponen posiblemente por las similitudes de polaridad que existen entre dichas sustancias (Nagy, 2016).

2.4 Análisis de Carotenoides

El procedimiento general de los análisis consiste en: I) extracción y partición con éter etílico y hexano; II) saponificación; III) cuantificación; IV) aislamiento y purificación de carotenoides; e V) identificación.

2.4.1 Extracción

Generalmente no existe un método estándar para la extracción de carotenoides en los laboratorios. Todos conllevan a la liberación de los componentes deseados de sus matrices mediante la interrupción de tejido, utilizando un solvente orgánico o una mezcla de varios solventes, seguido de la eliminación de los componentes no deseados por medio de una extracción líquido-líquido (Ishida y Chapman, 2012).

Diferentes disolventes orgánicos se han utilizado para la extracción de los carotenoides, regularmente, el hexano, es una buena opción para extraer los carotenoides no polares (carotenos o carotenoides esterificados), mientras que los disolventes polares, tales como etanol y acetona, son más apropiados para

carotenoides polares (xantofilas). Muchos investigadores usan la acetona como el solvente adecuado para la extracción de mezclas complejas de carotenoides. Otros solventes como metanol, éter de petróleo, éter dietílico, diclorometano, acetato de etilo, etanol y tetrahidrofurano son muy utilizados, además de una gran variedad de mezclas entre ellos (Amorim-Carrilho et al., 2014).

Recientemente, Murillo et al, extrajeron los pigmentos carotenoides de frutas nativas panameñas. Aproximadamente 10 g de muestra fueron extraídos inicialmente con metanol y luego con acetona hasta la desaparición del color. El extracto de acetona-metanol se concentró a un volumen aproximado de 25ml (en un rota evaporador a temperatura por debajo de 35° C) y luego se realizó extracción líquido-líquido añadiendo volúmenes iguales de una mezcla de éter y hexano (1:1) y agua (Murillo et al., 2013b).

2.4.2. Saponificación

Es un proceso muy importante, en el cual se desea eliminar la clorofila, que en muchos alimentos enmascara el color de los carotenoides. También se utiliza para hidrolizar la esterificación de una gran variedad de esteres de xantofilas que están presentes en muchos alimentos. Dependiendo de la naturaleza del carotenoide y el tipo de alimento, el procedimiento de saponificación puede variar (Jain et al., 2012).

Con frecuencia se utilizan concentraciones KOH metanólico al 10 % y se ha comprobado que da buenos resultados. En estudios recientes algunos autores han disminuido la concentración alcalina de hasta 0.02 M de KOH metanólico para

algunos alimentos y se han observado resultados similares que con concentraciones mayores. (Amorim-Carrilho et al., 2014). Para extractos de mamey Britton et al. utilizan soluciones de KOH metanólico al 5 %, obteniendo buenos resultados (Britton et al., 2011).

Sin embargo, se ha reportado que durante la saponificación puede ocurrir procesos de degradación de los carotenoides. (Giuffrida et al., 2015). El grado de degradación depende de las condiciones utilizadas, siendo mayor con una concentración más alta de álcali o el utilizar la saponificación en caliente (Mai et al., 2016). En algunos análisis realizados por Divya, Puthusseri, y Neelwarne encontraron que, durante la saponificación del extracto del cilantro, obtuvieron pérdidas de hasta el 30 y 50 % de los carotenoides, cuantificando antes y después de la saponificación, por lo que se recomiendan la utilización de un antioxidante como Butilhidroxitolueno (BHT), ácido gálico, entre otros, para minimizar las degradaciones de carotenoides durante el proceso de saponificación (Divya et al., 2012).

2.4.3. Cuantificación por Espectroscopía Ultravioleta-Visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que

pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la solución (Díaz et al., 2010).

Cuando la radiación electromagnética atraviesa un compuesto se producen transiciones electrónicas. La energía de la radiación UV-visible puede promover solamente transiciones de electrones de la capa de valencia (electrones en orbitales π). Así, por ejemplo, compuestos con dos dobles enlaces conjugados absorben a 217 nm, y a medida que aumenta el número de dobles enlaces conjugados, la energía disminuye y, por lo tanto, la longitud de onda aumenta, llegando hasta la región visible (400 nm a 760 nm). La parte de la molécula responsable de la absorción de radiación en las región UV-visible se conoce como cromóforo (Meléndez-martínez, 2017).

Los carotenoides en solución obedecen a la ley de Beer-Lambert, es decir, su absorbancia es directamente proporcional a la concentración. Por tanto, los carotenoides se cuantifican espectrofotométricamente, siempre que se disponga de coeficientes de absorción precisos en el disolvente deseado. En la tabla 3 se puede ver algunos coeficientes de absorción para algunos carotenoides (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004). El coeficiente de absorción ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) de un carotenoide varía notablemente en diferentes disolventes (Britton, G., Liaen, S - Jensen., Pfander, 1995).

Sin embargo, algunos coeficientes de absorción ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) son difíciles de obtener. El procedimiento normalmente implica pesar una pequeña cantidad del carotenoide, normalmente de 1 a 2 mg, con una precisión de $\pm 0,001$ mg. El carotenoide debe estar absolutamente libre de todos los contaminantes, incluido el disolvente residual (Amaya-Rodriguez, 2001).

Tabla 3. Coeficientes de absorción (A1%1cm) de carotenoides comunes.

(Amaya-Rodriguez, 2001).

Carotenoides	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$, nm	(A ^{1%1cm})
Bixina	Éter de petróleo	456	4200
Capsorubina	Benceno	489	2200
α-Caroteno	Éter de petróleo	444	2800
	Hexano	445	2710
β-Caroteno	Éter de petróleo	450	2592
	Etanol	450	2620
α-Criptoxantina	Hexano	445	2636
β-Criptoxantina	Éter de petróleo	449	2386
	Hexano	450	2460
Luteína	Etanol	445	2550
	Éter dietílico	445	2480
Lycopeno	Éter de petróleo	470	3450
Neoxantina	Etanol	438	2470
	Etanol	439	2243
Violaxantina	Etanol	440	2550
	Acetona	442	2400
Zeaxantina	Éter de petróleo	449	2348
	Etanol	450	2480
	Etanol	450	2540
	Acetona	452	2340

La cuantificación espectrofotométricamente de los carotenoides, conforme la ley de Beer, pueden calcularse según la fórmula, (Amaya-Rodriguez, 2001):

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Absorción por volumen (mL)} \times 10^6}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \times 100 \times \text{peso de la muestra (g)}}$$

Para la cuantificación de los carotenoides individuales presentes en una mezcla, se debe realizar inicialmente una separación adecuada de sus componentes, preferiblemente mediante cromatografía HPLC. La cuantificación se hace fácil cuando se obtienen cromatogramas con buena resolución, que es cuando se logra una buena separación. La linealidad de respuesta suele ser bastante buena y el área o la altura del pico son proporcionales a la cantidad del componente (Britton, G., Liaaen, S - Jensen., Pfander, 1995).

La ley de Beer puede extenderse a muestras que contienen varios componentes absorbentes siempre que no haya interacciones entre los componentes. Las absorbancias individuales son aditivas. El análisis de dos o más componentes en la misma muestra es sencillo si hay regiones en el espectro de la muestra en las que cada componente es la única especie absorbente (Harvey, 2000). En este caso se puede analizar cada componente como si fuera la única especie en solución, según la ecuación 1.

$$(A_m)_\lambda = (\epsilon_X)\lambda_1 b C_X + (\epsilon_Y)\lambda_1 b C_Y \quad \text{Ecuación 1}$$

La absorbancia en una longitud de onda no proporciona información suficiente para determinar concentraciones de X o Y. Es por esto por lo que se mide la absorbancia en una segunda longitud de onda, λ_2 , según la ecuación 2.

$$(A_m)_\lambda = (\epsilon_X)\lambda_2 b C_X + (\epsilon_Y)\lambda_2 b C_Y \quad \text{Ecuación 2}$$

Las concentraciones de X o Y, se pueden determinar resolviendo las ecuaciones 1 y 2. Por supuesto, es necesario determinar valores de ϵ para cada componente en ambas longitudes de onda. En general, para una mezcla de n componentes, la absorbancia debe medirse a n longitudes de onda diferentes (Harvey, 2000). Esto puede ser aplicado a muestras que contienen una gran variedad de carotenoides, por ejemplo, el mamey.

2.4.4. Aislamiento y purificación de carotenoides

El sistema de dobles enlaces conjugados de los carotenoides es el principal responsable de la mayoría de sus propiedades, como el color, además de la susceptibilidad a degradaciones por exposición a la luz, ácidos y a altas temperaturas. Es necesario tomar una serie de precauciones para minimizar transformaciones no deseadas de los mismos durante su manejo en el laboratorio, ya que éstas conducirían a resultados erróneos (Meléndez-Martínez, 2017).

Entre las técnicas más usadas para la separación de carotenoides están la cromatografía en columna y la cromatografía en capa delgada, sin embargo, presentan algunas desventajas como la exposición de la muestra a la luz y las grandes cantidades de muestra que se requieren, por lo tanto, es conveniente emplear otras técnicas que sean más rápidas, que permitan controlar las condiciones de separación para disminuir

la degradación de estos compuestos, y que requieran menores cantidades de extracto para el análisis (Oliver y Palou, 2000).

2.4.4.1. Cromatografía en columna abierta

Método tradicional para separar aislar y purificar estos pigmentos. Puede ser por gravedad o ayudando al flujo con vacío. Las fases estacionarias más comúnmente usadas en cromatografía de columna son el MgO: Hiflosupercel en varias proporciones y la alúmina. La sílice no es recomendada porque su acidez inherente puede causar degradación o isomerización de los carotenoides. Los solventes, más utilizados son el éter de petróleo o hexano, con porcentajes crecientes de éter etílico y acetona (Provesi et al., 2011).

La separación es seguida visualmente. Este método presenta la desventaja de que hay exposición a la luz y al aire, por lo que se puede generar poca reproducibilidad además de depender de la habilidad y experiencia del analista, particularmente en su destreza en empacar la columna (Su et al., 2002).

2.4.4.2. Cromatografía semi preparativa

La técnica HPLC semi-preparativa es una de las principales técnicas utilizadas para la purificación de productos naturales. Se han desarrollado numerosas técnicas cromatográficas para la separación a escala preparativa y semi-preparativa de productos naturales. Aunque, es muy utilizada la cromatografía de columna para este

fin, el procedimiento HPLC semi-preparativa proporciona una alta resolución cromatográfica. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es generalmente el paso de purificación final, ya que tiene un mayor poder de separación (Queiroz et al., 2019).

La separación “Semi-preparativa” es un término que se aplica a columnas de 8-16 mm de diámetro interno, a menudo empaquetadas con partículas de 10 μm , y útil para la separación de cantidades de mezcla de 1 a 100 mg (Décosterd et al., 1987). Por medio de la separación cromatográfica semi-preparativa se pueden separar y recolectar carotenoides o fracciones de ellos (mezclas de carotenoides), para su posterior análisis.

2.4.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución

La determinación de la composición de carotenoides en extractos naturales o en muestras de alimentos es bastante importante, pero su variabilidad estructural dificulta sustancialmente el análisis. El método más común utilizado para el análisis de carotenoides es la cromatografía líquida de alta resolución que emplea principalmente detección UV/vis (Turcsi et al., 2016).

En particular, la fase reversa con fases estacionarias C18 y C30 se ha empleado ampliamente para lograr la separación de moléculas que difieren en hidrofobicidad dentro de una clase estructural dada (Cacciola et al., 2016b).

La fase estacionaria (C18) es la más utilizada y eficiente para la separación cromatográfica de fase inversa. Sin embargo, tienen una pobre resolución de los isómeros geométricos cis-trans. Las columnas C30 han demostrado ser más eficientes para separar isómeros geométricos y muestras más complejas de carotenoides. Las limitaciones en la aplicación de columnas C30 son sus largos análisis generalmente 60-100 min, a diferencia de 10-25 min para columnas C18 (Britton, 2009).

Referente a las fases móviles para el análisis de los carotenoides, las más utilizadas acetoneitrilo y metanol. Muchas veces se le añade un pequeño porcentaje de un disolvente menos polar como un modificador del disolvente primario para obtener la retención deseada, para aumentar la solubilidad de los analitos y para mejorar la resolución. Entre los más utilizados están diclorometano, THF, MTBE, acetato de etilo, hexano, acetona, cloroformo y agua (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

2.4.5. Identificación por Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

El espectro absorción UV-vis considerada la primera herramienta principal de diagnóstico para la identificación de carotenoides, así como la cromatografía comparativa con estándares (Rojas-Garbanzo et al., 2011).

Para llevar a cabo la identificación es necesario comparar las posiciones de los máximos de absorción y la forma del espectro con los estándares adquiridos comercialmente o aislados de diferentes muestras naturales. El detector más usado para el análisis por cromatografía líquida es el de arreglo de diodos, monitoreando a una longitud de onda de 450 nm donde se presenta la máxima absorción de estos compuestos (Mazzeo et al., 2011).

Muchos carotenoides presentan máxima absorción en tres longitudes de ondas diferentes, resultando en tres picos en el espectro. El espectro de absorción de los carotenoides depende marcadamente de los solventes empleados para realizar la lectura (Britton, G., Liaaen, S - Jensen., Pfander, 1995)

A medida que aumenta el número de dobles enlaces conjugados, λ_{\max} cambia a longitudes de onda más largas. Por tanto, el carotenoide acíclico más insaturado, el licopeno, con 11 dobles enlaces conjugados, es rojo y se absorbe en las longitudes de onda más largas (λ_{\max} a 444, 470, 502 nm). El ζ -caroteno (amarillo claro), que también es acíclico, también tiene tres picos bien definidos, pero a longitudes de onda mucho más bajas (λ_{\max} a 378, 400, 425 nm), proporcional a siete dobles enlaces conjugados (D. Rodriguez-Amaya y Kimura, 2004).

En la figura 8 se puede observar la estructura y el espectro UV-Visible obtenidos por HPLC-DAD en MeOH/MTBE, de epóxidos de β -caroteno (Meléndez-martínez, 2017). Se puede observar cómo varían los máximos de absorción en el 5,6-epoxi- β -caroteno con respecto al 5,6:5',6'-diepoxi- β -caroteno y el 5,8-epoxi- β -caroteno.

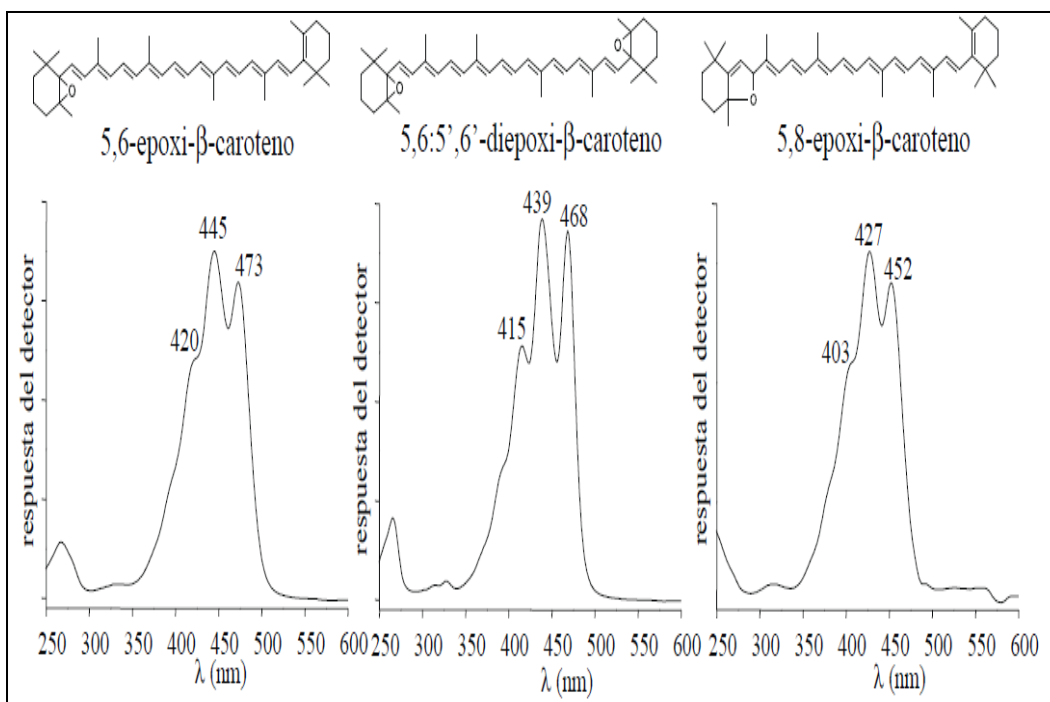


Figura 8. Identificación de carotenoides por UV-Vis.

(Meléndez-martínez, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

El mamey es un término utilizado para identificar los frutos de las especies *Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* y *Pouteria fossicola*. Es nativa de Panamá, Centro América, México y algunas islas del caribe. Estas frutas se encuentran distribuida por todo el país (Solano Rivera, 1999).

El color de la pulpa que va desde el naranja a rojo, se le atribuye a la gran cantidad de carotenoides presentes en el (Murillo et al., 2013b). Existen evidencias que indican que los carotenoides tienen un poderoso efecto antioxidante y son esenciales para nuestra salud, ya que protegen las células y fortalecen nuestro sistema inmune, al igual que contribuyen a la disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y cataratas (Fiedor y Burda, 2014; Jatunov et al., 2010; Kusmita et al., 2022). De igual forma amplias fuentes han demostrado que el mamey posee una gran variedad de carotenoides con potencial de actividad provitamina A (Chacón-Ordóñez et al., 2017; Weber y Grune, 2012).

