

# CAROTENOIDES EN CEREALES

Elena Mellado-Ortega y Dámaso Hornero-Méndez



## INTRODUCCIÓN

Los cereales son alimentos de origen vegetal, básicos en la dieta, que se caracterizan por ser mayoritariamente fuentes de hidratos de carbono y proteínas, presentando un contenido en carotenoides relativamente bajo comparado con la mayoría de frutos y el resto de los vegetales. Sin embargo, el consumo diario de cereales y productos derivados por la mayoría de la poblaciones, especialmente las más desfavorecidas, los convierte en una fuente no despreciable de estos compuestos (Graham y Rosser, 2000) y en alimentos ideales para ser utilizados en estrategias de biofortificación (Bai *et al.*, 2011).

En el proceso de biofortificación de los cultivos en carotenoides, un paso imprescindible es la caracterización exhaustiva del perfil carotenóide existente en el vegetal. Este conocimiento facilita la exploración del metabolismo de los mismos, ya que este aspecto es el que se persigue. El éxito de tales procesos radica en la existencia de una

variabilidad más o menos amplia, entre los distintos cereales, para dicho contenido carotenoide. Esta variabilidad no es más que el reflejo de tres factores: a) genotipo del cereal, b) la selección de variedades, la presión ejercida por el hombre y la domesticación, y c) las condiciones de crecimiento, y el posterior almacenamiento y procesado (doméstico o industrial). En relación a estos últimos, la evaluación de dichos cambios es un área habitual de estudio de la tecnología de alimentos, lo cual permite estimar las condiciones óptimas para la preservación de estos compuestos, impulsado tanto por sus propiedades nutricionales como por las aplicaciones derivadas de su naturaleza como responsables del color de los alimentos. Los tratamientos térmicos y los que conllevan una homogenización de la matriz alimentaria, así como la composición de ésta, son factores que ejercen un efecto potenciador de la bioaccesibilidad de los carotenoides, ya que se facilita la solubilización de éstos. En este contexto, alimentos como los cereales, que habitualmente se consumen procesados, podrían presentar ventajas frente a los alimentos no procesados.

Hasta la fecha, existen numerosos datos sobre composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides en frutos y vegetales, pero muy pocos con respecto a los cereales, por lo que es necesario realizar estudios que permitan la caracterización de dicho perfil carotenoide en este tipo de alimentos. Las investigaciones dirigidas a mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides en cereales se beneficiarán, sin duda, del conocimiento así generado, que facilita la orientación y recomendaciones al consumidor sobre la adecuación de los hábitos de procesado y consumo de los alimentos básicos.

En el presente capítulo revisamos la información existente acerca de la composición y distribución de carotenoides

presentes en cereales, abordando factores que alteran este perfil, como el almacenamiento y procesado del alimento, así como las características y avances en el análisis de estos compuestos. Por otra parte, las estrategias para potenciar el contenido de carotenoides en cereales, ya sea mediante mejora clásica o manipulación genética, son también discutidas.

## COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOIDES EN CEREALES

Los cereales y sus derivados son buenos ejemplos de alimentos que contienen una mezcla compleja de compuestos de interés nutricional, como fenoles, folatos, vitamina E, ácido fólico, esteroides y carotenoides, estos últimos considerados minoritarios en relación a su concentración (McKevith, 2004). En general, en cereales estas especies químicas se concentran principalmente en las fracciones de salvado y germen, y la mayoría son más abundantes en la capa de aleurona. Asimismo, su contenido está sujeto a variaciones importantes atendiendo a factores como el tipo de cereal, la variedad, condiciones de cultivo, estadio de desarrollo, condiciones de almacenamiento o procesado (Liu, 2007; Fardet, Rock y Rémésy, 2008), cobrando especial relevancia las interacciones genotipo-ambiente (Hidalgo, Brandolini y Ratti, 2009; Van Hung y Hatcher, 2011; Lv *et al.*, 2013). El perfil carotenoide en cereales está conformado en su mayoría por xantofilas, siendo luteína la más abundante, seguida por zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, además de carotenos como  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno de forma minoritaria (figura 1). El embrión es el que presenta la mayor concentración de carotenoides, pero éste sólo representa entre el 3-5% del contenido total; por el contrario, la contribución del endospermo está en

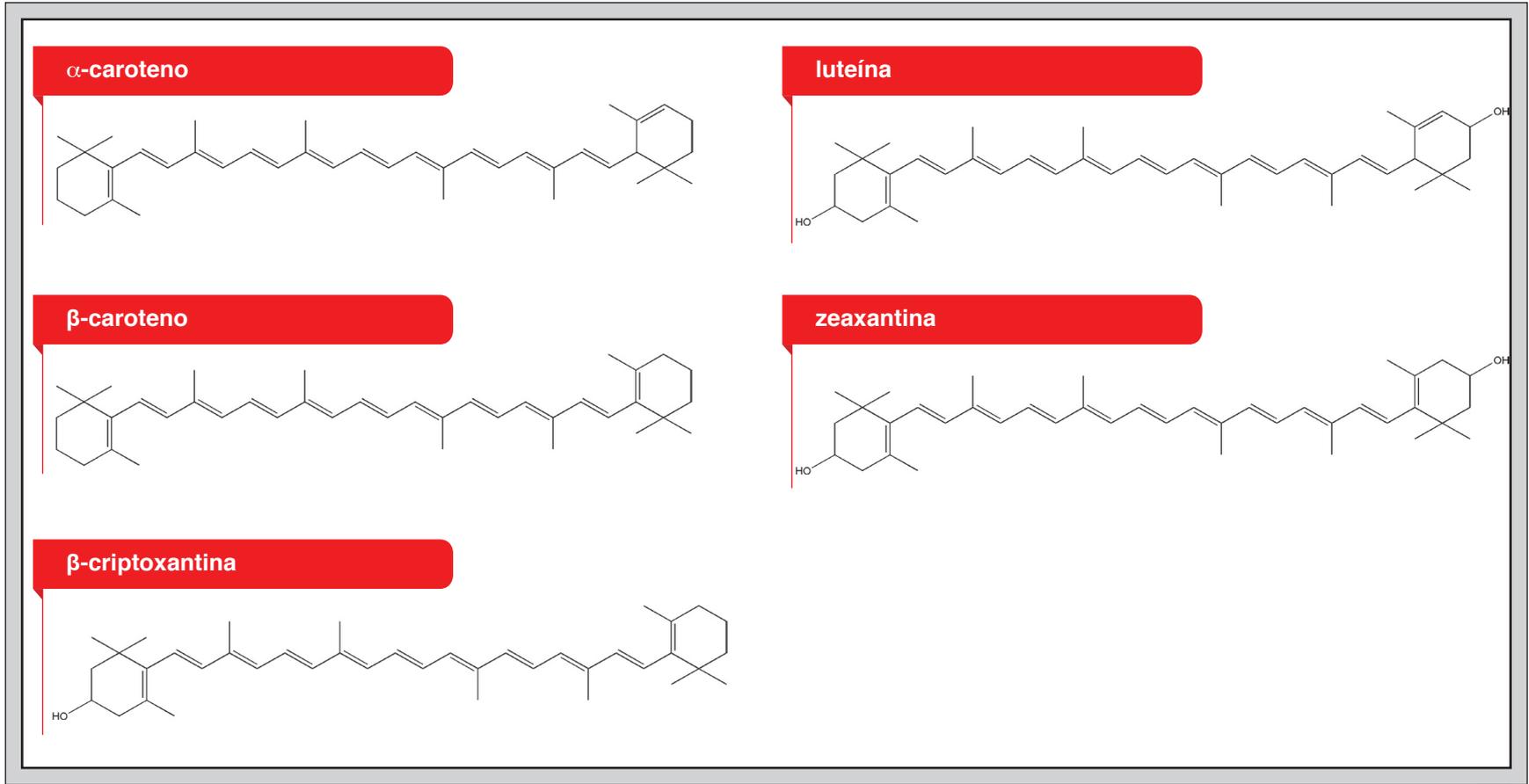


FIGURA 1. Estructura de los pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas) más comunes presentes en granos de cereales.