No existen estudios sobre los carotenoides presentes en las especies *Pouteria fossicola* y *Pouteria viridis*. Por otro lado, tampoco existen estudios de los cambios de los carotenoides durante la maduración de las tres especies de mamey, lo cual es muy importante para el manejo post cosecha de estas frutas. Por tales motivos este será el primer estudio sobre la composición de carotenoides de variedades de *Pouteria fossicola* y *Pouteria viridis* y los cambios que ocurren durante la maduración.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

- 4.1.1 Optimizar las técnicas para el análisis de los carotenoides del mamey.
- 4.1.2 Separar, cuantificar e identificar los carotenoides de tres especies de mamey (*Pouteria sapota*, *Pouteria viridis* y *Pouteria fossicola*), variedades nativas de Panamá y evaluar los posibles cambios en el contenido de carotenoides y azúcar durante la maduración.

4.2. Objetivos específicos:

- 4.2.1. Evaluar el efecto de la adición de un antioxidante en la saponificación de los carotenoides del mamey.
- 4.2.2. Optimizar el procedimiento para cuantificar los carotenoides totales en base a violaxantina (amarillos) y en términos de criptocapsina (rojos) en extractos de mameyes.
- 4.2.3. Desarrollar un procedimiento Combinando HPLC-C18 semipreparativa y HPLC-C30 analítica en el análisis de carotenoides.
- 4.2.4. Comparar el perfil vs la cantidad de carotenoides en mameyes maduros.
- 4.2.5. Evaluar los cambios en los carotenoides del mamey durante la maduración
- 4.2.6. Comparar el perfil de carotenoides a diferentes estados de maduración.
- 4.2.7. Evaluar el perfil de carotenoides presente entre especies de mamey.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y equipos.

5.1.1 Equipos

Bomba al vacío, Gast. Modelo 1H4B-25-M100x, espectrofotómetro Shimadzu UV-1203, cromatógrafo HPLC Hewlett Packard modelo 1050 DAD, columna Spherisob C18 ODS2 semipreparativa, columna YMC C30 de sílica de 5 μ g de diámetro interno, rotaevaporador, Heidolph-Labrota 4000, ubicados en la Universidad de Panamá. Cromatógrafo HPLC-DAD Agilent 1200, espectrofotómetro UV/Vis Spectronic, Mod. Genesys 5, rotaevaporador Buchi R-210, ubicados en la Universidad Tecnológica de Panamá.

5.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron: diclorometano grado HPLC (Merck), Acetonitrilo grado HPLC (Scharlau), Éter dietílico grado reactivo (Merck), Hidróxido de potasio grado reactivo (J.T. Baker), Ácido sulfúrico (J.T. Baker), Glucosa grado reactivo (Merck), Acetona grado reactivo (Tedia), Metil terbutil éter grado HPLC (Tedia), Metanol grado HPLC (Tedia), Nitrógeno gaseoso (Aceti-oxígeno), Hexano grado reactivo (Scharlau), fueron costeados por medios propios. El Butilhidroxitolueno (BHT) grado reactivo (Merck), fue suministrado por el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad de Panamá.

5.2 Muestra de especies y variedades de mamey

Las muestras de las diferentes especies y variedades de mamey fueron colectadas por nosotros y por estudiantes la Escuela de Química de la Universidad de Panamá, procedentes de diferentes regiones del país (Panamá Oeste, Colon, Coclé, Veraguas, Herrera, Darién y Panamá) Para el estudio escogimos árboles con frutos de características diferentes (peso del fruto, forma, color de la pulpa y color de la piel). Para mayor orden y comprensión estas muestras fueron codificadas con las dos primeras iniciales de las especies (*Pouteria sapota*: PS-, *Pouteria viridis*: PV- y *Pouteria fossicola*: PF-) seguida con el número dado después de la obtención o recolección, que representa una variedad de esa especie. La figura 8 presenta un ejemplo en la diversidad de la gran variabilidad morfológica entre frutos de mamey.

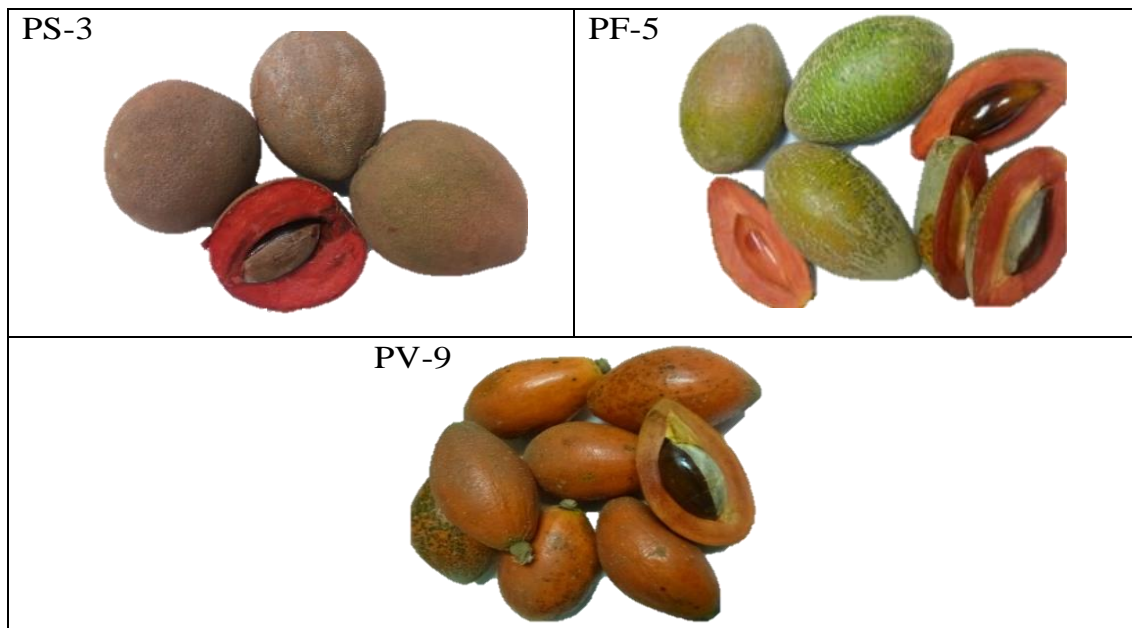


Figura 9. Variabilidad morfológica entre frutos de mamey.

5.3 Extracción de carotenoides

Los carotenoides fueron extraídos de la pulpa los mameyes, utilizando esencialmente el procedimiento recomendado por Britton, et al., 1995. Aproximadamente 25 g de pulpa homogenizada (pesados con exactitud), fueron inicialmente extraídos con 75 mL de metanol y el residuo re-extraído varias veces con 50 mL de acetona, hasta no observar color en el extracto (en cada etapa se filtra al vacío para recuperar el residuo).

El extracto combinado, fue concentrado por evaporación al vacío (figura 10), hasta aproximadamente 100 mL y los carotenoides pasados a una fase orgánica apolar, adicionando un volumen de éter dietílico: n-hexano (1:1), seguido de un volumen de agua y agitando gentilmente, para prevenir la formación de emulsión. Se dejó reposar hasta la separación de dos capas, se recuperó la superior que contiene los carotenoides, concentrándola por evaporación al vacío (figura 10), hasta aproximadamente 15 mL. Este extracto rico en ésteres de carotenoides se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para continuar el análisis. En la figura 11 se presenta un ejemplo de la separación de la fase rica en carotenoides.



Figura 10. Concentración del extracto cetónico.

La cantidad de pulpa y volumen del extracto de carotenoides varían dependiendo del objetivo del análisis. Los extractos utilizados para el fraccionamiento por HPLC contaron con un total aproximado de 25 g de muestra. Para los extractos usados para definir el total de carotenoides a diferentes estados de maduración y variabilidad contaron con un total de muestra de entre 2 a 10 gramos.



Figura 11. Partición con una mezcla de éter dietílico: n-hexano (1:1).

5.4. Cuantificación de los carotenoides totales

Se utilizó el procedimiento descrito por Britton, et al., 1995. Brevemente, el procedimiento consistió en secar una alícuota del extracto etéreo bajo atmósfera de N_2 , reconstituirla en 2 mL de etanol y leer la absorbancia a 440 y 510 nm procurando obtener una lectura entre 0.8-0.2 unidades de absorbancia. En los casos donde la absorbancia fue mayor a 0.8, la solución se diluyó.

5.4.1. Determinación espectrofotométrica de multicomponentes

La pulpa de mamey es una muestra compleja de carotenoides que van del color amarillo al rojo. Por tal motivo, la lectura espectrofotométrica a 450nm, que es adecuada para carotenoides amarillos, subestima la concentración de los carotenoides rojos. Con la finalidad cuantificar espectrofotométrica, simultáneamente los carotenoides rojos y amarillos, aplicamos el procedimiento sugerido por Harvey, para la determinación multi-componentes (Harvey, 2000). Para esto, utilizamos los coeficientes de extinción de violaxantina (amarillos, 440 nm) y criptocapsina (rojos, 510nm).

Los coeficientes de extinción violaxantina y criptocapsina a 440 y 510 nm en etanol no aparecen reportados por lo que fue necesario determinarlos de forma experimental. Para la criptocapsina en benceno a 483nm el coeficiente de extinción es de 2072 y para la violaxantina en etanol y hexano a 440nm el coeficiente de extinción es de 2550. Se determinó la absorbancia a la solución de criptocapsina a 483nm en benceno, Luego la muestra se evaporó, se reconstruyó con etanol y se tomó la lectura de la absorbancia a 440 y 510 nm. Para la violaxantina se tomaron lecturas a 440 y 510 nm en etanol. Utilizando la Ley de Lambert-Beer aplicada a muestras con multi-componentes se determinaron los coeficientes de extinción en etanol a 440 y 510 nm para la violaxantina y la criptocapsina respectivamente.

5.4.2 Carotenoides rojos y amarillos vs carotenoides totales a 450 nm.

Como indicamos en la sección anterior, en este estudio desarrollamos un procedimiento novedoso para determinar la concentración de carotenoides rojos y amarillos en el mamey. Para confirmar la ventaja de este procedimiento, comparamos los valores obtenidos con las lecturas de absorbancia a 440 y 510 nm, con los valores obtenidos por el método tradicional, en donde se determinan los carotenoides totales por lecturas de absorbancia a 450nm y los resultados se expresan como equivalentes de β -caroteno. Para determinar la concentración de carotenoides a 450 se utilizó el procedimiento descrito por Britton, et al., 1995, el cual consistió en secar una alícuota del extracto etéreo bajo atmósfera de N_2 , reconstituirla en 2 mL de etanol y leer la absorbancia a 450.

$$C(x) = \frac{AxVx10^6 xf}{2500x100xP}$$

A = Absorbancia de la solución de carotenoide.

V = Volumen de la solución conteniendo el carotenoide.

C(x) = Concentración del analito expresada en $\mu\text{g/g}$.

P = Peso de la muestra, expresado en g.

f = Factor de dilución.

5.5. Saponificación

En el extracto de carotenoides, estos se encuentran principalmente como ésteres y deben hidrolizarse para ser separados en forma libre, por HPLC. En este caso, utilizamos el procedimiento recomendado por Rodríguez-Amaya, con ligeras

modificaciones (Amaya-Rodríguez, 2001). El extracto se colocó en un tubo de ensayo, se evaporó en una corriente con N₂, se reconstituyó en 5 mL de una solución al 0.1 % de BHT en éter dietílico, se adicionaron 5 mL de KOH 5% metanólico y se dejó en reposo en oscuridad durante 2 horas. El extracto saponificado se colocó en un embudo de separación, se mezcló con 20 mL de éter dietílico, se adicionaron 20 mL de agua destilada, se agito y se dejó reposar para la separación de dos fases. La fase superior (orgánica) que contiene los carotenoides libres se lavó 4 veces con agua destilada para eliminar el exceso álcali. Los extractos se guardaron a refrigeración hasta su posterior análisis.

5.6. Cuantificación de Carotenoides totales para HPLC semipreparativa

Para esta sección se utilizaron los extractos de las muestras obtenidas en la sección 5.3. El extracto fue colocado en un matraz volumétrico de 25 mL y se aforo con n-hexano. De este extracto se tomó 1 mL se cuantificó con el procedimiento descrito anteriormente de multicomponente descrito en la sección 5.4.1.

Después de cuantificada la muestra, se agregó en un tubo de ensayo una alícuota que contuviera aproximadamente 500 µg de carotenoides. Esta alícuota se saponificó según el procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.5. Luego el extracto de carotenoides saponificado fue cuantificado utilizando el procedimiento descrito en la sección 5.4.1.

5.7. Combinación de HPLC semipreparativa C18 con HPLC Analítica C30

Las muestras previamente saponificadas y cuantificadas (sección 5.5 y sección 5.41), fueron analizadas por HPLC semi-preparativa. Cada extracto fue evaporado en una corriente de nitrógeno y reconstituida en 400 μL de una mezcla de acetonitrilo 70% y 30 % de diclorometano. Inyectamos 200 μL de la muestra bajo condiciones específicas (Flujo: 2.5mL/min; Columna C18 semi preparativa. Fase móvil: 82 % - Acetonitrilo, 13 % - diclorometano, 5 % metanol) en un HPLC Agilent 1200 y recolectamos 8 fracciones ya definidas en tubos de ensayos debidamente rotulados. Los 200 μL de la muestra restantes se inyectaron y se recolectaron las 8 fracciones en los mismos tubos que contienen las fracciones anteriores. (Ver figura 12).

5.8. Separación cromatográfica de cada fracción

Se cuantificó cada una de las fracciones recolectadas, a 440 y 510 nm. Se evaporó cada fracción y se le agregó un volumen pequeño (0.3 a 0.5 mL) de metil terbutil éter; metanol 1:1. Se inyectaron 10 μL de la muestra bajo condiciones específicas; Flujo: 1.0 mL/min; Columna analítica (250 \times 4.6 mm; YMC C30, 5 μm). Fase móvil: Disoluciones: (A) metanol: MTBE: H₂O (81:15:4); (B) metanol: MTBE: H₂O (6:90:4). La cromatografía por gradiente de 100% del disolvente A y cero de B a 100% B en 90 min. En un tiempo de corrida de 45 min. (Ver figura 12).

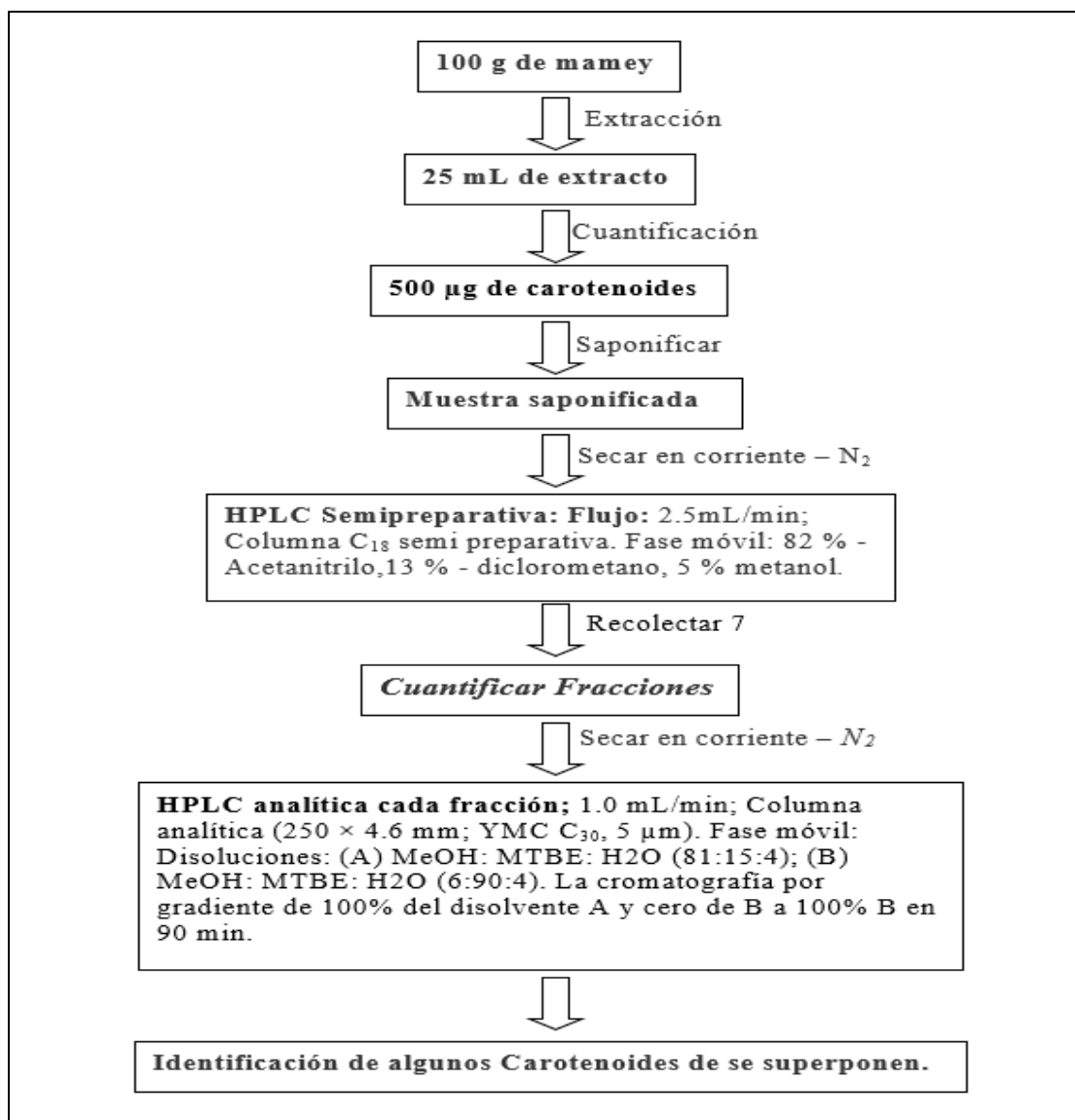


Figura 12. Esquema de fraccionamiento de los extractos de carotenoides.

5.9. Identificación de los carotenoides del mamey

La identificación se llevó a cabo utilizando los tiempos de retención y los espectros de absorción de cada carotenoide, comparado con los encontrados en la literatura y los almacenados en nuestra biblioteca del HPLC Chem Station de carotenoides

identificados del mamey en estudios previos (Agócs et al., 2018a; Murillo, 2018b; Murillo et al., 2011).