torno a 80-85% del grano de cereal, el que más influye en la contenido total de carotenoides del grano. La distribución de este perfil carotenoides parece variar entre genotipos de un mismo tipo de cereal (Siebenhandl *et al.*, 2007) y dentro del mismo grano, concentrándose  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina en el germen y salvado, mientras que luteína se distribuye más homogéneamente (Konopka, Kozirok y Rotkiewicz, 2004; Panfili, Fratianni y Distaam, 2004; Borrelli *et al.*, 2008; Ndolo y Beta, 2013). La bibliografía en relación a la composición de

carotenoides en cereales es bastante escasa, en especial para algunos como cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*) y mijo (*Panicum miliaceum*) (Choi, Jeong y Lee, 2007; Kandlakunta, Rajendran y Thingnganing, 2008; Mamatha, Sangeetha y Baskaran, 2011).

Entre todos los cereales, y aun siendo el nivel de carotenoides en estos alimentos relativamente bajo en comparación con frutas o verduras, podemos citar al maíz (*Zea mays*) de genotipo amarillo como el que presenta mayores niveles de

estos compuestos. La mayoría de los cultivares presentan zeaxantina como pigmento mayoritario y muestran también cantidades considerables de  $\beta$ -criptoxantina, y de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en menor medida (Panfili, Fratianni y Distaam, 2004). De los estudios cuantitativos realizados con este cereal se desprende que existe una gran variabilidad en el contenido de carotenoides entre variedades (Quackenbush *et al.*, 1961; Kurilich y Juvik, 1999; Egesel *et al.*, 2003; Berardo *et al.*, 2004; 2009), lo que evidencia que el genotipo es el factor más determinante en dicha variabilidad (Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Ibrahim y Juvik, 2009) seguido de las condiciones de almacenamiento y procesado (Scott y Eldridge, 2005; De Oliveira y Rodríguez-Amaya, 2007; Burt *et al.*, 2010).

En el caso del arroz (*Oryza sativa*) obviamente son las variedades pigmentadas las que resultan de mayor interés desde el punto de vista cuantitativo. El grano de arroz convencional concentra su contenido en carotenoides, casi en exclusividad, en el salvado (Fardet, Rock y Rémésy, 2008; Sellappan *et al.*, 2009) por lo que las habituales prácticas de molienda y pulido del grano conllevan una reducción drástica de estos componentes en el producto que llega al consumidor (Tan *et al.*, 2005). Al igual que para casi todos los cereales, la luteína resulta ser el pigmento mayoritario (Belefant-Miller y Grace, 2010), estando acompañada de zeaxantina y  $\beta$ -caroteno en cultivares de pigmentación oscura o negra (Frei y Becker, 2005; Lamberts y Delcour, 2008; Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008; Kim *et al.*, 2010). En algunas variedades de arroces negros tailandeses la concentración de  $\beta$ -caroteno en el salvado (33.58-41.48  $\mu\text{g/g}$ ) puede ser considerable (Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008).

Un estudio reciente realizado con semillas de mijo ha puesto de manifiesto su considerable contenido en  $\beta$ -caroteno (5.3-6.3

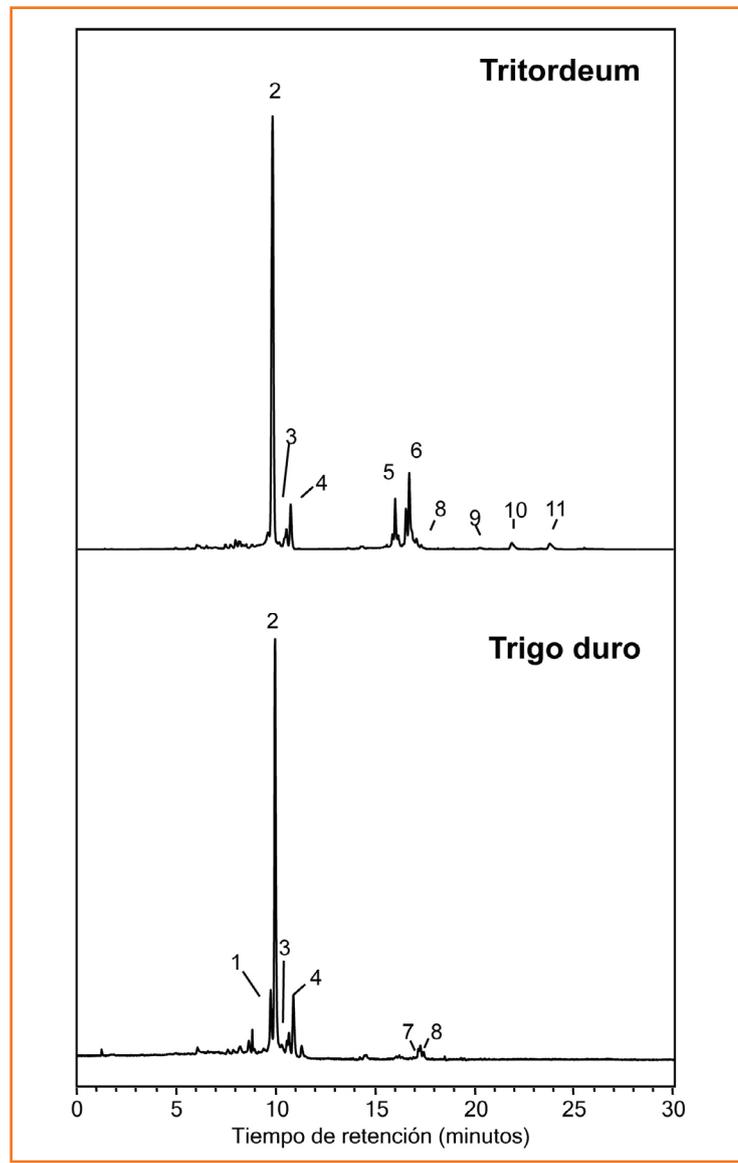
$\mu\text{g/g}$ ), siendo éste el pigmento mayoritario en este cereal (Li y Beta, 2012). Con respecto al sorgo (*Sorghum bicolor*), aunque ha sido considerado como uno de los cereales con menor contenido de carotenoides, los trabajos pioneros de Blessin, VanEtten y Wiebe (1958) y Suryanarayana Rao, Rukmini y Mohan (1968) sobre variedades de endospermo amarillo, así como los recientes estudios de Kean *et al.* (2007, 2011), ofrecen mejores perspectivas. Estos autores encontraron un contenido de carotenoides entre 0.11-0.32 mg/kg que, aunque sigue siendo bastante más bajo que el correspondiente del maíz amarillo, no debe ser despreciado dada la importancia de este cereal en la dieta de algunas poblaciones. La avena (*Avena sativa*) también se cita en la bibliografía como uno de los cereales con menor nivel de carotenoides, ya que presenta contenidos de luteína y carotenos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno) del orden de 0.20 mg/kg y 0.01 mg/kg, respectivamente (Panfili, Fratianni y Distaam, 2004).

El trigo (genero *Triticum*), junto con el maíz y el arroz, son los cereales más populares debido a su consumo generalizado. Este aspecto se ve más que constatado en la literatura, y existe interés especial en estudiar su perfil de compuestos saludables, así como la distribución inter- e intravarietal de los mismos (Lier y Lacroix, 1974; Velioglu *et al.*, 1998; Adom, Sorrells y Liu, 2003, 2005; Zhou, Su y Yu, 2004; Zhou y Yu, 2004; Okarter *et al.*, 2010; Di Silvestro *et al.*, 2012). Al igual que en maíz, la variabilidad genética encontrada entre genotipos para el contenido de carotenoides ofrece una herramienta interesante que puede ser adecuadamente utilizada en programas de mejora dirigidos a aumentar el contenido en compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (Leenhardt *et al.*, 2006; Digesù *et al.*, 2009). Los trigos de genoma diploide, en particular el trigo Einkorn (*Triticum monococcum*), están considerados como los que presentan

unos niveles más altos, aproximadamente del orden de dos a cuatro veces con respecto a los demás trigos. El trigo Einkorn también destaca por una mayor actividad antioxidante *in vitro* (Lavelli *et al.*, 2009). Seguidos de éstos se encuentran los trigos tetraploides, y en este caso son los trigos duros (*Triticum turgidum* conv. *durum*) los que presentan mayor contenido de carotenoides (en torno a 5-6 µg/g), aunque podemos mencionar otros, como el trigo ancestral Emmer (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) con niveles similares (aproximadamente de 3-5 µg/g). Por último, los trigos de genoma hexaploides están considerados los de menor contenido de carotenoides, pero se presta atención casi en exclusividad al trigo harinero común (*T. aestivum*) cuyo contenido medio está en torno a 2 µg/g (Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2008; Serpen *et al.*, 2008). Estos datos cuantitativos no son más que un reflejo de la selección y domesticación realizada por el hombre. Las especies cultivadas presentan mayor contenido que las variedades silvestres, fruto de la actividad de los programas de mejora y selección dirigida hacia variedades con un mayor contenido en nutrientes, entre los que destacan los carotenoides (Digesù *et al.*, 2009). Un ejemplo lo constituye el trigo duro, que ha sido ampliamente analizado debido a que el color amarillento de la sémola (también referido como *yellow pigment content*, YPC) está considerado como uno de los principales criterios de calidad de los productos derivados, principalmente la pasta, (Hentschel *et al.*, 2002; Humphries, Graham y Mares, 2004; Fratianni *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2011). La situación inversa ocurre con el trigo harinero, que como ya se indicó, presenta los niveles más bajos de carotenoides debido a la presión ejercida por el hombre, motivada por la preferencia de harinas cada vez más blancas para la posterior generación de derivados por exigencias del mercado.

La tribu *Triticeae*, que incluye las especies de trigo, cebada y centeno, es una serie de poliploides que se encuentran estrechamente relacionados, siendo posible generar híbridos anfiploides fértiles entre diferentes miembros cultivados de dicha tribu y sus parientes silvestres. Entre los cereales híbridos debemos destacar tritordeum, un novedoso cereal con carácter funcional. Se trata de un cereal obtenido a través del cruce entre una cebada silvestre, *Hordeum chilense*, de genoma diploide ( $H^{ch}H^{ch}$ ), y trigos diploides y poliploides (Martín y Chapman, 1977). El uso de *H. chilense* en los programas de mejora se ha centrado también, además del desarrollo de anfiploides como tritordeum, en la introgresión hacia el trigo de nuevos rasgos de mayor interés. Entre los atributos transferidos destaca un alto contenido de carotenoides localizado en el cromosoma  $7H^{ch}$ . Los primeros híbridos fértiles, con características óptimas para convertirse en un posible cultivo, se obtuvieron con los cruces de *H. chilense* y *T. turgidum* (trigo duro, tetraploide, de dotación genómica AABB), produciéndose así los denominados tritordeum hexaploides ( $2n=6x=42$ ,  $H^{ch}H^{ch}AABB$ ), que mostraban una baja frecuencia de aneuploides, una amplia variación en la tasa de crecimiento y un grado óptimo de fertilidad (Martín y Sánchez-Monge, 1982).

La mayoría de las estimaciones del contenido carotenoide realizadas en tritordeum no proporcionan información de la composición individualizada del perfil de pigmentos, debido a las metodologías analíticas tradicionalmente empleadas en cereales. Mediante las estimaciones como YPC se han descrito en líneas de tritordeum unos niveles en carotenoides del orden de cinco a seis veces superior (en el rango de 11-13 µg/g) con respecto a trigo harinero (2 µg/g) y de dos a tres veces superior con respecto a trigo duro (5-6 µg/g) (Álvarez *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 1999), siendo comparable a los niveles que caracterizan al trigo Einkorn. En un estudio más completo, en



**FIGURA 2.** Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos directos de pigmentos carotenoides obtenidos de granos de tritordeum y trigo duro. Identidad de los picos: 1. all-*trans*-Zeaxanteno; 2. all-*trans*-Luteína; 3. 9-*cis*-Luteína; 4. 13-*cis*-Luteína; 5. Luteína-monolinoleato; 6. Luteína-monopalmitato; 7.  $\alpha$ -caroteno; 8.  $\beta$ -caroteno; 9. Luteína dilinoleato; 10. Luteína linoleatopalmitato; 11. Luteína dipalmitato.

el que se evaluó un total de 35 líneas primarias de tritordeum junto con sus respectivos parentales, 27 accesiones de *H. chilense* y 19 cultivares de trigo duro, los niveles medios de carotenos ( $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno, YPC) para el anfiploide seguían siendo del orden de dos veces superior al parental de trigo duro pero tres veces inferior a la media de *H. chilense* (Álvarez, Martín y Martín, 1999). Dentro de las líneas avanzadas de tritordeum, HT621 se encuentra registrada como línea élite de germoplasma destacando por su alto contenido en pigmentos carotenoides ( $19 \mu\text{g}$  equivalentes de  $\beta$ -caroteno/g, YPC) (Ballesteros *et al.*, 2005).

Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio (Atienza *et al.*, 2007; Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012) han contribuido sustancialmente a la caracterización y cuantificación de pigmentos carotenoides individuales en tritordeum por vez primera. Al igual que para la mayoría de los cereales, luteína es también el pigmento mayoritario (>85%) destacando una alta esterificación (monoésteres y diésteres) de la misma, acompañada también de cantidades menores de  $\beta$ -caroteno (figura 2). Como media, el contenido total de carotenoides en tritordeum ( $6.5 \mu\text{g/g}$  de peso fresco) fue significativamente superior, aproximadamente ocho veces mayor, cuando se comparó con el de trigo duro ( $0.7 \mu\text{g/g}$  de peso fresco).