5.9. Determinación del contenido de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó siguiendo el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico siguiendo en método recomendado por Suzanne Nielsen (López-Legarda et al., 2017). Se pesaron aproximadamente 2 gramos con exactitud de muestra, a esta se realizaron extracciones consecutivas con tres concentraciones diferentes de metanol en agua (20%, 15% y 10% (v/v)) respectivamente, uniendo los extractos en un tubo de ensayo de 70 mL. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Se preparó una dilución 1 en 1000 para cada una de las disoluciones. De esta última disolución se tomaron en tubos de ensayos alícuotas de 0.5, 1.5 y 2.0 mL y se le agregó agua (de ser necesario) hasta tener en cada uno de los tubos un volumen de 2 mL.

A cada tubo de ensayo se le agregó 1 mL de fenol y 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Los tubos de ensayos se dejaron reposar en baño de agua por un tiempo de 20 minutos y luego se tomaron las lecturas de las absorbancias a una longitud de onda de 490 nm. Se construyó una curva de calibración en términos de µg de glucosa/mL vs absorbancia, y con ayuda de esta se determinaron las concentraciones.

5.10. Análisis estadístico de los datos

Los datos de efecto antioxidante (BHT) en la saponificación, contenido de carotenoides totales y contenido de azúcares totales de diferentes especies y variedades de mamey fueron analizados estadísticamente con el programa de Excel (versión 365).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización de las técnicas para el análisis de los carotenoides del mamey

El análisis de los carotenoides al mamey puede resultar complicado por diferentes dificultades analítica que nos podemos encontrar durante la extracción de estos, como son la exposición de álcalis durante la saponificación (Giuffrida et al., 2015) o por la complejidad de la muestra que obstaculice la separación cromatográfica. Por tal motivo en este estudio tratamos de optimizar algunos parámetros.

6.1.1. Uso de antioxidante en la saponificación

Generalmente, el estudio de los carotenoides se lleva a cabo después de una saponificación, para liberar las xantofilas, eliminando los lípidos y destruyendo las clorofilas y facilitar el análisis. Sin embargo, se ha reportado que durante la saponificación puede ocurrir procesos de degradación de los carotenoides (Britton, 2009). Por lo tanto, algunos autores recomiendan el uso de sustancias antioxidantes como el Butil-hidroxi-tolueno (BHT), ácido gálico, entre otros (Giuffrida et al., 2015).

En la tabla 4, se puede observar el efecto del antioxidante BHT (Butil-hidroxi-tolueno) sobre el contenido de carotenoides durante la saponificación. En este experimento, se demuestra que el BHT disminuye las pérdidas de carotenoides durante la saponificación, se observó que las pérdidas se reducen significativamente

de 13.47 % (sin BHT) a 5.38 % (con BHT). Estudios de Amaya demostraron que el pirogalol también previene la oxidación de carotenoides durante la saponificación (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Tabla 4. Muestra PS-36 con y sin antioxidante durante la saponificación.

Muestra PS-36	No Saponificada (µg/g)	Saponificada sin BHT (µg/g)	Pérdida (%) sin BHT	Saponificada con BHT (µg/g)	Pérdida (%) con BHT
1	337.96	290.23	14.12	319.98	5.32
2	337.96	292.49	13.45	323.20	4.37
3	337.96	294.70	12.80	321.15	4.98
4	337.96	290.33	14.10	316.68	6.30
5	337.96	290.74	13.97	316.95	6.22
6	337.96	292.60	13.42	319.57	5.44
7	337.96	298.42	11.70	319.83	5.36
8	337.96	290.00	14.19	320.74	5.10
X ± SD	337.96	292.44 ± 2.91	13.47 ± 0.86	319.76 ± 2.14	5.38 ± 0.63

X = promedio; SD = Desviación estándar

6.1.2 Comparación de dos métodos espectrofotométricos en la determinación de carotenoides totales

En tabla 5 se puede observar cómo varían las cantidades de carotenoides cuantificadas a una sola longitud de onda de 450 nm, con las calculadas a 2 longitudes de onda 440 y 510 nm. Estas diferencias se deben, a que el método tradicional se basa en el uso de β-caroteno como el carotenoide patrón, pero en muestras con alto contenido de carotenoides con coeficientes de extinción muy diferentes al β-caroteno, como es el caso del mamey, este método subestima el contenido de carotenoides (Harvey, 2000). En casos como este, no es conveniente cuantificar leyendo a una sola

longitud de onda, ya que los carotenoides que contiene la muestra poseen cromóforos muy diferentes.

En el mamey la mayoría de los carotenoides son epóxidos (amarillos) y ceto- κ (rojos), por tal motivo, decidimos utilizar violaxantina como patrón para cuantificar los amarillos y criptocapsina como patrón para cuantificar los rojos.

En la tabla 5 se puede observar, que el contenido total de carotenoides evaluado por lectura a 450 nm es menor en todas las muestras comparadas, por tal motivo en adelante utilizamos la lectura a dos longitudes de onda para cuantificar los carotenoides totales en muestras de mamey rojo.

Tabla 5. Carotenoides expresados como β -caroteno y como amarillos y rojos.

Muestra	Amarillos (440 nm)		Rojos (510 nm)		Total	β-caroteno (450 nm)
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
PS-1	43.29	58.87	30.24	41.13	73.53	65.82
PS-2	35.09	49.61	35.65	50.39	70.74	58.71
PS-3	68.65	46.01	80.57	53.99	149.21	129.60
PS-4	118.45	54.01	100.87	45.99	219.32	190.76
PS-5	20.01	41.99	27.65	58.01	47.66	40.88
PS-6	102.30	51.37	96.86	48.63	199.16	170.24
PS-7	49.59	47.48	54.86	52.52	104.45	82.74
PS-8	20.70	47.16	23.19	52.84	43.89	37.53
PS-9	58.34	58.58	41.25	41.42	99.59	85.74
PF-1	77.65	52.04	71.56	47.96	149.21	131.03
PS-10	96.55	47.21	107.99	52.79	204.54	172.80
PS-11	69.55	66.96	34.32	33.04	103.88	96.33
PS-12	144.81	60.36	95.10	39.64	239.92	215.06
PS-13	30.75	62.82	18.21	37.18	48.96	43.56
PS-14	170.68	53.91	145.90	46.09	316.58	279.19
PS-15	49.70	75.21	16.38	24.79	66.08	62.39
PS-16	67.18	46.55	77.15	53.45	144.34	122.58
PS-17	26.55	66.33	13.48	33.67	40.02	36.06
PS-18	93.73	59.64	63.44	40.36	157.17	138.95

6.1.3. Combinación de HPLC-C18 semipreparativa y HPLC-C30 de la muestra PS-19

En la separación HPLC utilizando una columna C18 se hace muy difícil separar grupos de carotenoides, lo que hace prácticamente imposible la utilización de esta columna para el análisis de carotenoides (Amorim-Carrilho et al., 2014). En los últimos años las columnas cromatográficas C30 de fase reversa han demostrado una gran capacidad para separar carotenoides con polaridades similares incluyendo los isómeros geométricos (E, Z) (Agócs et al., 2018c; Murillo, 2018a). Sin embargo, los carotenoides del mamey resultan una mezcla muy compleja donde se superponen varios carotenoides en un pico (Cacciola et al., 2016b). Por tal motivo, desarrollamos un procedimiento donde combinando la separación de fracciones por HPLC-C18 semipreparativa con la separación por HPLC-C30 analítica, así de esta forma, tratar de separar los carotenoides que se superponen utilizando solo HPLC-C30 analítica. Con este procedimiento se estudiaron 20 extractos de mamey diferentes, como ejemplo a continuación presentamos lo desarrollado con la muestra PS-19.

6.1.3.1. Combinación de HPLC-C18 semipreparativa y HPLC-C30 analítica en el análisis de carotenoides.

La separación por HPLC-C18 semipreparativa para los extractos de mamey se observaron picos muy abultados y menos definidos, en cambio por HPLC-C30 analítica logramos obtener una mejor separación de varios de los carotenoides, aunque

nos encontramos que hay algunos carotenoides que se superponen por polaridades, dando como resultado algunas mezclas.

En la figura 13 se observa el cromatograma por HPLC-C18 semipreparativa de la separación de los carotenoides de la muestra de mamey. Las fracciones obtenidas se ilustran en los tubos de ensayos debajo del cromatograma.

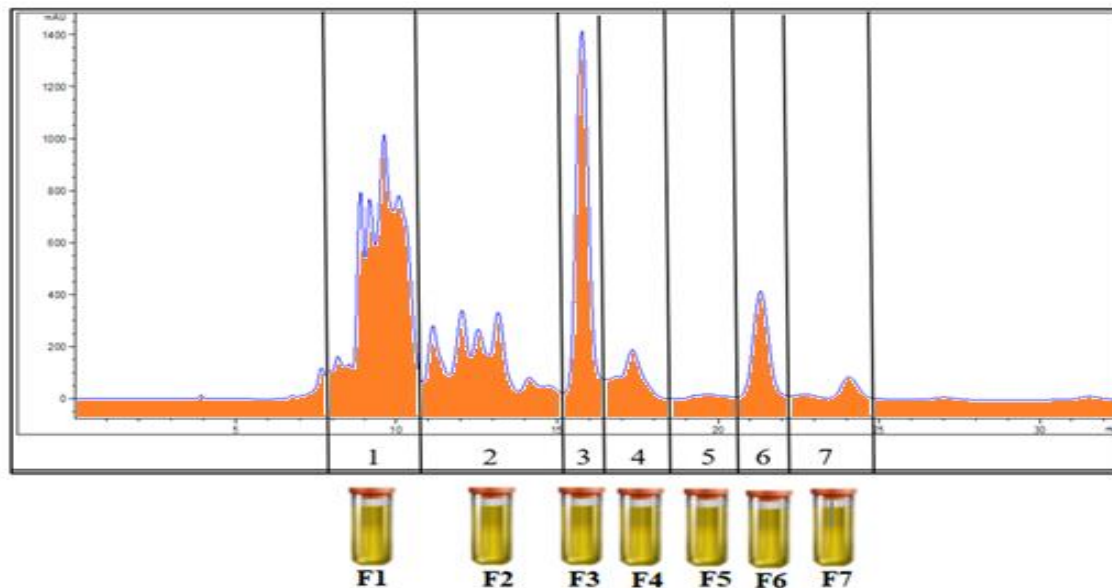
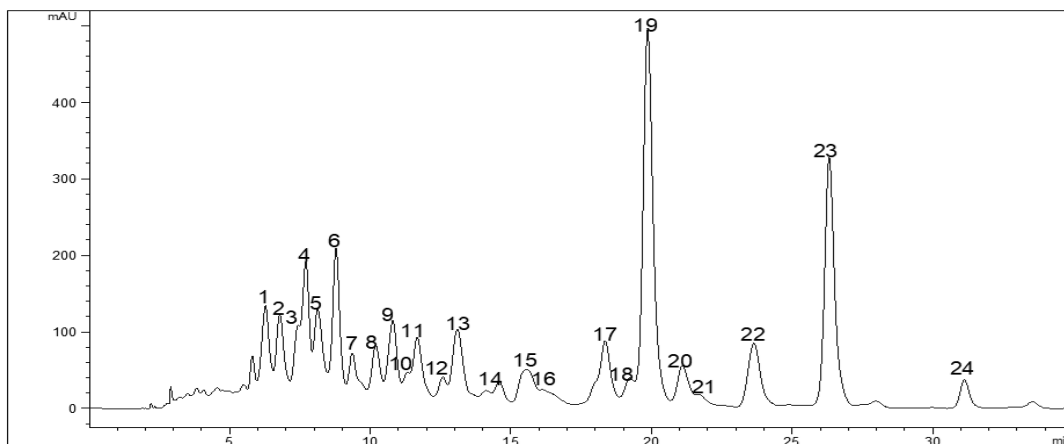


Figura 13. Cromatograma y fraccionamiento por HPLC-C18 de los carotenoides del mamey de la muestra PS-19.

En la figura 14 se observa el cromatograma por HPLC-C30 analítica semipreparativa de la separación de los carotenoides de la muestra de mamey y la identificación preliminar de algunos carotenoides.



1) Neoxantina, 2) Violaxantina, 3) 5,6:5',8'-diepoxi zeaxantina (a), 4) Capsoneoxantina, 5) 5,6:5',8'-diepoxi zeaxantina (b), 6) 5,6-epoxi capsantina, 7) 5,6:5',6' diepoxi- β -criptoxantina, 8) Cis-violaxantina, 9) 5,6:5',8'-diepoxi- β -criptoxantina (a), 10) 5,6:5',8'-diepoxi- β -criptoxantina (b), 11) 5,6-epoxi-criptocapsina, 12) 5,6 epoxi -3'- deoxicapsantina, 13) mezcla, 14) mezcla, 15) mezcla, 16) mezcla, 17) mezcla, 18) 5,8-epoxi- β -criptoxantina (b), 19) Criptocapsina, 20) mezcla, 21) mezcla, 22) 5,8 - epoxi- β -caroteno, 23) sapotexantina, 24) β -Caroteno.

Figura 14. Separación HPLC-C30 e identificación de los carotenoides del mamey de la muestra PS-19.

Se puede observar que hubo una mejor resolución en los diferentes picos, pero aun nos quedan varios mezclas de carotenoides superpuestos que aparecen como mezclas. Para tener una mejor separación de estos carotenoides cada una de las fracciones recolectadas por HPLC-C18 semipreparativa fueron separadas por HPLC-C30 analítica.

6.1.3.2. Análisis de los carotenoides de F 1

En la figura 15 se presenta el cromatograma HPLC para F 1 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de ocho picos que aparecen en la tabla. Observemos que hubo una buena separación de cis-5,6-epoxicapsantina (pico 13^a),

un carotenoide que aparece en una mezcla con capsantina en el pico 13 de la figura 14. El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

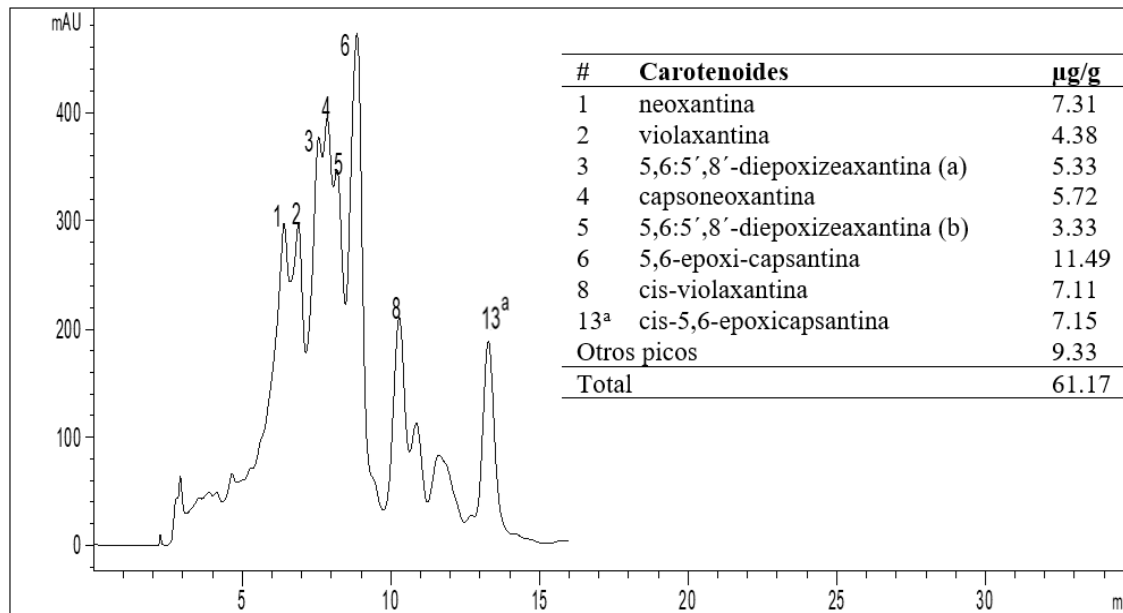


Figura 15. Separación y cuantificación (µg/g) de F 1

6.1.3.3. Análisis de los carotenoides en F 2

En la figura 16 se presenta el cromatograma HPLC para F 2 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de los diez picos que aparecen en la tabla. En esta fracción logramos separar uno de los carotenoides de varias de las mezclas de la figura 14. Separamos capsantina (pico 13^b) que aparece en una mezcla con cis-5,6-epoxicapsantina, cis-criptocapsina (1) (pico 15^a) que aparece en una mezcla con Cis-criptocapsina (2), cis-criptocapsina (3) y 5,6-epoxi-criptoxantina, 3'-

deoxicapsorubina (pico 16^a) que aparece en una mezcla con 5,8:5',8'-diepoxi-β-caroteno, 3'- deoxicapsantina (pico 17^a) que aparece en una mezcla con 5,8 – epoxi-β-criptoxantina (a). El pico 14 no se logró separar en esta fracción. El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

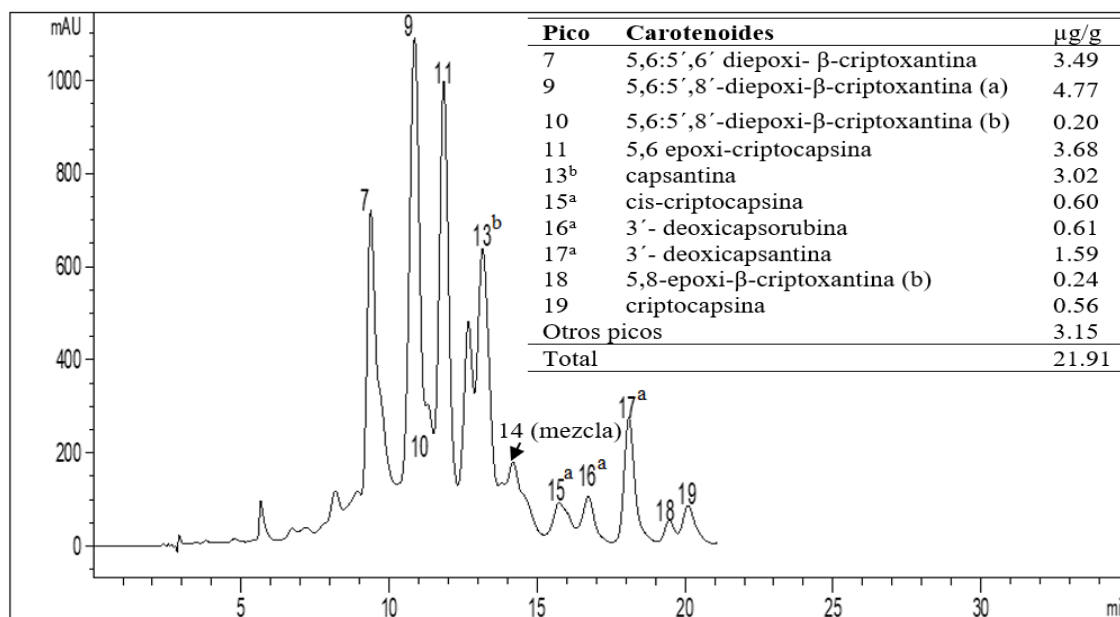


Figura 16. Separación y cuantificación (µg/g) de F 2.