Actualmente, tritordeum está siendo sometido a un intenso programa de mejora desarrollado en el Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) en Córdoba, para optimizar su uso como un nuevo cereal y su incorporación a la formulación de alimentos funcionales. Sus zonas de cultivo se concentran en España (Andalucía, Castilla y Cataluña), sur de Italia y sur de Portugal. En 2008 fue registrada, con el nombre Aucán, la primera línea de tritordeum en el European Community Plant Variety

Registration (CPVO), y otras líneas están avanzadas en sus últimas fases de desarrollo y evaluación. Como resultado de estos esfuerzos, a principios de 2013, la empresa española Agrasys ([www.agrasys.es](http://www.agrasys.es)) ha comenzado la comercialización de harinas de tritordeum bajo la marca Vivagran®.

## ANÁLISIS DE CAROTENOIDES EN CEREALES

El análisis de carotenoides en cereales, al igual que en la mayoría de las muestras biológicas, con independencia de su origen, se compone de tres etapas básicas: preparación de la muestra, extracción y separación o aislamiento de los pigmentos, y posterior cuantificación de los mismos. Debido a las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas, pueden existir problemas en cualquiera de los pasos analíticos, como degradación de los pigmentos por oxidación, extracción incompleta o isomerización *cis-trans*. Todo ello obliga a tomar una serie de precauciones en la rutina del laboratorio. Estos aspectos han sido ampliamente tratados por diversos autores (Britton, 1985; Tee y Lim, 1991; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Oliver y Palou, 2000; Rodríguez-Amaya, 2001; Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez y Pérez-Gálvez, 2002) y en el capítulo 2 .

Un problema generalizado en la estimación cuantitativa de carotenoides en cereales es la incompleta extracción de los pigmentos, como por ejemplo a partir de granos de trigo duro o productos derivados como sémolas y pastas (Burkhardt y Böhm, 2007), lo que genera estimaciones erróneas, que ponen de manifiesto la necesidad de optimizar los protocolos empleados para cada matriz (Hentschel *et al.*, 2002).

Debido a que el color de los productos derivados del trigo

duro es un criterio de calidad importante, la determinación de pigmentos en esta matriz, y en cualquiera de sus presentaciones, ha sido la más estudiada en cereales. La metodología normalmente empleada en la bibliografía se puede agrupar en dos tipos principales. Por un lado los métodos destructivos, que implican la extracción química y determinación espectrofotométrica (métodos oficiales o métodos alternativos) y, por otro, los métodos no destructivos, basados en su mayoría en mediciones colorimétricas mediante reflectancia, NIRS, CIE ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) (Berardo *et al.*, 2004, 2009; Humphries, Graham y Mares, 2004). Como prerrequisito del análisis, en algunos casos es necesario el tratamiento de la muestra antes de realizar la extracción, con el objetivo de facilitar la liberación de pigmentos desde la matriz, al tiempo que se aumenta la homogeneidad de la muestra. Generalmente en cereales este proceso implica la molienda, mediante la cual se reduce la muestra a una harina. Esta operación puede ser por vía seca o húmeda, en cuyo caso molienda y extracción se hacen simultáneamente. En este último caso el extracto obtenido debe ser filtrado o centrifugado y posteriormente el residuo es sometido a otras extracciones hasta el agotamiento del color.

Entre los métodos oficiales de determinación de pigmentos aplicables a cereales existen dos muy conocidos para la extracción y valoración del llamado *Yellow Pigment Content* (YPC) los cuales se encuentran registrados para trigo duro (sémolas y harinas), método 152 de la ICC (International Association for Cereal Science and Technology) y el método 14-50 de la AACCC (American Association of Cereal Chemists). Ambos métodos se basan en la extracción de los pigmentos mediante 1-butanol saturado en agua seguido de cuantificación espectrofotométrica, expresando la concentración de pigmentos mediante equivalentes de  $\beta$ -caroteno. En los últimos

años las deficiencias en ambos métodos se han hecho cada vez más patentes, llevando a los analistas a utilizarlos con fines comparativos y complementarios otros más fiables (Fратиanni *et al.*, 2005; Beleggia *et al.*, 2010), así como a desarrollar modificaciones o adaptaciones en los mismos. Mediciones a otras longitudes de onda, estimación del cálculo de concentración con base en la luteína como pigmento principal (Abdel-Aal *et al.*, 2007; Burkhardt y Böhm, 2007), junto con la reducción del material necesario para el análisis (micro-escala) (Santra, Rao y Tamhankar, 2003; Beleggia *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013) se encuentran entre las modificaciones más frecuentes.

La elección del disolvente es un aspecto de suma importancia para la extracción de antioxidantes en alimentos (Taungbodhitham *et al.*, 1998). Zhou y Yu (2004a) observaron un efecto muy acusado del disolvente empleado al estimar la actividad antioxidante de fracciones de salvado de trigo, obteniendo los mejores resultados con la mezcla acetona y agua (50:50). Esto ha llevado a algunos autores a comparar distintos disolventes como alternativa al propuesto en los métodos oficiales (Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007). Los disolventes alternativos más habituales son acetona, etanol, metanol, tetrahidrofurano, mezclas de éstos e incluso mezclas con agua (acetona-agua, 80:20). Un procedimiento muy generalizado en el análisis de carotenoides es la eliminación de materia grasa en los extractos obtenidos, siendo la saponificación alcalina el método más comúnmente empleado. En muchos casos, la etapa de saponificación se traduce en una simplificación del análisis cromatográfico al eliminar sustancias interferentes (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Sin embargo, también conlleva una pérdida de información estructural relevante ya que elimina los ésteres de xantofilas con ácidos grasos, además de la fracción clorofílica en caso de estar presente. Uno de los métodos más utilizados

es la saponificación con el uso de disoluciones metanólicas de NaOH o KOH, normalmente entre el 10-30% (p/v) a temperatura ambiente, (Konopka, Czaplicki y Rotkiewicz, 2006; Kean *et al.*, 2007; Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008). Egesel *et al.* (2003) emplearon un porcentaje de 80% a 85°C, y Xu *et al.* (2010) y Hu y Xu (2011) lo usaron para el análisis de carotenoides en granos de maíz reduciendo así el tratamiento a 10 minutos, aunque estas condiciones tan agresivas pueden, sin lugar a dudas, generar pérdidas significativas de pigmentos por degradación oxidativa, derivando en una inevitable infravaloración del contenido de carotenoides. Rivera y Canela (2012) han investigado recientemente la influencia del procesado y acondicionado de las muestras y del disolvente de extracción en el análisis de carotenoides en maíz.

En general, el extracto que se obtiene después de extraer y saponificar (según el caso), consta de una mezcla de pigmentos de distinta polaridad, tanto carotenos como xantofilas. La evolución de las técnicas de separación de pigmentos ha experimentado una profunda transición desde el empleo de sistemas de reparto de fases hasta las técnicas cromatográficas (clásicas y modernas), promovido especialmente por el desarrollo continuo de diferentes fases estacionarias (Rizolo y Polesello, 1992; Oliver y Palou, 2000). Hoy en día, el análisis de pigmentos carotenoides en cereales se realiza principalmente mediante HPLC, facilitando la composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides individuales de una muestra, en contraposición de la información que puede obtenerse por los métodos colorimétricos o los espectrofotométricos oficiales. Las técnicas cromatográficas clásicas, ampliamente utilizadas en el pasado, como la cromatografía en columna abierta (OCC) o en capa fina (TLC) (Quackenbush *et al.*, 1961; Blessin, 1962; Lepage y Sims, 1968) han sido completamente sustituidas por

HPLC para la determinación de carotenoides en cereales. No obstante, la técnica de TLC permanece en uso en la actualidad de forma complementaria, ya que es esencial para pruebas identificativas y necesaria para la obtención de estándares.

Con respecto a la aplicación de métodos de HPLC para el análisis de carotenoides en cereales, la técnica más habitual suele ser la fase reversa usando como fases estacionarias octadecilsilano (C<sub>18</sub>) o triacontilsilano (C<sub>30</sub>). Esta última aumenta la interacción entre la fase sólida y el analito (revisado por Sander, Sharpless y Pursch, 2000). Esto ha supuesto un avance en el poder de resolución cromatográfico que facilita la identificación de isómeros geométricos (O'Neil y Schwartz, 1992). La fase C<sub>30</sub> ha sido utilizada ampliamente para la separación de pigmentos en cereales como maíz (Moros *et al.*, 2002; Egesel *et al.*, 2003; Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008; Xu *et al.*, 2010; Hu y Xu, 2011), cebada (Siebenhandl *et al.*, 2007), trigo (Konopka, Czaplicki y Rotkiewicz, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Digesù *et al.*, 2009; Werner y Böhm, 2011) y arroz (Nakornriab, Sriseadka y Wongpornchai, 2008; Kim *et al.*, 2010). Sin embargo, Kean *et al.* (2007) emplearon una columna polimérica C<sub>18</sub> para el aislamiento de carotenoides en granos de sorgo consiguiéndolo en 30 minutos, aunque obtuvieron en cambio una resolución parcial de los isómeros *cis*. Leenhardt *et al.* (2006) utilizaron la misma columna para establecer una correlación entre las determinaciones de pigmentos espectrofotométricas y la obtenida por HPLC en trigos harineros; la misma comparación más exhaustiva fue realizada por Luterotti *et al.* (2013) con harinas y sémolas de maíz. Di Silvestro *et al.* (2012) se suman al empleo de columna C<sub>18</sub> para la valoración de pigmentos en un estudio amplio con diversas variedades de trigo. Recientemente, se han desarrollado métodos rápidos y sensibles para la medida de carotenoides en trigo duro y maíz transgénico mediante el empleo de la

técnica UPLC (Van Hung y Hatcher, 2011; Rivera *et al.*, 2013).

En relación con la fase móvil, la mezcla de disolventes polares como metanol, acetonitrilo, acetona, metil *tert*-butil éter y agua se encuentran entre los más utilizados (Hentschel *et al.*, 2002; Moros *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza *et al.*, 2007; Belefant-Miller y Grace, 2010; Lachman, Hejtmánková y Kotíková, 2013). Como alternativa a la fase reversa, la cromatografía en fase normal de sílice también ha sido tradicionalmente aplicada en cereales (Weber, 1987; Panfili, Fratianni y Distaam, 2004). Los gradientes de elución durante la separación también son preferidos aunque los sistemas de elución isocrático se emplean en algunas ocasiones (Serpen *et al.*, 2008). La efectividad de la separación depende en gran medida del tamaño de partícula; siendo las más empleadas de 3 y 5 µm de diámetro; éste constituye un campo en desarrollo con la aparición de la técnica UPLC y la utilización de partículas inferiores a 1.7 µm, así como las novedosas fases de núcleo rígido de 2.6 µm que posibilitan obtener resoluciones y tiempos de análisis similares a los de UPLC en sistemas cromatográficos convencionales. La detección de los pigmentos se lleva a cabo principalmente con detectores espectrofotométricos de ultravioleta-visible. Los de longitud de onda variable y los detectores de diodos en línea (DAD) son los más empleados debido a la posibilidad de obtener el espectro de absorción completo (revisado por Huber y George, 1993; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Para la cuantificación de los pigmentos mediante HPLC se pueden emplear tanto estándares internos como externos bien de origen comercial o aislados a partir de fuentes naturales. La combinación acoplada de HPLC con detectores de espectrometría de masas (HPLC-MS) ha supuesto una mejora sustancial en la identificación de los pigmentos, aportando una mayor especificidad y resolución de mezclas complejas

(Van Breemen, 1997). La técnica en tándem de HPLC-DAD-MS se ha empleado con éxito para el análisis de carotenoides en cereales, utilizando como técnicas de ionización el electrospray (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Zhou, Su y Yu, 2004; Moore *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza, *et al.*, 2007). Recientemente se han utilizado estas técnicas para la caracterización por vez primera de los regioisómeros de monoésteres y diésteres de luteína in tritordeum (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). La fracción de monoésteres la conforman los regioisómeros luteína-3'-*O*-linoleato, luteína-3-*O*-linoleato, luteína-3'-*O*-palmitato y luteína-3-*O*-palmitato, mientras que la fracción de diésteres está integrada por dos homoésteres, luteína dilinoleato y luteína dipalmitato, y por los dos regioisómeros de un heretodiéster, luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato.

La literatura reciente cuenta con revisiones actualizadas sobre las herramientas analíticas y espectrométricas de aplicación en la determinación de pigmentos carotenoides en diversas fuentes (Rivera y Canela-Garayoa, 2012; Van Breemen, Dong y Pajkovic, 2012; Arvayo-Enríquez *et al.*, 2013; Rivera, Christou y Canela-Garayoa, 2013; Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

## TECNOLOGÍA DE CEREALES Y SU INFLUENCIA SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN GRANOS Y PRODUCTOS DERIVADOS

Las condiciones de conservación y almacenamiento, así como las distintas técnicas de procesado, implican por lo general cambios en los componentes de los alimentos, por lo que su estudio es crucial en el campo de la tecnología de alimentos,

por ser determinantes de muchos atributos de calidad sensorial y nutricional (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Nicoli, Anese y Parpinel, 1999; Rodríguez-Amaya, 2003; Kalt, 2005). En relación con estos aspectos se deben diferenciar el efecto del propio procesado del alimento, las variables medioambientales, tales como presión parcial de oxígeno, temperatura, luz y humedad bajo las que se desarrolla el tratamiento, y las interacciones con otras moléculas antioxidantes y pro-oxidantes presentes (Lindley, 1998; Nicoli, Anese y Parpinel, 1999). En el caso de los carotenoides presentes en los cereales, el almacenamiento de los granos y productos derivados se traduce generalmente en una disminución del contenido de pigmentos, y es directamente proporcional a la duración del proceso y al incremento e intensidad de otras variables, como la temperatura o el concurso de procesos de degradación (Cristóbal, 1965; Weber, 1987). Resulta llamativo que la bibliografía concerniente a este aspecto sea especialmente escasa, ya que los cereales se caracterizan por experimentar periodos de almacenamiento prolongados como parte de su tratamiento tecnológico industrial. Por otro lado resulta complicado definir una pauta generalizada en el comportamiento o afectación de los pigmentos para procesos como descascarillado, molienda, secado, horneado, fermentación, etc., ya que en la bibliografía se encuentran resultados muy dispares. En general estos procesos afectarán la estructura interna de la matriz del cereal o producto derivado, con implicaciones importantes en relación con la accesibilidad y posterior biodisponibilidad de los carotenoides (Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008; Kean *et al.*, 2011; Maiani *et al.*, 2009).