6.1.3.4. Análisis de los carotenoides de F 3

En la figura 17 se presenta el cromatograma HPLC para F 3 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de tres picos que aparecen en la tabla, donde el 15 corresponde a una mezcla de carotenoides. El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

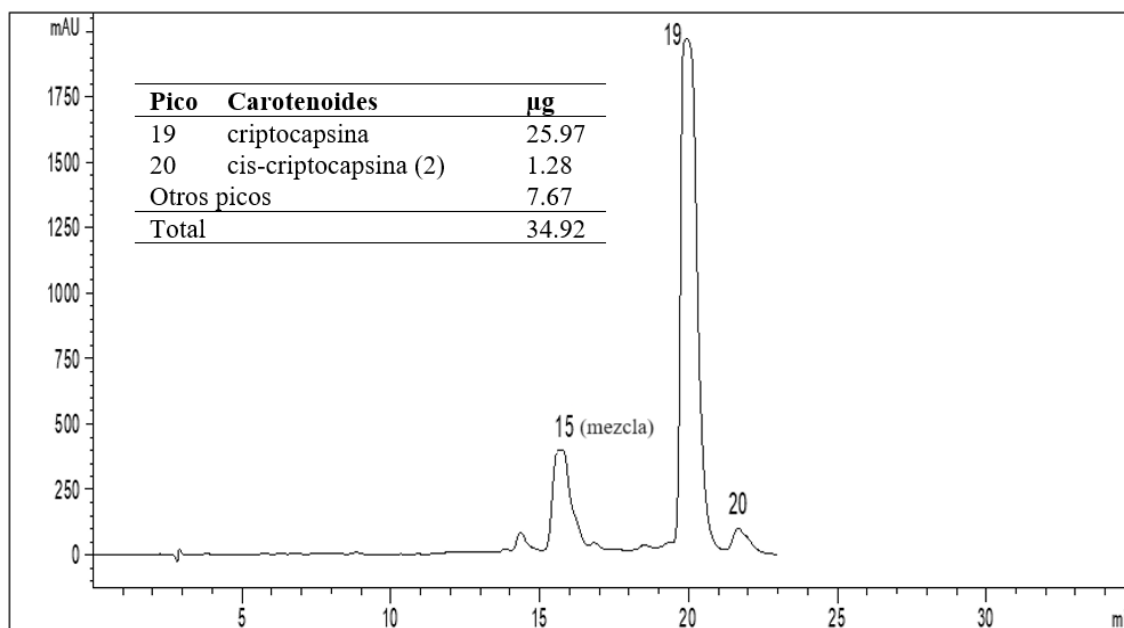


Figura 17. Separación y cuantificación ($\mu\text{g/g}$) de F 3.

6.1.3.5. Análisis de los carotenoides de F 4

En la figura 18 se presenta el cromatograma HPLC para F 4 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de cuatro de los picos que aparecen la tabla, aunque el pico 19 no fue separado con claridad, el mismo fue identificado por su espectro y cuantificado por integración del área.

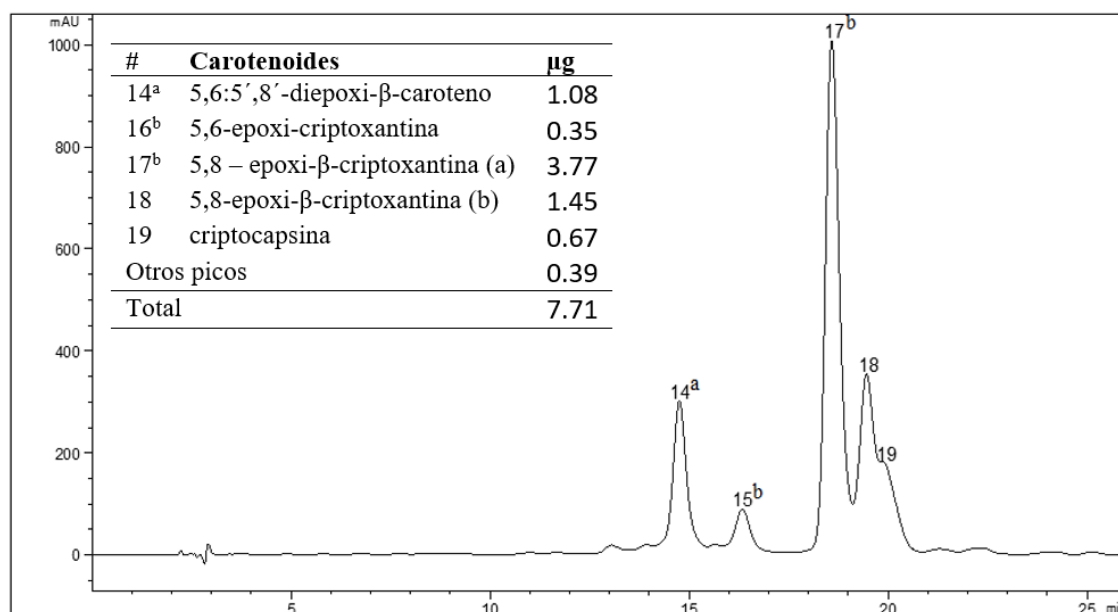


Figura 18. Separación y cuantificación (μg/g) de F 4.

En esta fracción logramos separar uno de los carotenoides de varias de las mezclas de la figura 14. Separamos 5,6:5',8'-diepoxi-β-caroteno (pico 14^b) que aparece en una mezcla con 5,8-epoxi-criptocapsina y la zeaxantina, 5,6-epoxi-criptoxantina (pico 15^b) que aparece en una mezcla con cis-criptocapsina (1,2,3), 5,8-epoxi-β-criptoxantina (a) del (pico 17^b) que corresponde a una mezcla con las 3'-deoxicapsantina (aparece separada en la fracción 2). El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

6.1.3.6. Análisis de los carotenoides de F 5

En la figura 19 se presenta el cromatograma HPLC para la F 5 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de seis picos que aparecen en la tabla.

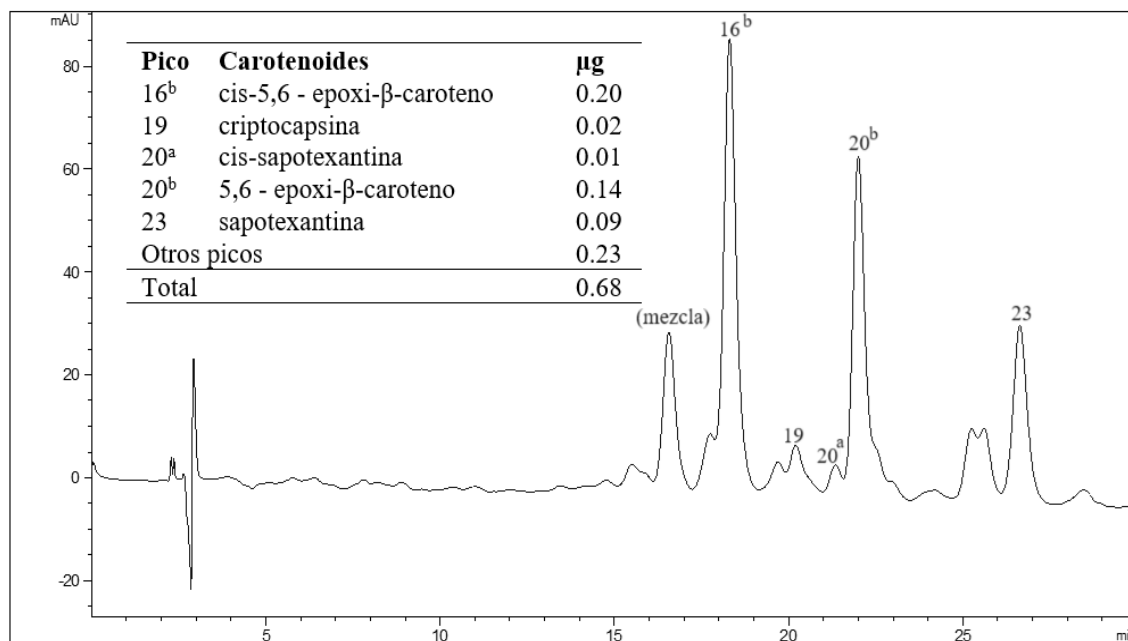


Figura 19. Separación y cuantificación (μg/g) de F 5.

En esta fracción logramos separar uno de los carotenoides de varias de las mezclas de la figura 14. Separamos cis-5,6 - epoxi-β-caroteno (pico 16^b) que aparece en una mezcla con 3'- deoxicapsorubina (aparece separada en la fracción 2) y el 5,6:5',8'- diepoxi-β-caroteno, separamos cis-criptocapsina (pico 20^a) que aparece en una mezcla con cis-criptocapsina y criptoxantina. Separamos 5,6 - epoxi-β-caroteno (pico 20^b) que aparece en una mezcla con 3,3'-didesoxicapsorubina. El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

6.1.3.7. Análisis de los carotenoides de F 6

En la figura 20 se presenta el cromatograma HPLC para F 6 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de cuatro picos que aparecen en la tabla.

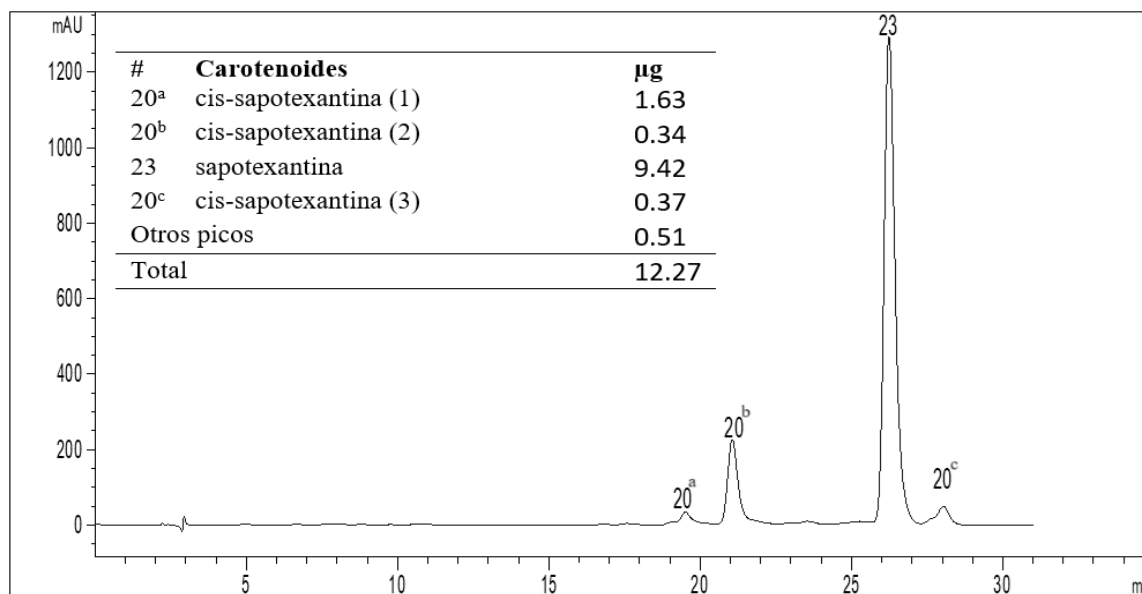


Figura 20. Separación y cuantificación (µg/g) de F 6.

6.1.3.8. Análisis de los carotenoides de F 7

En la figura 21 se presenta el cromatograma HPLC para F 7 de la muestra PS-19, en el cual identificamos y cuantificamos algunos de los carotenoides presentes. Se puede observar una clara separación de cuatro picos en la tabla. Observemos que hubo una buena separación de 3,3'-didesoxicapsorrubina (pico 21^d), un carotenoide que

aparece en una mezcla con Cis-sapotexantina (1,2,3) en el pico 21 de la figura 14. El valor de otros se estima, considerando la proporción que estos representan del contenido total de la fracción.

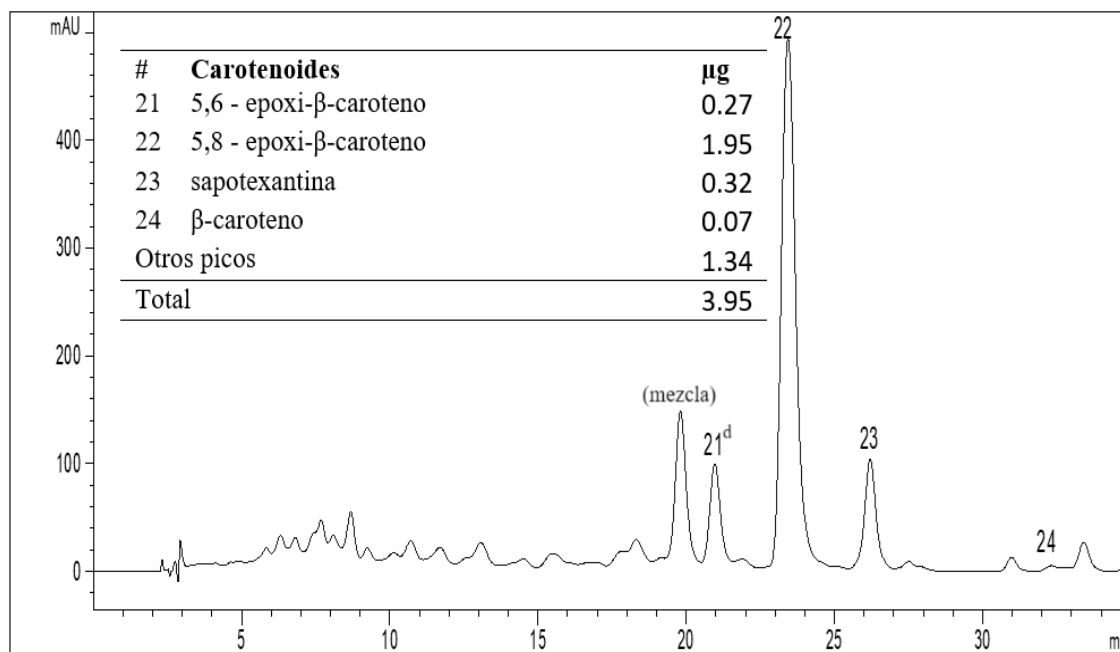


Figura 21. Separación y cuantificación (μg/g) de F 7.

Combinando las dos técnicas de HPLC logramos separar carotenoides que no se pudieron separar utilizando solamente una de estas técnicas como fueron cis-5,6-epoxicapsantina, capsantina, Cis-criptocapsina (1), 3'-deoxicapsorubina, 3'-deoxicapsantina, 5,6:5',8'-diepoxi-β-caroteno, 5,6-epoxi-criptoxantina, 5,8-epoxi-β-criptoxantina (a), Cis-5,6-epoxi-β-caroteno, Cis-criptocapsina, 5,6-epoxi-β-caroteno, 3,3'-didesoxicapsorubina.

6.1.4. Identificación de los carotenoides en la misma fracción de varios extracto por HPLC-DAD

El contenido de un carotenoide específico en los extractos y fracciones de mamey es variable, pero los tiempos de retención y los espectros de absorción de este carotenoide no cambian. De manera que, estos parámetros son utilizados en la identificación de los carotenoides. Para determinar la presencia de un carotenoide específico en diferentes cromatogramas, superponemos los espectros UV/vis de los picos del mismo tiempo de retención y si hay coincidencia total, asumimos que se trata del mismo carotenoide (Rojas-Garbanzo et al., 2011), que es identificado utilizando la librería de espectros UV-Vis previamente preparada. Como ejemplo de este procedimiento, comparamos los espectros de absorción de ocho carotenoides encontrados en 6 extractos (PF-2, PF-3, PS-19, PS-20, PS-21 y PS-22). En la figura 22 se observa los espectros superpuestos de 3'-deoxicapsantina, carotenoide separado en la fracción 2 para los extractos de las seis muestras. Se puede ver que la superposición fue completa para todos los espectros por lo que podemos concluir que se trata de un mismo carotenoide.