La velocidad a la que acontecen estos cambios ha sido materia de estudio generalizada en tecnología de alimentos. La bibliografía sobre cinética de carotenoides en alimentos es tan numerosa como dispar, por lo tanto es una temática en la que existen resultados a menudo contradictorios (Mínguez-

Mosquera *et al.*, 1997). La abundancia de tales trabajos refleja la importancia de los pigmentos carotenoides no sólo desde el punto de vista nutricional, sino también desde el tecnológico para la industria alimentaria, pues es de interés no sólo cuantificar las pérdidas también analizar las condiciones que proporcionen mayor estabilidad y retención de los mismos. El color es considerado uno de los principales criterios de aceptación de los productos por los consumidores. En la industria harino-panadera y en el sector de pastas y sémolas este criterio también es importante, en especial, para los productos derivados de trigo duro.

Las investigaciones al respecto intentan por lo tanto reproducir las condiciones de procesado y almacenamiento de los alimentos, incluidos los cereales. Con ello se pretende comparar entre los distintos tratamientos industriales y monitorear la incidencia individual o conjunta de factores como actividad del agua, temperatura, luz, oxígeno, pH y otras sustancias pro-oxidantes o antioxidantes (Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1994; Tsimidou, 1997; Selim, Tsimidou y Biliaderis, 2000; Fish y Davis, 2003; Ouchi *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2012). De esta forma se puede estimar la vida útil de los alimentos y la de sus componentes bioactivos. La mayoría de los estudios se han realizado en alimentos vegetales como zanahorias (Wagner y Warthesen, 1995; Koca, Burdurlu y Karadeniz, 2007; Lemmens *et al.*, 2010), tomate (Sharma y Le Maguer, 1996; Tonon, Baroni y Hubinger, 2007); pimiento y derivados (Carbonell *et al.*, 1986), patata o papa (Bechoff *et al.*, 2010), y zumos o jugos de cítricos (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Zepka *et al.*, 2009) y es habitual que los autores describan una reacción de degradación que cursa según una cinética de orden 0 o 1. Sin embargo, la bibliografía es bastante limitada para el caso particular de los cereales, debido probablemente al bajo nivel de pigmentos que éstos presentan, y existen muy

pocos estudios en los que se realice una valoración cinética detallada (Guzmán-Tello y Cheftel, 1990; Hidalgo y Brandolini, 2008a; Mellado-Ortega, 2013). No obstante, aunque no se cuantifiquen dichas alteraciones, en la mayoría de los trabajos con cereales, los autores coinciden en indicar que los cambios acontecen en general más rápido al inicio de los procesos de almacenamiento y conforme progresan se amortigua la velocidad de las pérdidas que se registran (Quackenbush, 1963; Burt *et al.*, 2010).

## ESTABILIDAD DE LOS CAROTENOIDES DURANTE EL ALMACENAMIENTO POSCOSECHA DE GRANOS Y HARINAS

Los procesos de almacenamiento conllevan pérdidas de carotenoides promovidas en su mayoría por procesos de oxidación, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática. El oxígeno presente en el medio está considerado como el factor con mayor influencia en relación a la estabilidad de los carotenoides (Britton y Khachik, 2009). Otras modificaciones de la molécula carotenoide asociadas a estos procesos son las isomerizaciones geométricas (*Z/E* o *cis-trans*) promovidas por la temperatura o la luz, y que conllevan alteraciones de la actividad biológica de los pigmentos más que pérdidas netas. Los mecanismos de ambos procesos han sido ampliamente estudiados (El-Agamey y McGarvey, 2008; Liaaen-Jensen y Lutnaes, 2008). Mientras que en los almacenamientos de granos de cereal la oxidación de los pigmentos viene mediada prácticamente por el oxígeno, en los de productos derivados como las harinas, entre otros, la alteración de la matriz conlleva no sólo procesos oxidativos directos sino también mediados por enzimas al facilitar el contacto entre éstas y los carotenoides (Doblado-Maldonado *et al.*, 2012).

Como ya se comentó, los resultados obtenidos en estos experimentos dependen básicamente de las condiciones empleadas, las variables más evaluadas son la duración del tratamiento y la temperatura. En la bibliografía se encuentran ejemplos en los que se observan claramente los efectos de estas dos variables, lo que permite predecir su repercusión en la estabilidad de los carotenoides presentes (Arya y Parihar, 1981; Farrington, Warwick y Shearer, 1981; Pinzino, Nanni y Zandomenighi, 1999; Calucci *et al.*, 2004; Nghia *et al.*, 2006; Hidalgo y Brandolini, 2008a).

En ocasiones, los diseños experimentales cubren, además del propio almacenamiento, una práctica de procesado habitual en tecnología de cereales (como el secado, la molienda y el descascarillado). Esto amplía el estudio, pero por otro lado dificulta en cierta medida la interpretación de los resultados que se obtienen. Belefant-Miller y Grace (2010) evalúan el comportamiento de carotenoides durante el almacenamiento prolongado de arroz previamente descascarillado. Una de las prácticas habituales en cereales antes de su almacenamiento es el secado de los granos. La reducción de la humedad evita el deterioro por mohos, ácaros, etc., así como una posible germinación prematura del grano (Chelowski, 1994; Jood y Kapoor, 1994). Algunos autores como Burt *et al.* (2010) no obtienen una reducción significativa del contenido en pigmentos cuando comparan el secado a alta temperatura (90 °C) con el correspondiente a temperatura ambiente manteniendo el resto de las condiciones de almacenamiento de los granos de maíz. Por el contrario, otros estudios sí encuentran diferencias importantes en dicho contenido atribuidas no sólo a la temperatura aplicada durante el secado de los granos sino también a la duración del mismo (Quackenbush, 1963). Al margen de esta controversia, las condiciones óptimas para la conservación de los cereales,

y en particular para preservar los carotenoides presentes en ellos, se alcanzan siempre empleando un método de retirada exhaustiva de agua (deshidratación) y almacenamiento a temperaturas bajas.

Los estudios sobre almacenamientos de granos y derivados permiten además evaluar aspectos relevantes del metabolismo postcarotenogénico, como la esterificación con ácidos grasos que media su acumulación y estabilidad en estos alimentos (Kaneko, Nagamine y Yamada, 1995; Kaneko y Oyanagi, 1995). El aumento de la esterificación de la luteína conforme progresa el almacenamiento de granos, inducido o modulado por la temperatura, es un aspecto que ha sido caracterizado por algunos autores (Ahmad *et al.*, 2013; Mellado-Ortega, Atienza y Hornero-Méndez, 2015). Esto proporciona información sobre las condiciones idóneas para almacenar los cereales para preservar así su contribución en estos compuestos. Además se ha podido evaluar la especificidad de los sistemas enzimáticos implicados en la esterificación al comparar el almacenamiento de granos y harinas de tritordeum y trigo duro. Como consecuencia se han encontrado importantes diferencias no sólo atribuibles a la naturaleza de la esterificación para cada caso sino también a la regiospecificidad enzimática sobre la molécula de luteína y ácido graso implicados en tales reacciones (Mellado-Ortega, 2013). Independientemente del material vegetal, grano o harina, se ha estudiado la estabilidad del pigmento esterificado frente al libre, constatando que las velocidades de degradación siempre son mayores para estos últimos.

Esto proporciona una información muy valiosa que podría emplearse en los programas de mejora de cultivos para constituir el patrón de esterificación de xantofilas del vegetal, un rasgo fenotípico de interés para la selección de

variedades (Fernández-Orozco, Gallardo-Guerrero y Hornero-Méndez, 2013). En este sentido, los estudios de mejora de cereales dirigidos al aumento del contenido de carotenoides deberían basarse en la selección de variedades con mayor concentración de xantofilas esterificadas para incrementar la capacidad de acumulación de los mismos y su estabilidad en las semillas.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de tratamientos térmicos previos al periodo de almacenamiento de harinas para evaluar la generación de radicales libres y su impacto en los antioxidantes (Andersen *et al.*, 2011), así como la posible inactivación de enzimas que intervienen en su degradación (Rodríguez-Amaya, 1997).