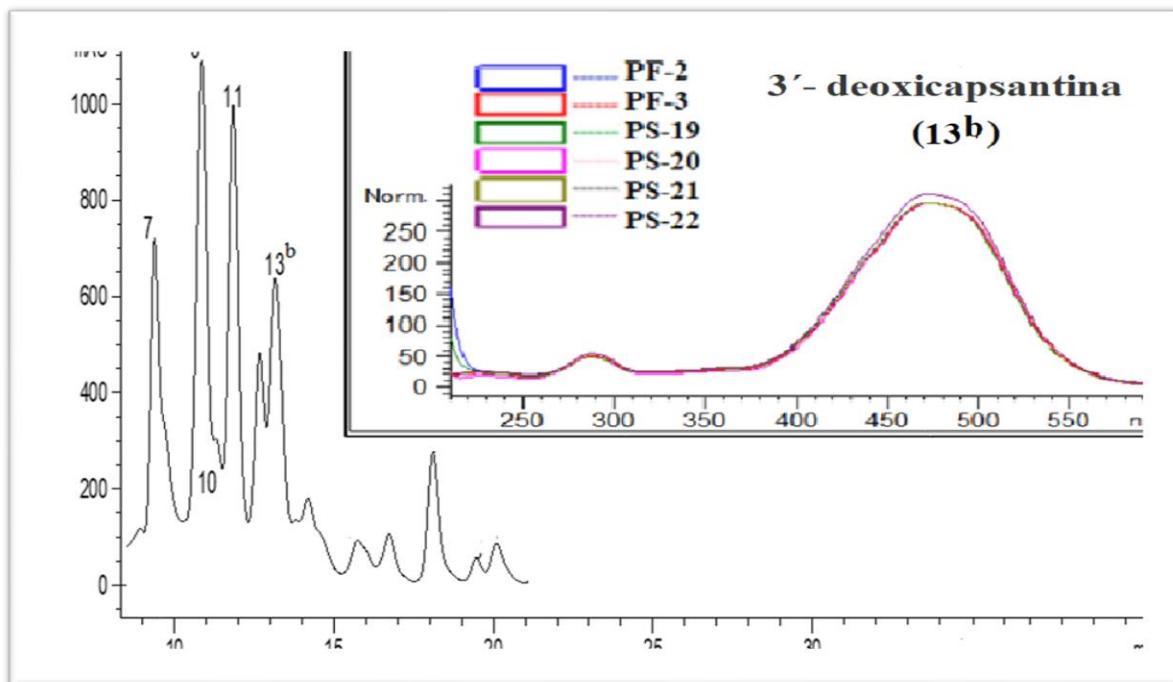


Figura 22. Espectros de absorción superpuestos de la 3'-deoxicapsantina.

6.2. Perfil vs cantidad de carotenoides en mameyes maduros

Se analizaron muestras de frutos maduros (considerando las texturas y el color de la pulpa) del mismo árbol. En las tablas 6, 7, 8, 9 10 y 11 se presentan los resultados del contenido de carotenoides en mameyes de los árboles PS-1, PS-3, PS-5, PS-6, PS-7 y PS-9, todas pertenecientes a la especie *Pouteria sapota*. En todos los casos, se puede observar, que cuando los resultados se expresan como % de carotenoides rojos y amarillos, estos varían menos (menor SD), que cuando se expresan como concentración del fruto ($\mu\text{g/g}$) (mayor SD). Estos resultados sugieren que el % caracteriza mejor a los carotenoides de un árbol que el contenido ($\mu\text{g/g}$), ya que el contenido es muy variable.

Tabla 6. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-1.

M	Amarillos		Rojos	
	µg/g	%	µg/g	%
1	45.6	50.9	44.0	49.1
2	39.4	52.9	35.1	47.1
3	54.2	48.9	56.6	51.1
4	27.7	49.3	28.5	50.7
5	44.3	52.9	39.4	47.1
6	36.7	50.9	35.3	49.1
7	30.7	53.7	26.5	46.3
8	41.1	51.9	38.0	48.1
9	26.0	52.5	23.5	47.5
10	31.0	55.0	25.4	45.0
11	30.7	50.6	30.0	49.4
$\bar{x} \pm SD$	37.0 ± 8.8	25.9 ± 1.9	34.7 ± 9.7	48.2 ± 1.9

$\bar{x} \pm SD$ = promedio \pm desviación estándar

Tabla 7. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-3.

M	Amarillos		Rojos	
	µg/g	%	µg/g	%
1	102.9	35.2	189.8	64.8
2	105.6	36.1	187.0	63.9
3	116.7	36.9	200.0	63.1
4	160.8	38.2	259.7	61.8
5	159.0	37.9	261.1	62.1
6	78.8	38.4	126.2	61.6
$\bar{x} \pm SD$	120.6 ± 32.8	37.1 ± 1.3	204.0 ± 50.8	62.9 ± 1.3

$\bar{x} \pm SD$ = promedio \pm desviación estándar

Tabla 8. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-5

M	Amarillos		Rojos	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
1	16.7	52.4	15.2	47.6
2	23.0	58.4	16.4	41.6
3	48.6	58.7	34.2	41.3
4	23.2	58.1	16.8	41.9
5	82.9	57.2	62.0	42.8
$\bar{X} \pm \text{SD}$	38.9 ± 27.5	57.0 ± 2.6	28.9 ± 20.1	43.0 ± 2.6

$\bar{X} \pm \text{SD}$ = promedio \pm desviación estándar

Tabla 9. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol PS-6

M	Amarillos		Rojos	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
1	37.9	69.2	16.9	30.8
2	46.7	67.6	22.4	32.4
3	40.1	71.6	15.9	28.4
4	64.1	63.8	36.4	36.2
5	43.5	67.1	21.3	32.9
6	55.1	65.6	28.9	34.4
$\bar{X} \pm \text{SD}$	47.9 ± 10.0	67.5 ± 2.7	23.6 ± 7.8	32.5 ± 2.7

$\bar{X} \pm \text{SD}$ = promedio \pm desviación estándar

Tabla 10. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol

PS-7

M	Amarillos		Rojos	
	µg/g	%	µg/g	%
A2	138.4	63.7	78.9	36.3
A4	138.8	61.2	88.0	38.8
A6	85.6	63.7	48.8	36.3
A7	184.6	61.9	113.8	38.1
B2	283.2	59.5	192.9	40.5
B4	113.3	59.7	76.6	40.4
B5	131.7	60.0	87.8	40.0
C1	180.7	60.9	116.1	39.1
C3	210.4	60.8	135.6	39.2
C5	146.6	59.7	99.0	40.3
$\bar{X} \pm SD$	161.3 ± 56.1	61.1 ± 1.6	103.8 ± 39.6	38.9 ± 1.6

$\bar{X} \pm SD$ = promedio ± desviación estándar

Tabla 11. Variabilidad del contenido de carotenoides entre frutos del árbol

PS-9.

M	Amarillos		Rojos	
	µg/g	%	µg/g	%
1	217.6	54.0	185.3	46.0
2	56.1	62.1	34.2	37.9
3	100.6	58.7	70.7	41.3
4	95.8	60.0	63.9	40.0
5	104.0	59.8	70.0	40.2
6	139.2	59.3	95.5	40.7
7	104.6	58.9	72.9	41.1
8	149.2	60.1	98.9	39.9
9	81.7	60.5	53.3	39.5
10	74.4	58.4	53.1	41.6
11	117.0	59.5	79.6	40.5
12	108.7	60.6	70.7	39.4
$\bar{X} \pm SD$	102.9 ± 26.8	59.8 ± 1.0	69.3 ± 18.6	40.2 ± 1.0

$\bar{X} \pm SD$ = promedio ± desviación estándar

En la tabla 12, se presenta el promedio del contenido de carotenoides amarillos y rojos, expresados en % y en $\mu\text{g/g}$, correspondientes a los árboles PS-1, PS-3, PS-5, PS-6, PS-7 y PS-9. En esta tabla se observa, que los coeficientes de variación (CV) son menores cuando los resultados se expresan como %, con relación a los resultados expresados en $\mu\text{g/g}$. Esto indica, que la expresión como % representa mejor la composición de carotenoides de los frutos de un árbol y de una variedad de mamey.

Tabla 12. Variabilidad en el contenido de carotenoides de *Pouteria sapota* maduros.

Variedad	%		$\mu\text{g/g}$	
	Amarillos	Rojos	Amarillos	Rojos
PS-1	51.8 (3.6)	48.2 (3.9)	37.0 (23.7)	34.7 (27.9)
PS-3	37.1 (3.5)	62.9 (2,1)	120.6 (27.2)	204.0 (24.9)
PS-5	57.0 (4.6)	43.0 (6.0)	38.9 (70.7)	28.9 (69.5)
PS-6	67.5 (4.1)	32.5 (8.4)	47.9 (20.8)	23.6 (33.0)
PS-7	61.1 (2.6)	38.9 (4.0)	161.3 (34.8)	103.8 (38.2)
PS-9	59.8 (1.7)	40.2 (2.6)	102.9 (26.1)	69.3 (26.9)

X(CV) = Promedio (Coeficiente de variación)

En la tabla 13, se presenta un ejemplo de la variabilidad en el contenido de carotenoides específicos entre frutos de un mismo árbol (PS-9). En el árbol PS-9, se puede observar, que el perfil (%) es una mejor forma de expresar la composición de carotenoides específicos, ya que presentan valores más bajos en los coeficientes de variación, que los expresados en cantidad ($\mu\text{g/g}$).

Tabla 13. Variabilidad de carotenoides específicos en frutos del árbol PS-9.

Carotenoide	Perfil		Cantidad	
	%	CV	µg/g	CV
Neoxantina	7.9	16.4	15.0	26.2
Violaxantina	11.9	10.6	23.5	28.1
Capsoneoxantina	7.0	16.2	13.2	24.2
5,6:5',8'-Zeaxantina	6.4	7.1	11.9	34.3
5,6-epoxi-capsantina	9.3	6.5	17.1	34.1
5,6:5',6' diepoxi-criptoxantina	0.9	24.5	1.9	60.8
Cis-violaxantina	14.1	10.1	26.3	28.7
5,6:5',8'-diepoxi-criptoxantina.	3.3	17.7	6.0	58.1
5,6-epoxi-criptocapsina	2.3	16.4	3.8	56.4
Cis-capsantina	4.3	6.3	7.8	37.4
5,6:5',6' diepoxi- β -caroteno	0.9	26.6	1.7	52.9
5,6:5',8' diepoxi- β -caroteno	0.9	40.6	1.3	91.4
Cis - criptocapsina	1.8	28.4	2.7	50.8
5,6 - epoxi - criptoxantina	N.D	N.D	N.D	N.D
5,8 - epoxi - criptoxantina	1.2	20.0	2.0	58.7
Criptocapsina	5.7	10.2	10.5	51.0
5,6 - epoxi-β-caroteno	N.D	N.D	N.D	N.D
5,8 - epoxi-β-caroteno	2.8	13.0	5.5	46.7
Sapotexantina	9.1	10.3	17.5	47.6
β-Caroteno	0.3	26.9	0.6	31.5
Otros	10.0	20.2	16.6	60.7
Total	--	--	200.6	--

* ND = No detectable (menos de 0.2 %) **n= 12**

6.3. Cambios en los carotenoides del mamey durante la maduración

En este estudio, utilizamos el contenido de azúcar como indicador de grado de maduración de los frutos y el ablandamiento detectado por el tacto como indicador de total maduración. Los carotenoides rojos y amarillos fueron determinados

simultáneamente (en la misma solución), por espectrofotometría. Cada muestra corresponde a frutos del mismo árbol, seleccionados por la coloración interna observada, luego de levantar la piel en una pequeña sección del fruto. En las figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 se presentan los cambios durante la maduración, de frutos en los árboles PS-21, PS-22, PS-23, PS-24, PS-25, PS-26 y PF-1 respectivamente, se puede observar que, en todos los árboles, los carotenoides rojos y amarillos de los mameyes, aumentan cuando aumenta el estado de maduración (contenido de azúcar).

Durante la maduración, también se observa, que la proporción (%) de carotenoides rojos aumenta, con relación a los amarillos. Los cambios en el contenido de carotenoides, se refleja en los cambios de color de la pulpa, como se puede observar en las figuras 30 y 31.

Cuando se evalúan los cambios en las últimas etapas de la maduración, se observan cambios drásticos en el contenido de carotenoides rojos y amarillos ($\mu\text{g/g}$), pero la proporción (%) entre estos grupos de carotenoides se mantiene. Considerando, que el comportamiento de los carotenoides del mamey, durante la maduración, en las muestras de todos los árboles estudiados, es similar, podemos generalizar, que durante la maduración aumentan los carotenoides rojos y amarillos, donde los rojos aumentan en mayor proporción, hasta que se llega a un punto de maduración en donde las proporciones de rojos y amarillos no varían. El color de la pulpa de un mamey maduro depende de la cantidad y proporción de carotenoides rojos y amarillos.

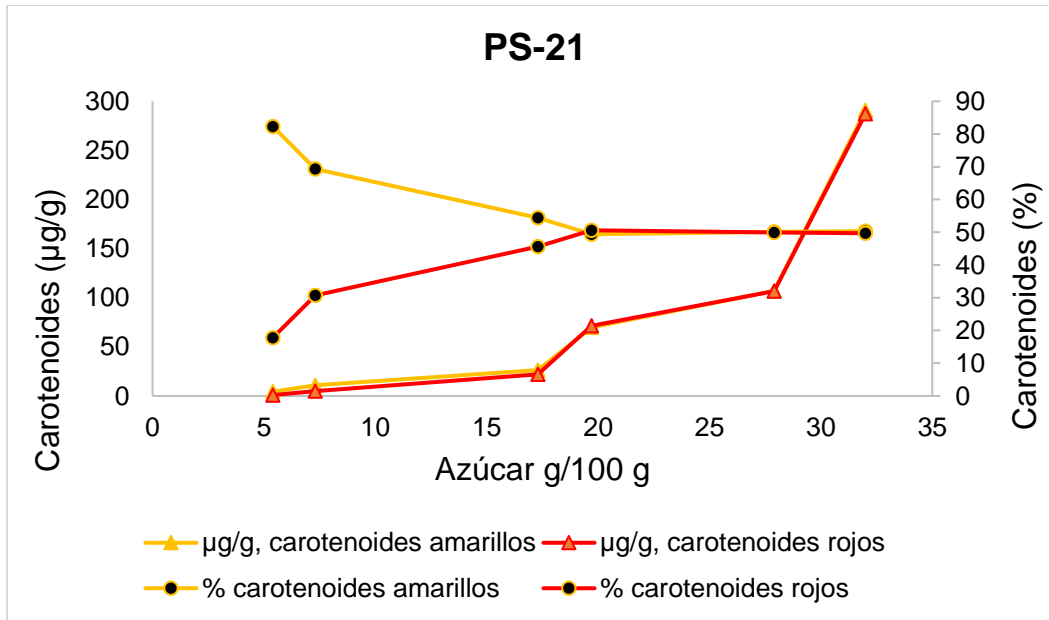


Figura 23. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-21.

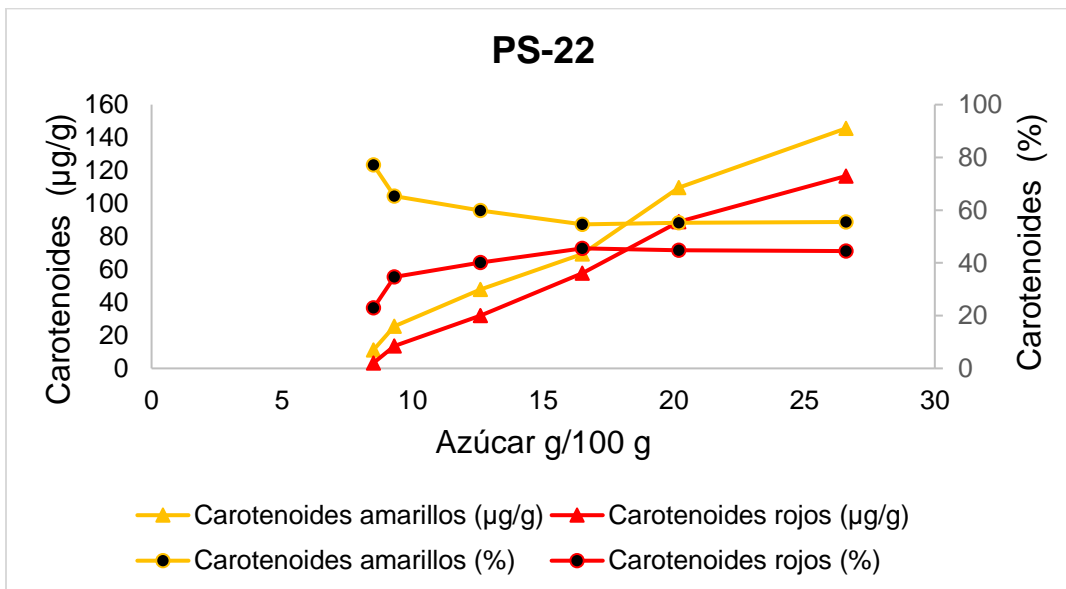


Figura 24. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-22.

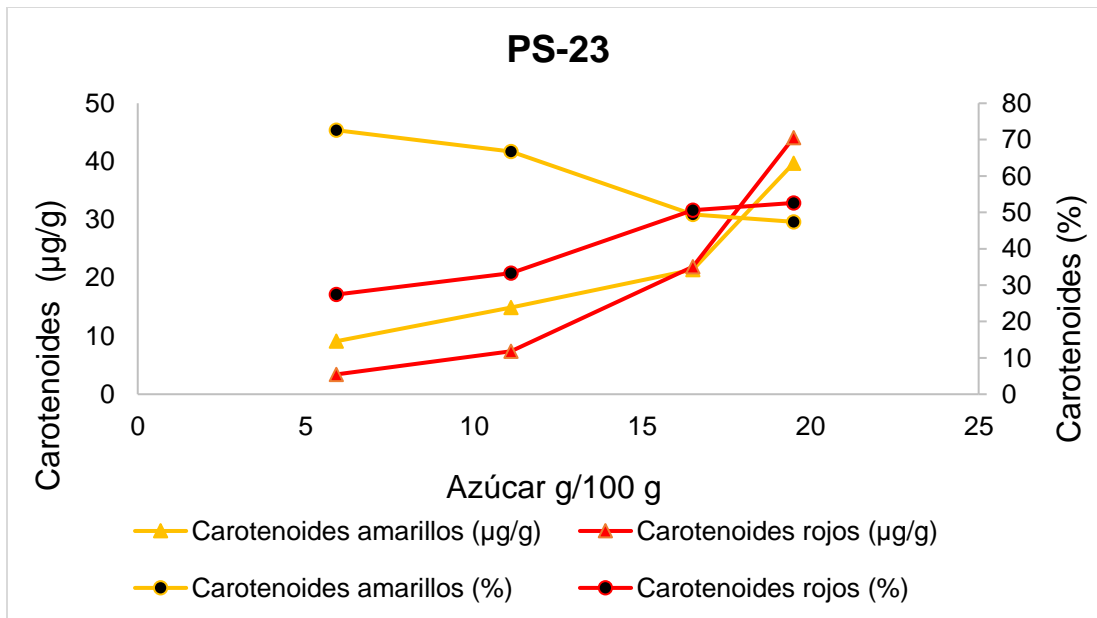


Figura 25. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-23.