## EFFECTO DEL PROCESADO DE CEREALES SOBRE EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES

Por lo ya expuesto, no cabe duda de que las distintas técnicas de procesado modulan y afectan al contenido de carotenoides que finalmente está presente en los productos derivados de los cereales debido, entre otros factores, a la distribución desigual de los pigmentos en las distintas partes del grano (Konopka, Kozirok y Rotkiewicz, 2004; Zhou, Laux y Yu, 2004). Esto ha llevado a la modificación y el desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento con el objetivo de preservar o potenciar el contenido de carotenoides y otros compuestos de relevancia nutricional. Las técnicas emergentes de procesado se suman así a la mejora convencional y la manipulación genética para la obtención de cultivos de granos biofortificados (Hemery *et al.*, 2007; Fardet, 2010). Los cereales en general se procesan de dos maneras. Por una parte, mediante fraccionamiento en seco seguido de cocinado (a diferentes condiciones de temperatura,

contenido de agua y presión), con lo que se obtienen productos como pasta, galletas y cereales de desayuno, entre otros. Por otra parte, mediante fermentación, dando lugar a bebidas alcohólicas. Los productos más populares como el pan y la bollería combinan ambos tratamientos.

El procesado básico de fraccionamiento y la molienda del cereal han permitido el análisis de carotenoides al establecer comparaciones entre las distintas capas del grano de cereal y fracciones comerciales de interés (Ndolo y Beta, 2013). Los análisis de productos integrales y de aquellos desprovistos del germen (Kean, Hamaker y Ferruzzi, 2008), harina sin salvado y fracciones del mismo (Žilic *et al.*, 2012), granos integrales y descascarillados (Kean *et al.*, 2011), granos, harinas y sémolas (Fares *et al.*, 2008; Luterotti y Kljak, 2010) suelen encontrarse entre las comparaciones más frecuentes. Uno de los primeros trabajos realizados al respecto es el de Blessin, Brecher y Dimler (1963) en granos de maíz. Estos autores analizaron el efecto sobre el contenido en pigmentos del fraccionamiento manual e industrial de las distintas capas del grano. Recientemente, Sellappan *et al.* (2009) han descrito las pérdidas de  $\beta$ -caroteno, hierro y zinc en granos de arroz transgénicos sometidos a pulido, estimándose éstas en más de 70%. El pulido es una práctica industrial habitual de este cereal que conlleva la eliminación casi completa de la capa de aleurona y del embrión (Juliano, 1994). La clasificación de genotipos de cereales, mediante la caracterización de su contenido en pigmentos atribuido a fracciones específicas del grano puede ser un buen ejemplo del uso de estas técnicas para la mejora de cultivos. Análisis descriptivos como los de Siebenhandl *et al.* (2007) contribuyen al respecto, evaluando fracciones con distintos tamaños de partícula de salvado y harinas, lo que facilita la clasificación y selección de diversos genotipos de trigos y cebadas. El tamaño de partícula

generado en estos procesos tiene una gran influencia no sólo desde el punto de vista técnico sino también nutricional. Así, la reducción del tamaño de partícula puede facilitar la liberación de vitaminas y otros compuestos desde las capas más externas del grano (Kahlon *et al.*, 1986; Zhou, Laux y Yu, 2004; Fratianni *et al.*, 2005). Zhou, Laux y Yu (2004) comprobaron que la micronización de la capa de aleurona se tradujo en una mayor capacidad antioxidante comparada con la no micronizada, el salvado y el grano, debido quizá a una mayor disponibilidad de antioxidantes.

Los diversos tratamientos térmicos que se aplican a los cereales con el objetivo de ampliar la vida útil de los productos también se han reproducido a escala de laboratorio para determinar el efecto en el contenido de carotenoides. El tostado de los cereales parece tener bastante repercusión y desencadena una reducción significativa en el contenido de pigmentos. Así lo indicaron De Oliveira y Rodríguez-Amaya (2007) en un trabajo en el que analizaron una serie de productos derivados del maíz, crudos y procesados, estimando unas pérdidas para zeaxantina aproximadamente de 53% tras el tostado de harina de dicho cereal. Resultados similares se han descrito como consecuencia de la cocción del arroz (Lamberts y Delcour, 2008). Scott y Eldridge (2005) realizaron una comparación de diversos tratamientos térmicos, y analizaron el perfil carotenóide en maíz fresco, congelado y enlatado, y encontraron que en este caso el procesamiento térmico de maíz para enlatarlo no produce una disminución relevante del contenido de carotenoides. La congelación y los tratamientos de escaldado que se aplican antes de congelar los granos de cereales, y vegetales en general, pueden producir un aumento en la bioaccesibilidad de los carotenoides (Selman, 1994). El calentamiento por microondas de salvado de arroz también produce efectos similares, y no supone

una reducción del nivel de pigmentos, por lo que se propone como una buena alternativa para favorecer la conservación y estabilización de esta fracción del grano (Abdul-Hamid *et al.*, 2007). La extrusión es un tratamiento más complejo. Se trata de un proceso multi-etapas ampliamente empleado en la industria para generar productos como los cereales de desayuno. Las condiciones suaves aplicadas durante la extrusión (contenido alto de humedad, tiempo de residencia bajo y baja temperatura) tienen un claro efecto positivo sobre la retención de vitaminas y carotenoides, y la disminución de la peroxidación lipídica entre otros (Cheftel, 1986; Singh, Gamlath y Wakeling, 2007). Guzmán-Tello y Cheftel (1990) estudiaron los cambios en la concentración de  $\beta$ -caroteno bajo condiciones más severas en la extrusión de harina de trigo, estimando las pérdidas en un rango de 38-73% para un intervalo de temperatura aplicada de 125-200°C. Otros procesados como el malteado de la cebada destacan por generar resultados bastantes dispares cuando se evalúa el efecto de dicho procesado sobre el nivel de pigmentos. Así, Goupy *et al.* (1999) en un estudio de distintas variedades de cebada registran tanto pérdidas (aproximadamente de 76%) como ganancias en el contenido de carotenoides.

Los análisis realizados durante los distintos pasos de procesamiento de las sémolas y generación de pastas indican que es durante la etapa de amasado cuando se registran las mayores pérdidas en pigmentos carotenoides, mientras que el posterior periodo de secado y maduración resulta ser el menos agresivo (Panfili, Fratianni e Irano, 2005; Hidalgo, Brandolini y Pompei, 2010; Fratianni *et al.*, 2012). Análogamente, la obtención de pan, bollos y galletas también lleva asociadas pérdidas considerables de carotenoides durante el amasado (Leenhardt *et al.*, 2006b). Algunos autores, no obstante, describen otras etapas en las que las mermas en pigmentos

pueden cobrar también protagonismo, destacando la etapa del horneado. En un estudio sobre la evolución de pigmentos durante la fabricación de pan a partir de trigo harinero y einkorn, Hidalgo, Brandolini y Pompei (2010) registran pérdidas medias de 47% para la corteza de pan frente a 21% para la miga. Al comparar ambos tipos de trigo observaron pérdidas menores en einkorn, caracterizado por presentar mayor contenido de pigmentos. La degradación durante el amasado está gobernada por una oxidación enzimática de los pigmentos, lo que ha llevado a diversos autores a relacionar ambos aspectos (actividades enzimáticas de degradación y pérdidas en carotenoides) en los programas de mejora para la selección de genotipos de cereales óptimos y adaptados a las aplicaciones panaderas (Trono, Pastore y Di-Fonzo, 1999; Borrelli *et al.*, 2003; Leenhardt *et al.*, 2006, 2006a; Fu *et al.*, 2013).