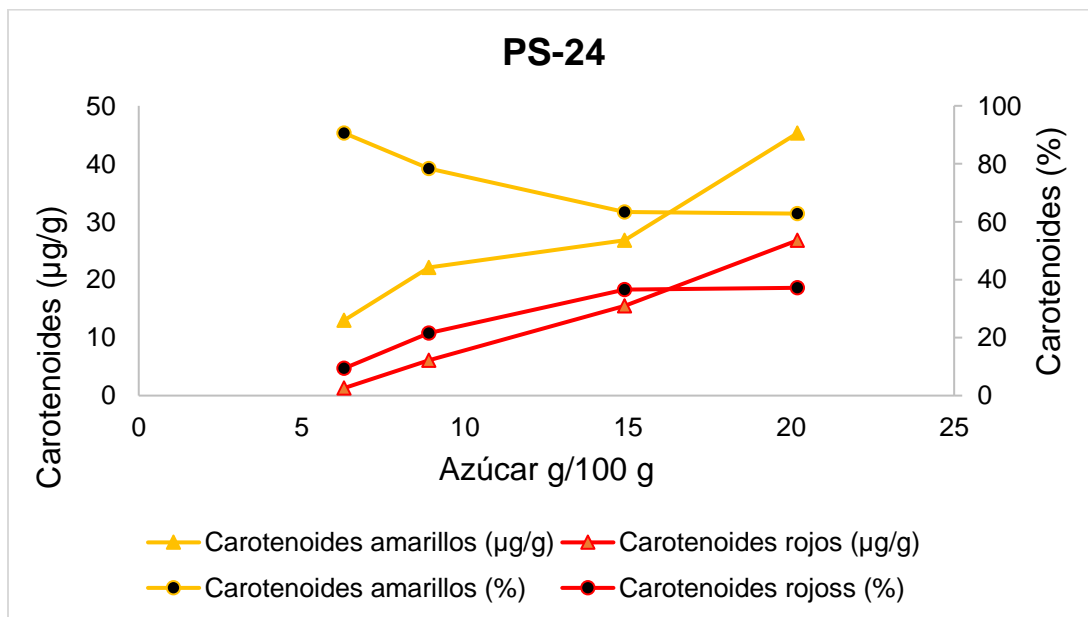


Figura 26. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-24.

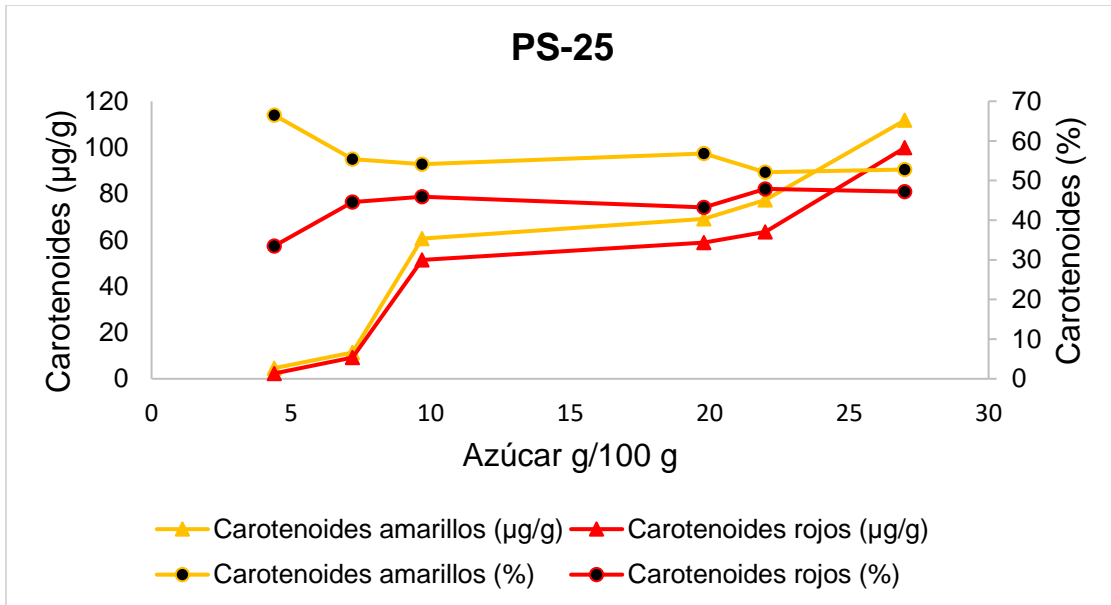


Figura 27. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-25.

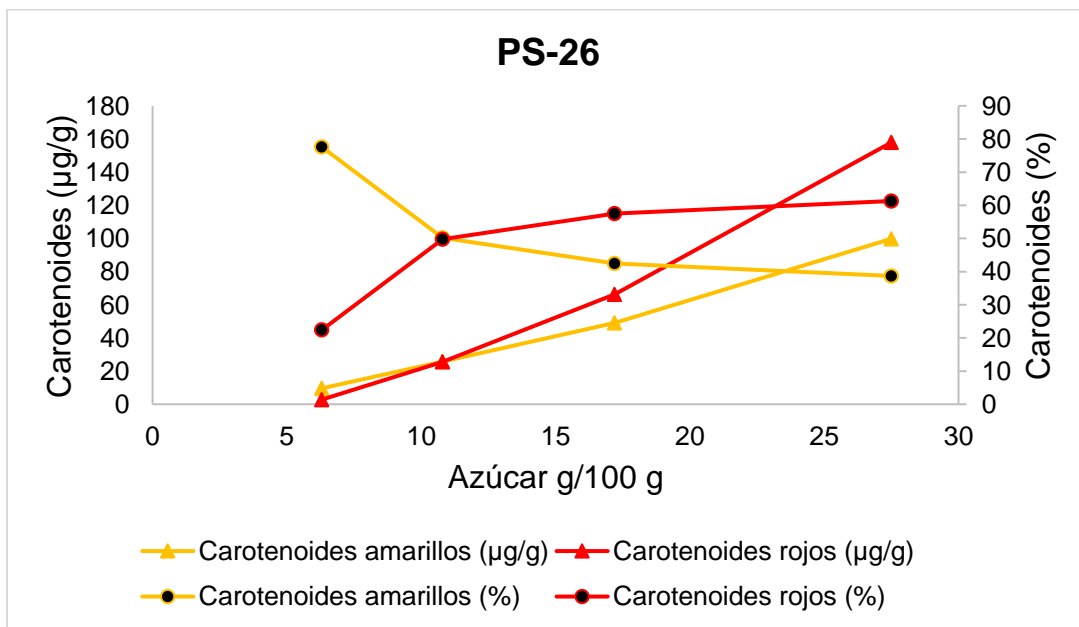


Figura 28. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PS-26.

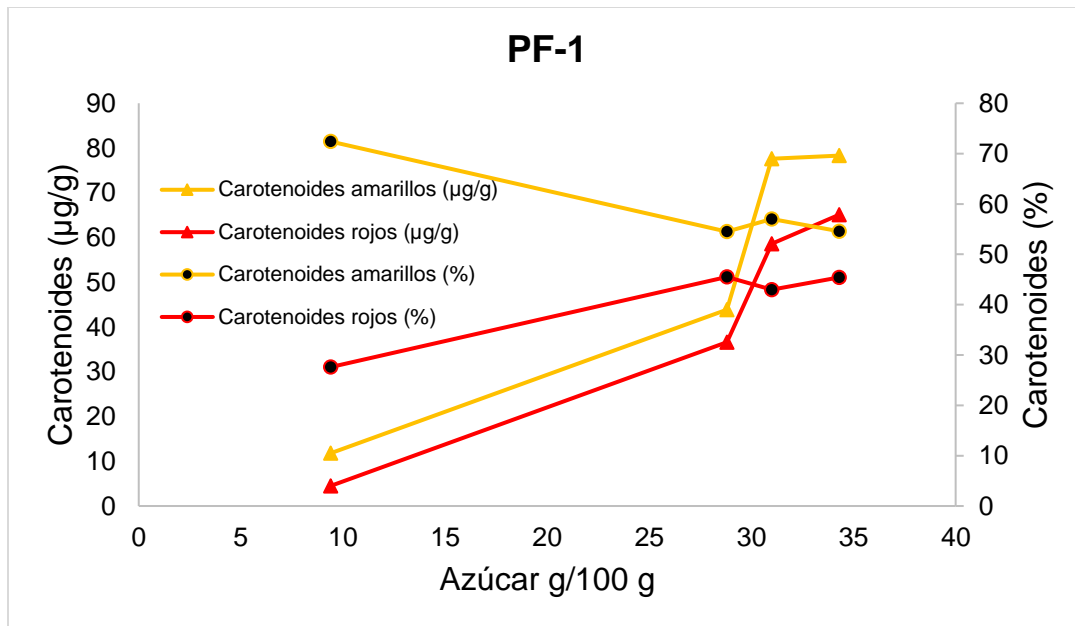


Figura 29. Cambios en los carotenoides rojos y amarillos durante la maduración de mameyes del árbol PF-1.



Figura 30. Mamey del árbol PS-21 a diferentes etapas de maduración.



Figura 31. Mamey del árbol PS-24 a diferentes etapas de maduración.

6.4. Comparación del perfil de carotenoides a diferentes estados de maduración

En la tabla 14 se presentan los perfiles de carotenoides (%), en mameyes en estados verde y maduro para las muestras PS-21, PS-22 y PS-23. Podemos observar, que las proporciones de neoxantina, violaxantina y Capsoneoxantina disminuyen drásticamente cuando la fruta madura, mientras criptocapsina y sapotexantina aumentan. Esto se refleja en el aumento en la proporción de rojos con relación a amarillos cuando la fruta madura. En frutas como el plátano, no se observan cambios importantes en los carotenoides, durante la maduración (Chavez, 2001; Meléndez-martínez, 2017).

Tabla 14. Cambios del perfil (%) de carotenoides durante la maduración del mamey.

Carotenoides	PS-21		PS-22		PS-23	
	Verde	Maduro	Verde	Maduro	Verde	Maduro
Neoxantina	28.2	7.9	24.0	10.1	17.1	5.9
Violaxantina	7.2	7.1	8.7	6.6	6.5	2.4
Capsoneoxantina	11.0	7.7	4.8	3.4	3.4	2.1
5,6:5',8'-Zeaxantina	4.4	6	4.2	3	4.3	3.2
5,6-epoxi-capsantina	5.1	10.9	2.7	4.2	4.0	5.3
5,6:5',6'-diepoxicriptoxantina	ND	0.7	1.1	3.4	6.5	4.9
Cis-violaxantina	4.9	10.6	9.2	9.8	8.8	3.7
5,6:5',8'-diepoxicriptoxantina.	2.2	3	2.2	2.9	1.9	4.6
5,6-epoxi-criptocapsina	1.6	2.8	0.8	2.5	2.1	4.0
Cis - capsantina	2.8	4.7	1.8	2.1	3.8	4.2
5,6:5',6'- diepoxi- β - caroteno	ND	1.1	0.8	0.7	2.8	2.7
5,6:5',8'- diepoxi- β - caroteno	0.9	1	0.8	1.3	0.5	1.6
cis - criptocapsina	0.5	1.4	0.7	2.2	0.5	2.3
5,6-epoxi - criptoxantina	0.5	ND	1.1	0.9	3.2	1.7
5,8 - epoxi - criptoxantina	0.5	1.7	1.1	3.5	2.6	4.2
criptocapsina	2.2	8.2	4.8	16.5	14.4	19.1
5,6 - epoxi- β -caroteno	2.1	ND	4.0	2.5	1.8	3.7
5,8 - epoxi- β -caroteno	3.1	3.9	4.1	5	1.5	5.0
sapotexantina	8.4	10.5	7.9	12.0	3.7	11.9
B-Caroteno	1.2	0.2	1.3	0.6	1.8	0.6
Otros	13.2	10.6	13.9	6.8	8.8	6.9
Total $\mu\text{g/g}$	15.9	213.6	14.5	262.3	12.6	83.8
% Amarillos	69.3	50.1	77.1	55.5	72.6	47.4
% Rojos	30.7	49.9	22.9	44.5	27.4	52.6

* ND = No detectable (menos de 0.2 %)

6.5. Comparación del Perfil de carotenoides entre especies y variedades de mamey.

En las tablas 15, 17 y 19 se presenta el perfil (%) de carotenoides de algunas variedades de tres especies de mamey que crecen silvestres en Panamá (*Pouteria sapota*, *Pouteria fossicola* y *Pouteria viridis*). En las figuras 32, 33 y 34 se presentan imágenes de las variedades de estas especies estudiadas. En las tablas 16, 18 y 20 se presentan características importantes que nos permiten establecer las diferencias físicas entre las variedades.

Las variedades de cada especie se agruparon en base a las descripciones, aportadas por la literatura (Solano Rivera, 2016). La piel de las variedades de *Pouteria sapota* son de color marrón a ceniza homogéneo, que no cambia con la maduración del fruto. La piel de las variedades de *Pouteria fossicola* presentan lenticelas transversales, y la piel cambia de coloración con la maduración, de verde a rojo-naranja. La piel de las variedades de *Pouteria viridis* va de lisa con color homogéneo a lisa con manchas negras en donde el color cambia durante la maduración de verde a rojo-naranja. Esta es la primera agrupación de especies y variedades de mamey que se realiza en Panamá, ya que en Panamá no existen cultivos de mamey y los frutos comercializados son prácticamente silvestres.

Este es el primer estudio donde se demuestra que las tres especies contienen los mismos carotenoides y no existe un perfil de carotenoides entre las variedades de una especie que pueda considerarse característico de la especie. Los principales carotenoides amarillos en las variedades de todas las especies son neoxantina, violaxantina, 5,6:5',8'-diepoxicriptoxantina y la 5,6:5',6' diepoxi-criptoxantina,

mientras que entre los principales carotenoides rojos encontramos a la criptocapsina, sapotexantina, cis-capsantina, y la 5,6-epoxi-capsantina.

Tabla 15. Perfil (%) de carotenoides en 6 variedades de mamey (*Pouteria Sapota*).

Carotenoides	<i>Pouteria sapota</i>					
	PS-1	PS-2	PS-3	PS-4	PS-5	PS-6
neoxantina	16.9	2.3	14.1	4.2	12.9	2.2
violaxantina	15.2	2.6	7.0	3.4	11.7	1.1
capsoneoxantina	16.4	4.5	8.6	7.1	10.2	0.6
5,6:5',8' diepoxi-Zeaxantina	12.8	4.6	6.4	2.1	13.5	3.7
5,6-epoxi-capsantina	23.3	9.7	5.0	8.2	26.3	6.4
5,6:5',6' diepoxi-criptoxantina	1.5	2.3	5.5	1.7	8.8	2.2
cis-violaxantina	22.6	3.5	10.5	3.0	14.0	1.4
5,6:5',8'-diepoxicriptoxantina.	6.4	6.4	3.0	6.7	14.6	4.2
5,6-epoxi-criptocapsina	6.0	7.5	8.8	4.9	14.6	3.4
cis-capsantina	10.0	4.2	8.0	4.2	15.2	3.0
5,6:5',6'- diepoxi- β -caroteno	2.3	2.0	0.5	0.4	3.8	0.6
5,6:5',8'- diepoxi- β -caroteno	2.1	3.1	1.4	1.2	3.8	0.5
cis - criptocapsina	3.0	3.0	1.0	3.6	11.4	1.7
5,6-epoxi - criptoxantina	ND	ND	0.5	2.4	N.D	N.D
5,8 - epoxi - criptoxantina	3.6	1.0	2.5	1.3	10.2	1.0
criptocapsina	17.5	5.6	10.5	34.6	63.8	10.4
5,6 - epoxi- β -caroteno	ND	ND	0.3	0.2	N.D	N.D
5,8 - epoxi- β -caroteno	8.3	1.2	2.9	7.0	7.0	2.4
sapotexantina	22.4	3.7	7.3	21.9	20.8	5.8
β -caroteno	0.4	ND	0.3	2.0	0.6	0.3
Otros	22.6	14.6	7.2	24.9	29.3	11.3
Total, μg/g	213.6	81.8	110.77	145.4	292.7	62.2
% Amarillos	50.1	43.7	50.9	55.5	35.2	57.7
% Rojos	49.9	56.3	49.1	44.6	64.8	42.3

Tabla 16. Caracterización de variedades de *Pouteria sapota* (PS).

Características	PS-1	PS-2	PS-3	PS-4	PS-5	PS-6
Fruto (g) $\bar{x} \pm SD$	387±74	344±21	387±74	411±94	256±43	398±67
(%) gS/gF $\bar{x} \pm SD$	8.0±1.4	8.2±2.1	8.0±1.4	9.2±1.8	8.3±1.7	8.6±1.8
Color pulpa	rojo	naranja	rosado	naranja	rojo	rosada
Aspecto de piel	rugosa	rugosa	rugosa	gris	rugosa	gris
Espesor de la piel	gruesa	gruesa	gruesa	delgada	gruesa	delgada
Forma	ovalada	alargada	ovalada	alargada	ovalada	ovalada

$\bar{x} \pm SD$ = promedio \pm desviación estándar

gS/gF = gramos de la semilla / gramos del fruto



Figura 32. Muestras estudiadas de *Pouteria sapota* (PS).

Tabla 17. Perfil (%) de carotenoides en 6 variedades de mamey (*Pouteria fossicola*).

Carotenoides	<i>Pouteria fossicola</i>					
	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	PF-5	PF-6
neoxantina	9.8	10.9	13.4	13.1	12.9	9.3
violaxantina	6.5	6.3	6.6	5.8	8.7	5.2
capsoneoxantina	2.5	4.5	7.0	2.7	1.6	3.1
5,6:5',8'- diepoxi-Zeaxantina	3.3	4.0	3.3	2	2.9	2.9
5,6-epoxi-capsantina	6.0	7.7	6.9	4.5	4.3	4.4
5,6:5',6'- diepoxi- β -criptoxantina	6.7	7.0	10.2	2.1	11.8	5.9
Cis-violaxantina	7.6	2.7	3.6	10.7	11.9	7.4
5,6:5',8'-diepoxi- β -criptoxantina.	6.1	2.3	3.0	8.6	3.9	4.8
5,6-epoxi-criptocapsina	5.0	6.0	5.6	6.3	3.6	3.8
cis-capsantina	4.4	0.9	1.7	6,4	3.9	2.7
5,6:5',6'- diepoxi- β -caroteno	3.2	1.4	3.2	1	4.0	2.1
5,8:5',8'- diepoxi- β -caroteno	0.7	0.4	0.5	1.2	0.7	1.2
cis - criptocapsina	4.7	3.2	4.2	4.3	3.0	5.3
5,6 - epoxi - β - criptoxantina	5.3	0.9	0.4	1.1	8.2	2.5
5,8 - epoxi - β -criptoxantina	0.7	1.2	1.2	6.9	7.3	7.2
criptocapsina	24.2	9.5	16.5	32.1	33.1	27.9
5,6 - epoxi- β -caroteno	1.5	0.4	1.2	4.5	5.0	0.6
5,8 - epoxi- β -caroteno	5.5	2.9	4.2	29.9	3.0	3.8
sapotexantina	14.7	7.6	14.8	61.9	6.3	8.5
β -caroteno	0.7	0.5	1.0	3.7	0.6	0.5
Otros	10.1	7.6	11.8	9.7	6.7	13.7
Total, $\mu\text{g/g}$	129.2	87.9	120.3	156.3	143.4	122.7
% Amarillos	50.7	60.2	51.1	63.8	54.6	52.4
% Rojos	49.3	39.8	48.9	36.2	45.4	47.6

Tabla 18. Caracterización de variedades de *Pouteria fossicola* (PF).

Características	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	PF-5	PF-6
Fruto (g) $\bar{x} \pm SD$	1039±117	655±128	388±85	405±58	651±84	474±73
(%) gS/gF $\bar{x} \pm SD$	11.4±3.6	17.4±9.0	12.4±2.1	9.7±1.1	12.2±2.1	10.8±2.0
Color pulpa	Naranja	Rosada	roja	rosada	Naranja	Naranja
Aspecto de piel	lenticelada	lenticelada	lenticelada	lenticelada	lenticelada	lenticelada
Espesor de la piel	delgada	delgada	delgada	gruesa	delgada	gruesa
Forma	ovalada	ovalada	ovalado	redonda	ovalada	redonda

$\bar{x} \pm SD$ = promedio \pm desviación estándar

gS/gF = gramos de la semilla / gramos del fruto

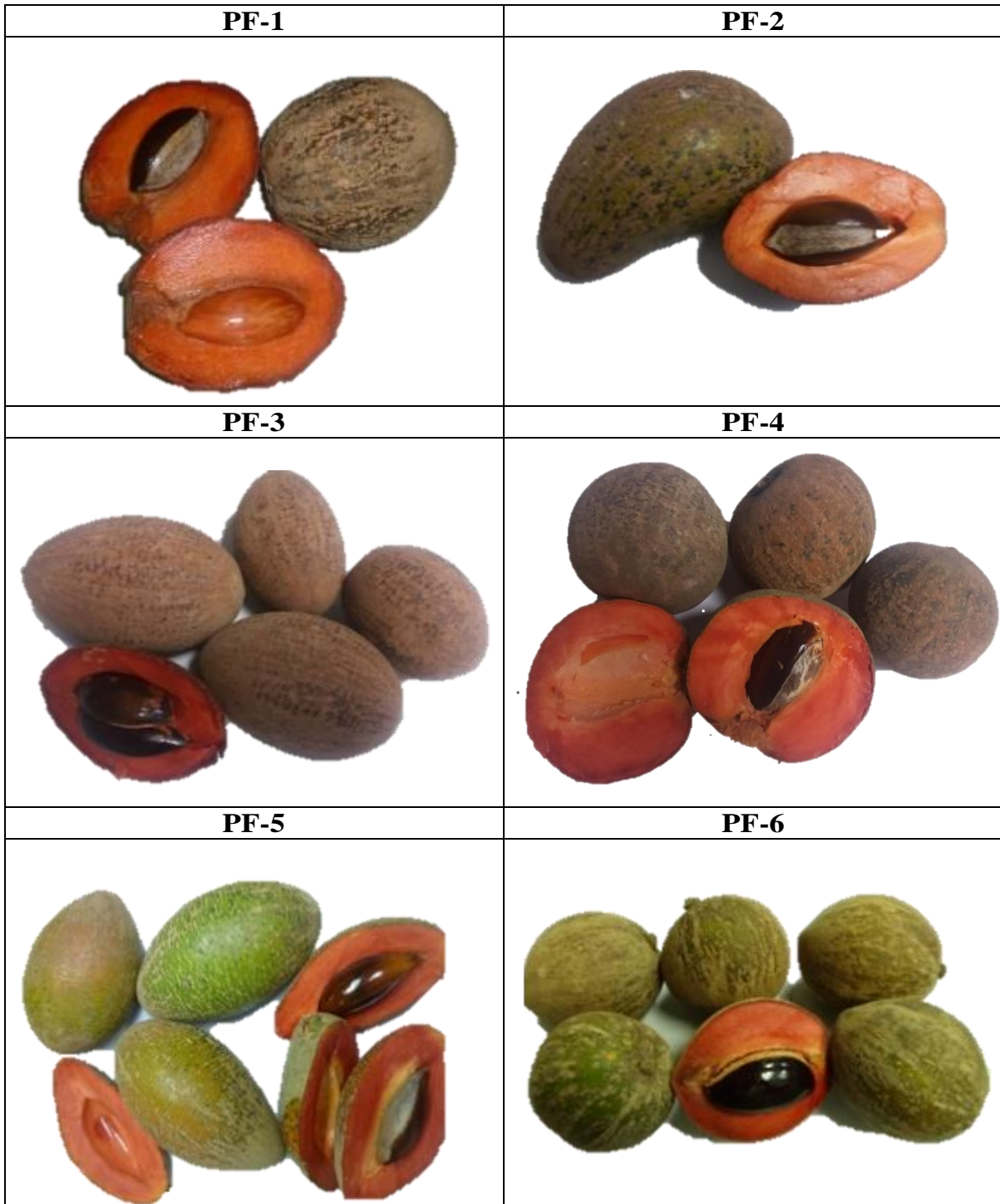


Figura 33. Muestras estudiadas de *Pouteria fossicola* (PF).

Tabla 19. Perfil (%) de carotenoides en 5 variedades de mamey (*Pouteria viridis*).

Carotenoides	<i>Pouteria viridis</i>				
	PV-1	PV-2	PV-3	PV-4	PV-5
neoxantina	6.3	6.9	11.1	8.9	11.9
violaxantina	3.6	2.7	10.6	4.4	9.3
capsoneoxantina	3.7	1.2	2.2	2.5	3.9
5,6:5',8'-diepoxi zeaxantina	4.3	2.7	3.9	17.4	6.7
5,6-epoxi-capsantina	8.9	2.5	1.8	25.6	11.2
5,6:5',6' diepoxi- β -criptoxantina	7.9	3.6	3.7	8.7	6.3
cis-violaxantina	5.5	4.3	15.4	5.4	9.3
5,6:5',8'-diepoxi- β -criptoxantina.	6.4	3.3	5.3	17.7	8.4
5,6-epoxi-criptocapsina	4.3	2.0	1.0	13.6	6.0
cis-capsantina	5.4	2.4	ND	13.0	8.0
5,6:5',6'- diepoxi- β -caroteno	2.7	2.9	0.6	6.0	4.0
5,6:5',8'- diepoxi- β -caroteno	1.8	2.3	0.4	3.3	0.5
cis - criptocapsina	1.8	1.7	3.5	6.6	3.0
5,6-epoxi - criptoxantina	1.5	2.0	2.0	4.6	1.9
5,8 - epoxi - criptoxantina	3.5	2.8	3.1	9.0	7.0
criptocapsina	17.0	8.3	12.4	45.6	29.1
5,6 - epoxi- β -caroteno	2.4	8.4	3.1	6.6	0.4
5,8 - epoxi- β -caroteno	3.7	7.4	3.6	9.6	9.2
sapotexantina	10.2	12.2	6.4	23.0	27.4
β -caroteno	0.6	0.9	0.6	1.4	0.5
Otros	11.3	8.0	9.8	14.5	18.1
Total, $\mu\text{g/g}$	112.9	88.7	100.6	247.4	182.1
% Amarillos	52.6	58.0	63.8	49.9	46.2
% Rojos	47.4	42.0	36.2	50.1	53.8

Tabla 20. Caracterización de variedades de *Pouteria viridis* (PV).

Características	PV-1	PV -2	PV -3	PV -4	PV -5
Fruto (g) $\bar{X} \pm SD$	345±42	301±38	314±34	820±56	306±52
(%) gS/gF $\bar{X} \pm SD$	17±2.0	11±1.8	14±2.2	20±1.0	9.2±1.2
Color pulpa	roja	roja	rosada	roja	rosada
Aspecto de piel	Verdosa	Naranja	Naranja	Naranja	Naranja
Espesor de la piel	delgada	delgada	delgada	delgada	delgada
Forma	ovalada	ovalada	redonda	ovalada	ovalada

$\bar{X} \pm SD$ = promedio \pm desviación estándar

gS/gF = gramos de la semilla / gramos del fruto

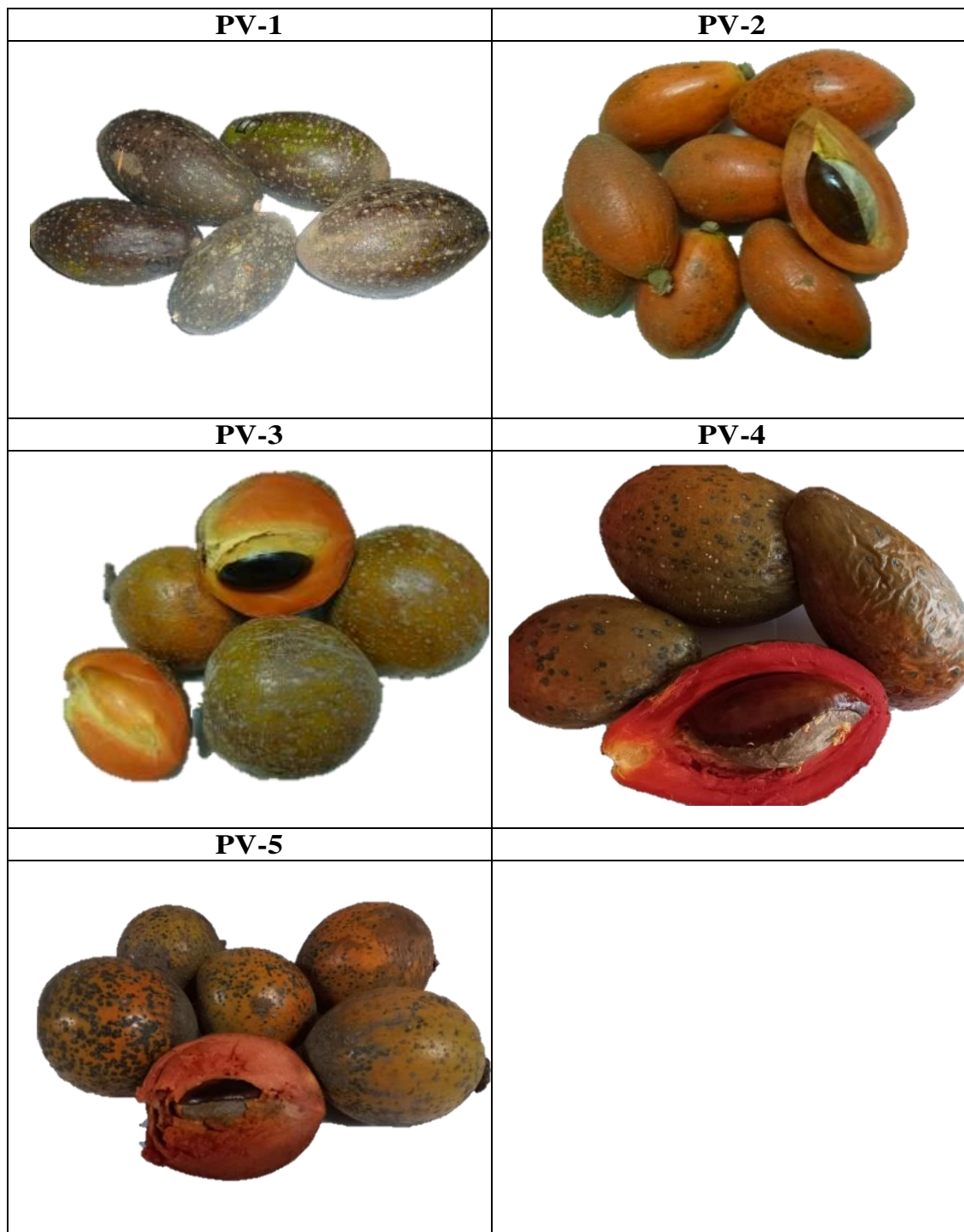


Figura 34. Muestras estudiadas de *Pouteria viridis* (PV).

En la figura 35 se presentan los cromatogramas de 6 muestras diferentes de *Pouteria sapota*. Se puede observar que los perfiles cromatográficos son claramente diferentes, comparando con las alturas de los picos.

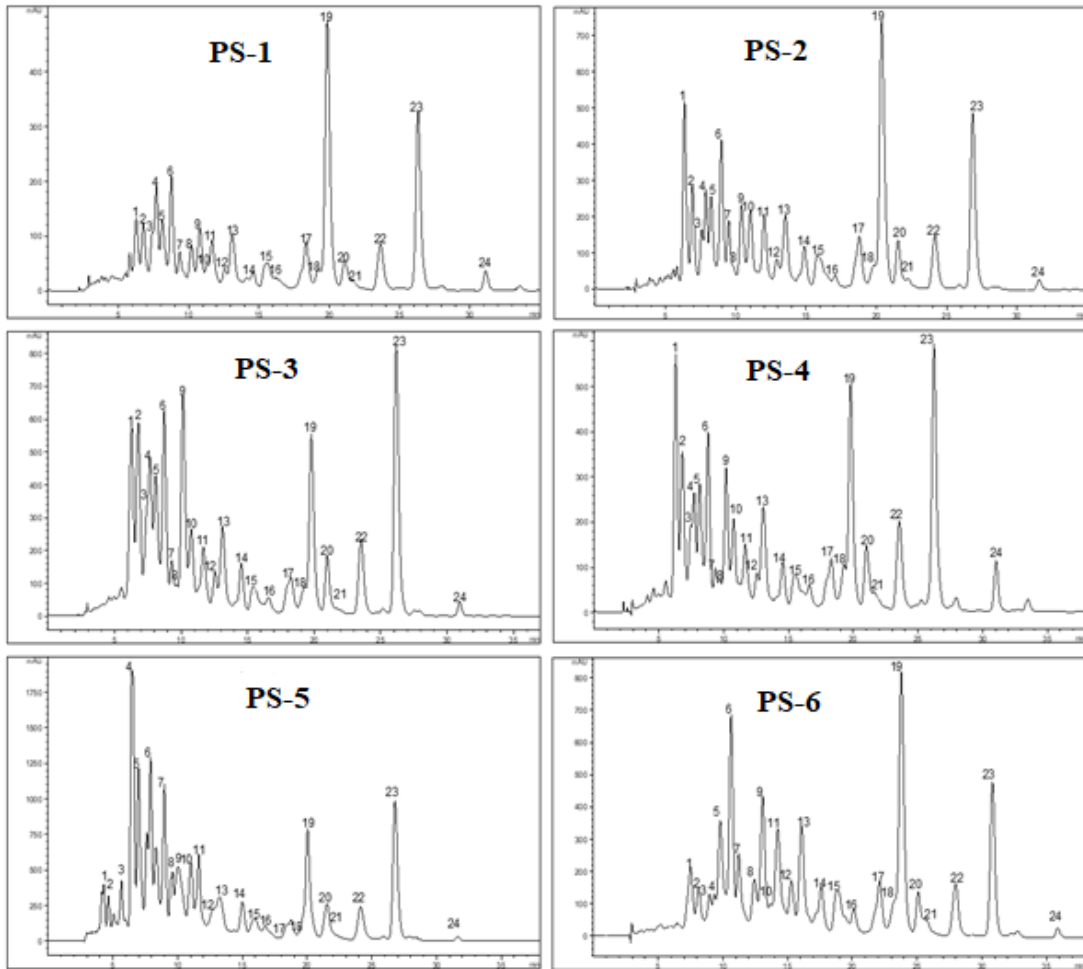


Figura 35. Cromatograma HPLC Analítica C-30 de las muestras PS-1, PS-2, PS-3, PS-4, PS-5 Y PS-6.

VII. CONCLUSIONES

Culminados los experimentos y analizados los resultados, la información obtenida nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. La adición de BHT como antioxidante disminuye de 13.47 a 5.38 % las pérdidas de carotenoides durante la saponificación.
2. Cuando los carotenoides se cuantifican como rojos y amarillos los valores son superiores a la cuantificación como β -caroteno (450 nm). La determinación de carotenoides rojos y amarillos es la opción más adecuada para cuantificar muestras como el mamey.
3. Combinando las cromatografías HPLC-DAD semi-preparativa C₁₈ con la analítica C₃₀ logramos resolver 5 mezclas del cromatograma HPLC analítico.
4. La proporción entre carotenoides rojos y amarillos caracteriza mejor a los carotenoides de un árbol de las especies que el contenido total ($\mu\text{g/g}$).
5. Los carotenoides rojos y los amarillos aumentan durante la maduración, siendo el aumento de rojos proporcionalmente mayor que el de los amarillos.
6. Las proporciones de neoxantina, violaxantina y capsoneoxantina disminuyen drásticamente cuando la fruta madura, mientras criptocapsina y sapotexantina aumentan.
7. Las tres especies de mamey contienen los mismos carotenoides y no existe un perfil de carotenoides entre las variedades de una especie que pueda considerarse característico de la especie.

VIII. RECOMENDACIONES

- La utilización de sustancia antioxidantes como BHT para minimizar las pérdidas de carotenoides durante la saponificación.
- En caso de extractos de mezclas complejas de carotenoides, que se utilice la combinación de las técnicas de HPLC para resolver picos que se superponen.
- Recomendamos que el color de la pulpa sea un criterio importante para la cosecha.
- Hacer una selección de variedades con potencial organolépticos aceptables y con alto contenidos de carotenoides para la domesticación y cultivos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Agócs, A. y Murillo, E. y Turcsi, E. y Béni, S. y Darcsi, A. y Szappanos, Á. y Kurtán, T. y Deli, J. (2018a). Isolation of allene carotenoids from mamey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 65, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.004>.
2. Alia-Tejacal, I. y Soto-Hernández, R. M.; y Colinas-León, M. T. y Martínez-Damián, M. T. (2017). Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *revista Chapingo serie horticultura*, 11(2), 225–231. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2004.04.025>.
3. Amaya-Rodriguez, D. B. (2001). *A guide to analysis in food*. 1-64.
4. Amorim-Carrilho, K. T. y Cepeda, A. y Fente, C. y Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>.
5. Antonio, M. y Peña, G. y Daniel, J. y Ramírez, L. y Toxqui, L. y Eugenia, A. y Regules, O. (2021). Los beneficios del consumo de carotenoides. May 2018.
6. Beltrán, B. y Estévez, R. y Cuadrado, C. y Jiménez, S. y Alonso, O. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes Intake of carotenes, xanthophyls and vitamin a. 27(4), 1334–1343. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5886>.
7. Berezki, I. y Papp, H. y Kuczmog, A. y Madai, M. y Nagy, V. y Agócs, A. y Batta, G. y Milánkovits, M. y Ostorházi, E. y Mitrović, A. y Kos, J. y Zsigmond, Á. y Hajdú, I. y Lőrincz, Z. y Bajusz, D. y Keserű, G. M. y Hodek, J. y Weber, J. y Jakab, F. y ... Borbás, A. (2021). Natural apocarotenoids and their synthetic glycopeptide conjugates inhibit sars-cov-2 replication. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ph14111111>.
8. Bobrowski, D. R. y Mercadante, A. Z. y Regina, L. y Mariutti, B. (2019). Marigold carotenoids: much more than lutein esters. *Food Research International*, 119, 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.043>.
9. Britton, G. (2009). *Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies*. Carotenoids book series, 5, 7–44.
10. Britton, G., Liaaen, S - Jensen., Pfander, H. (1995). *Carotenoids, isolation and analysis*.

11. Britton, G. y McLean, R. y Agócs, A. y Murillo, E. y Deli, J. y Nagy, V. (2011). Sapotexanthin, an A-Provitamin Carotenoid from Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/np1006982>.
12. Cacciola, F. y Giuffrida, D. y Utczas, M. y Mangraviti, D. y Dugo, P. y Menchaca, D. y Murillo, E. y Mondello, L. (2016a). Application of Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography for Carotenoid Analysis in Red Mamey (*Pouteria sapote*) Fruit. *Food Anal. Methods*, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0416-7>.
13. Calcuttawala, F. (2022). Nutrition as a key to boost immunity against COVID-19. *Clinical Nutrition ESPEN*, 49, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.04.007>.
14. Carranco, J. M. E. y Calvo, M. de la C. y Pérez-gil, F. R. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 1–6.
15. Carriço, C. y Pinto, Z. T. y Dutok, C. M. S. y Caetano, R. L. y Pessanha, R. R. y Chil-Nuñez, I. y Mendonça, P. M. y Escalona-Arranz, J. C. y Reyes-Tur, B. y Queiro, M. M. C. (2014). Biological activity of *Pouteria sapota* leaf extract on postembryonic development of blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Calliphoridae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.007>.
16. Cepeda, A. y Fente, C. y Regal, P. (2014). Trends in Analytical Chemistry Review of methods for analysis of carotenoids q. *Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>.
17. Chacón-Ordóñez, T. y Esquivel, R. P. (2013). Revisión frutos tropicales como fuente de carotenoides. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 1–23.
18. Chacón-ordóñez, T. y Schweiggert, R. M. y Bosy-westphal, A. y Jiménez, V. M. y Carle, R. y Esquivel, P. (2017). Carotenoids and carotenoid esters of orange- and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. *Food Chemistry*, 221, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.120>
19. Crans Yoon, A. y Lin, C. K. y Sheikh, J. (2015). The mamey sapote fruit (*Pouteria sapota*) as a novel cause of IgE-mediated allergic reaction. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 114(4), 352–353. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.01.011>.
20. Décosterd, L. A. y Dorsaz, A. C. y Hostettmann, K. (1987). Application of semi-preparative high-performance liquid chromatography to difficult natural product

- separations. *Journal of Chromatography A*, 406(C), 367–373. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94044-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94044-5)
21. Díaz, N. A. y Ruiz, J. A. B. y Reyes, E. F. y Cejudo, A. G. y Novo, J. J. y Peinado, J. P. y Meléndez-valdés, F. T. y Fiñana, I. T. (2010). 8 . Espectrofometría : Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 1–8.
 22. Divya, P. y Puthusseri, B. y Neelwarne, B. (2012). Carotenoid content , its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L .) varieties ☆. *FRIN*, 45(1), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.021>
 23. Domínguez, B. y Martínez-Morales, A. y Alia-Tejacal, I. (2010). Caracterización de la maduración en eco tipos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2), 122–129.
 24. Eggersdorfer, M. y Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
 25. Espinosa-Zaragoza, S. y Villegas-Monter, Á. y Saucedo-Veloz, C. y Corrales-García, J. y Avendaño, C. H. (2016). Características de calidad de zapote mamey (*Pouteria sapota* jacq .) seleccionado en Alpoyecá , Guerrero , México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 953–959.
 26. Fiedor, J. y Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *nutrients*, 6, 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
 27. Giuffrida, D. y MENCHACA, D. y DUGO, P. y DONATO, P. y CACCIOLA, F. y MURILLO, E. (2015). Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. *Fruits*, 70(3), 163–172.
 28. González, M. A. y Lozada, J. D. y Ortega, A. E. (2021). Carotenoids from mamey (*Pouteria sapota*) and carrot (*Daucus carota*) increase the oxidative stress resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100989>.
 29. González Peña, M. A. (2021). Evaluación de la capacidad antioxidante de los carotenoides de mamey (*Pouteria sapota*) y zanahoria (*Daucus carota*) (pp. 18–19).
 30. Harvey, D. (2000). Química Analítica Moderna. En *Química Analítica Moderna*.

31. Ishida, B. K. y Chapman, M. H. (2012). Effects of a hydrodynamic process on extraction of carotenoids from tomato. *Food Chemistry*, 132(3), 1156–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.036>.
32. Jatunov, S. y Quesada, S. y Díaz, C. y Murillo, E. (2010). Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactris gasipaes*. En *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* (Vol. 60).
33. Juin, F. y Shan, Y. y June, M. y Dee, W. (2012). LWT - Food Science and Technology Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.019>.
34. Khalil, Y. y Tazeddinova, D. y Aljoumaa, K. y Kazhmukhanbetkyzy, Z. y Orazov, A. y Toshev, A. (2021). Carotenoids: Therapeutic Strategy in the Battle against Viral Emerging Diseases, COVID-19: An Overview. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(3), 241–261.
35. Kulczyński, B. y Gramza-Michałowska, A. y Kobus-Cisowska, J. y Kmiecik, D. (2017). The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. *Journal of Functional Foods*, 38, 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.001>.
36. Kusmita, L. y Franyoto, Y. D. y Mutmainah, M. y Puspitaningrum, I. y Nurcahyanti, A. (2022). Bixa orellana L. carotenoids: antiproliferative activity on human lung cancer, breast cancer, and cervical cancer cells in vitro. *Natural Product Research*, 36, 67–73.
37. Lakey-beitia, J. y Doens, D. y Kumar, J. D. y Murillo, E. y Fernandez, P. y Rao, K. y Durant-Archibold, A. (2017). Anti-amyloid aggregation activity of novel carotenoids: implications for Alzheimer's drug discovery. *Clinical Interventions in Aging*, 12, 1–8.
38. León Hurtado, J. (1987). *Botánica de cultivos tropicales*.
39. López-legarda, X. y Taramuel-gallardo, A. y Arboleda-, C. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars Resumen Introducción. 29(2), 180–198.
40. Ma, G. y Zhang, L. y Yungyuen, W. y Sato, Y. y Furuya, T. y Masaki. Yahata y Yamawaki, K. y Kato. Masaya. (2018). Plant Physiology and Biochemistry Accumulation of carotenoids in a novel citrus cultivar ' Seinannohikari ' during the fruit maturation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.015>.

41. Mai, H. C. y Truong, V. y Debaste, F. (2016). Carotenoids purification from gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil. *Journal of Food Engineering*, 172, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.022>.
42. Martínez-González, M. E. y Balois Morales, R. y Alia-Tejacal, I. y Cortes-Cruz, M. A. y Palomino-Hermosillo, Y. A. y López-Gúzman, G. G. (2017). Postcosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 4075–4087. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.674>.
43. Martínez-Sovero, G. y Iglesias-Osores, S. (2020). Fenología de Sapotaceae de interés en la selva baja de la cuenca del río Madre de Dios. 1–13. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.1083>.
44. Mazzeo, T. y N'Dri, D. y Chiavaro, E. y Visconti, A. y Fogliano, V. y Pellegrini, N. (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128(3), 627–633. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.03.070>.
45. Meléndez-martínez, A. J. (2017). Carotenoides en agroalimentación y salud.
46. Meléndez-Martínez, A. J. y Vicario, I. M. y Francisco J., H. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149–155.
47. Morton, J. (1987). *Fruits of Warm Climates*.
48. Murillo, E. (2018a). Analysis Far UV peaks contribute for identification of carotenoids E / Z isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.037>.
49. Murillo, E. y Giuffrida, D. y Menchaca, D. y Dugo, P. y Torre, G. y Meléndez-Martínez, A. J. y Mondello, L. (2013a). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*, 140(4), 825–836. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.014>.
50. Murillo, E. y McLean, R. y Britton, G. y Agócs, A. y Nagy, V. y Deli, J. (2011). Sapotexanthin, an A-provitamin carotenoid from red mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of Natural Products*, 74(2), 283–285. <https://doi.org/10.1021/np1006982>.
51. Murillo, E. y Meléndez, M. A. J. y Portugal, F. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chemistry*, 122, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.034>.

52. Murillo, E. y Turcsi, E. y Szabó, I. y Mosquera, Y. y Agócs, A. y Nagy, V. y Gulyás-Fekete, G. y Deli, J. (2016). Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Agricultural and Food Chemistry*, 64, 7148–7155. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03146>.
53. Nagy, V. (2016). Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (*Pouteria sapota*). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03146>.
54. Nava, Y. y Ricker, M. (2005). Tres especies de Zapote en America Tropical Pouteria. Google Libros. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=zncZaH-3URMC&oi=fnd&pg=PR4&dq=mamey+verde+viridis&ots=8UKQ-SqkFX&sig=WBvvCX4Rb_amcd1D4FiknU7Icx0#v=onepage&q=mamey+verde+viridis&f=false.
55. Nazrul, S. y Nusrat, T. y Begum, P. y Ahsan, M. (2016). Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. *Food Chemistry*, 199, 628–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.057>.
56. Oliver, J. y Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 543–555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00329-0).
57. Pennington, T. D. (1990). Sapotaceae. Fl. Neotrop. En Monogr (Vol. 52, pp. 1–771).
58. Prabhu, D. S. y Selvam, A. P. y Rajeswari, V. D. (2018). Effective anti-cancer property of *Pouteria sapota* leaf on breast cancer cell lines. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 15, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.06.004>.
59. Prado-cabrero, A. y Beatty, S. y Stack, J. y Howard, A. y Nolan, J. M. (2016). Quantification of zeaxanthin stereoisomers and lutein in trout flesh using chiral high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.004>.
60. Provesi, J. G. y Dias, C. O. y Amante, E. R. (2011). Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, 128(1), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.027>.
61. Queiroz, E. F. y Alfattani, A. y Afzan, A. y Marcourt, L. y Guillarme, D. y Wolfender, J. L. (2019). Utility of dry load injection for an efficient natural products isolation at the semi-preparative chromatographic scale. *Journal of Chromatography A*, 1598, 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.03.042>.

62. Quesada, P. y Vargas, M. (2002). Distribución y variabilidad del zapote (*Pouteria viridis*) en Costa Rica. En repositorio.ucr.ac.cr. <http://repositorio.ucr.ac.cr/handle/10669/78504>.
63. Rodríguez, C. y Durant-Archibold, A. A. y Santana, A. y Murillo, E. y Abuín, C. M. (2018). Analysis of the volatile components of *Pouteria sapota* (Sapote Mamey) fruit by HS-SPME-GC-MS. *Natural Product Communications*, 13(8), 1027–1030.
64. Rodríguez-Amaya, D. B. (1999). Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. 10–12.
65. Rodríguez-Amaya, D. y Kimura, M. (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Technical Monograph series, 2, 1–63.
66. Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2015.04.001>.
67. Rojas-Garbanzo, C. y Pérez, A. M. y Bustos-Carmona, J. y Vaillant, F. (2011). Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour. *Food Research International*, 44(7), 2377–2384. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.02.045>.
68. Rosas, C. (2011). Contenido De Compuestos Bioactivos Y Su Contribución a La Capacidad Antioxidante Durante La Maduración De Piña Cv. “Esmeralda”. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
69. Saini, R. K. y Keum, Y. S. y Daglia, M. y Rengasamy, K. R. (2020). Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence. *Pharmacological Research*, 157(April), 104830. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104830>.
70. Saini, R. K. y Nile, S. H. y Park, S. W. (2015a). Carotenoids from fruits and vegetables : Chemistry , analysis , occurrence , bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76(3), 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>.
71. Saucedo Veloz, C. y Martínez Morales, A. y Chavez, S. y Soto-Hernández, M. (2001). Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) H . E . Moore & Stearn) tratados con etileno. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(2), 231–234.

72. Sherman, B. S. (1961). The effect of vitamin A on epithelial mitosis in vitro and in vivo. *The Journal of investigative dermatology*, 37(6), 469–480. <https://doi.org/10.1038/jid.1961.146>.
73. Solano Rivera, A. (1999). Comparación de variables fisicoquímicas evaluadas en frutas de tres especies del género *Pouteria*: *Pouteria sapota* (zapote), *Pouteria fossicola* (zapote tipo borucana), y *Pouteria viridis* (zapote verde o injerto), de la familia Sapotaceae. 1–61. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/419/1/18953.pdf>.
74. Su, Q. y Rowley, K. G. y Balazs, N. D. H. (2002). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781(1–2), 393–418. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00502-0](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00502-0).
75. Sun, T. y Tadmor, Y. y Li, L. (2020). Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage. *Plant and Food Carotenoids. Methods in Molecular Biology*, Humana, NY, 2083, pp 3-23.
76. Téllez, P. P. y Saucedo, V. C. y Arévalo, G. M. L. y Valle, G. S. (2009). Maduración de frutos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) tratados con 1-metilciclopropeno y refrigeración Ripening of mamey fruits (*Pouteria sapota* Jacq.) treated with 1-methylcyclopropene and refrigerated storage. *CyTA – Journal of Food*, 7(1), 45–51. <https://doi.org/10.1080/11358120902850750>.
77. Turcsi, E. y Murillo, E. y Kurta, T. (2015). Isolation of β - Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3' -Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01936>
78. Turcsi, E. y Murillo, E. y Kurta, T. y Szappanos, A. y Illyes, T.-Z. y Gulyas-Fekete, G. y Agocs, A. y Avar, P. y Deli, J. (2015). Isolation of β - Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3' -Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 6059–6065. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01936>.
79. Turcsi, E. y Nagy, V. y Deli, J. (2016). Journal of Food Composition and Analysis Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. A review of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.005>.
80. Velázquez Paulín, K. y Alvarado Sánchez, B. y Reyes Munguía, A. (2015). Historia del mamey *Pouteria sapota*.
81. Weber, D. y Grune, T. (2012). The contribution of b-carotene to vitamin A supply of humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(2), 251–258.

82. Yaroshevich, I. A. y Krasilnikov, P. M. y Rubin, A. B. (2015). Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Computational And Theoretical Chemistry*, 1070, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.07.016>.
83. Yoon, H. y Mok, H. y Young, M. y Yeon, J. y Kwon, O. (2016). Bioavailability of carotenoids from chlorella powder in healthy subjects: A comparison with marigold petal extract. *Journal of Functional Foods*, 21, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.036>.
84. Zaghoudi, K. y Pontvianne, S. y Framboisier, X. y Achard, M. y Kudaibergenova, R. y Ayadi-Trabelsi, M. y Kalthoum-cherif, J. y Vanderesse, R. y Frochot, C. y Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki L.*), peach (*Prunus persica L.*) and apricot (*Prunus armeniaca L.*). *Food Chemistry*, 184, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.072>.
85. Zhang, B. y Liu, J. y Cheng, L. y Zhang, Y. y Hou, S. y Sun, Z. y Hongying, L. y Han, Y. (2019). Carotenoid composition and expression of biosynthetic genes in yellow and white foxtail millet [*Setaria italica (L.) Beauv*]. *Journal of Cereal Science*, 85, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.11.005>.