En el caso de tritordeum, las propiedades de este nuevo cereal lo hacen apto para aplicaciones panaderas similares a las del trigo harinero y, por el contrario, menos adecuado para la fabricación de sémolas. Recientemente las harinas de tritordeum han empezado a comercializarse, aventurando múltiples aplicaciones para ellas como fabricación de pan, pan de molde, galletas u otros productos cerealistas ([www.agrasys.es](http://www.agrasys.es)). En este sentido, aunque el proceso de elaboración de pan y otros derivados supone pérdidas del contenido de carotenoides, como para cualquier cereal, el pan de tritordeum presenta unos niveles superiores de luteína (seis veces más) que el que tienen los panes de trigos convencionales (según análisis realizado en nuestro laboratorio para Agrasys).

## APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA DE CAROTENOIDES EN CEREALES

La biotecnología como técnica de mejora vegetal aplicada al aumento del contenido de carotenoides en cereales se ha utilizado sobre todo con tres especies: maíz, trigo y sorgo. La relevancia de estos cereales y su trascendencia en la nutrición de poblaciones desfavorecidas quedan patentes en programas de biofortificación como el de Harvestplus, perteneciente al Consultive Group on International Agricultural Research (CGIAR). Este programa está centrado en el aumento de hierro, zinc y provitamina A de cultivos básicos (<http://www.harvestplus.org/>).

El avance en la exploración de los genomas de los principales cereales como el trigo, el cual ha sido recientemente secuenciado (Eversole *et al.*, 2014), ha podido llevarse a cabo gracias a la existencia de modelos genómicos como el arroz y el sorgo (Paterson *et al.*, 2009; Mace y Jordan, 2011). Gran parte de la investigación se ha basado en primer lugar en estudiar la viabilidad del rasgo susceptible a ser mejorado de forma convencional, es decir, en este caso, la variabilidad para el contenido de carotenoides en una población dada, y en segundo lugar la heredabilidad del mismo que ha sido apuntada como alta (Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006). Los genomas de maíz, sorgo y trigo han demostrado presentar una diversidad genética importante para este carácter, como refleja la existencia de germoplasmas élite de dichas especies (Chander *et al.*, 2008; Ibrahim y Juvik, 2009). Hasta la actualidad el estudio se ha centrado en la detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL), es decir, localizaciones en cromosomas cuya variación alélica está asociada con la variación de un carácter cuantitativo, como el contenido carotenoide, ya que varía de forma continua.

Existen numerosos trabajos que describen la identificación de dichos *loci* y su relación con la variación fenotípica en el contenido de carotenoides del endospermo de los cereales (Wong *et al.*, 2004; Pozniak *et al.*, 2007; Chander *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2008; Salas-Fernández *et al.*, 2008). Las investigaciones a este nivel van más allá de la justificación del contenido global de carotenoides, identificándose QTL específicos para determinados carotenoides como luteína y  $\beta$ -caroteno. Salas-Fernández *et al.* (2008) detectan en sorgo cinco QTL sobre los cromosomas 1, 2, y 10 para  $\beta$ -caroteno. Howitt *et al.* (2009) identifican tres QTL para el contenido de luteína sobre los cromosomas 3B, 5B y 7A de trigo duro. Más recientemente, Blanco *et al.* (2011) obtienen en el mismo cereal QTL tanto para  $\beta$ - como  $\alpha$ -caroteno en los cromosomas 2A, 3B y 7A. En trigo los QTL más determinantes para el contenido en pigmentos han sido repetidas veces mapeados sobre los cromosomas 7A y 7B, tanto en trigo duro como harinero. Los genes que codifican para PSY1 (fitoeno sintasa, EC 2.5.1.32) generalmente cosegregan con esos QTL. Las variaciones alélicas de esos genes son numerosas y la aparición continua de nuevos alelos resulta muy probable. Esto demuestra un alto nivel de polimorfismo genético así como mucha genómica por explorar (Ravel *et al.*, 2013).

Una de las grandes estrategias en mejora vegetal es la búsqueda de nuevas fuentes de variación en especies relacionadas como *Lophopyrum ponticum* (Zhang *et al.*, 2005) y, *H. chilense* (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2011; Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012) en el caso de cereales. Los pequeños granos de *H. chilense* se caracterizan por tener un nivel de carotenoides alto, y presentar al menos dos *loci* para el contenido de pigmentos localizados en los cromosomas 2H<sup>ch</sup> y 7H<sup>ch</sup> (Álvarez, Martín y Martín, 1998, 1999; Atienza *et al.*, 2004, 2008). El conocimiento de la localización cromosómica de

estos genes fue primero estudiado por Álvarez, Martín y Martín (1998) usando líneas de adición de *H. chilense* en trigo. Estos autores localizaron genes responsables del nivel de pigmentos (medido como YPC) en *H. chilense* sobre el cromosoma 7 y mapearon este rasgo sobre el brazo  $\alpha$  de dicho cromosoma. Sin embargo, la posibilidad de la interacción entre genes de *H. chilense* y los del trigo duro en tritordeum, propició la búsqueda de nuevos *loci* en el genoma de esa especie. Posteriormente, mediante la construcción del primer mapa genético de *H. chilense*, (Hernández *et al.*, 2001), se identificó un nuevo QTL sobre el cromosoma 2 denominado *carot 1*, (Atienza *et al.*, 2004). Actualmente la generación de mapas de mayor cobertura para dicha especie con estos fines están ya disponibles (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2012) lo que genera una mayor probabilidad de encontrar regiones genómicas de interés en *H. chilense*.

Estos datos constituyen los primeros pasos hacia el desarrollo de un programa de MAS (*Marker Assisted Selection*, selección asistida por marcadores moleculares asociados al rasgo de interés) para el contenido de carotenoides en tritordeum, lo cual es interesante para la identificación y posterior transferencia de genes determinantes de un mayor contenido en carotenoides desde tritordeum a líneas de trigo sometidas a programas de mejora. De este modo, el anfiploide tritordeum también se convertiría en una especie útil para la mejora de cereales actuando como especie puente entre la cebada y el trigo (Álvarez, Martín y Martín, 1999; Martín *et al.*, 1999; Atienza *et al.*, 2005, 2007, 2007a).

Las líneas de tritordeum, independientemente del nivel de ploidía, muestran contenidos de carotenoides bastantes más altos que sus parentales de trigo (Atienza *et al.*, 2007). Debido a eso una de las líneas de investigación ha sido el estudio de la variación

genética de este rasgo en tritordeum y su relación con el nivel de pigmentos de ambas especies parentales, *H. chilense* y trigo duro. De estos estudios se desprende que aunque el genoma  $H^{ch}$  es claramente responsable de dicho nivel de pigmentos en tritordeum, pueden existir interacciones entre los sistemas genéticos de ambas especies parentales que no deben obviarse (Álvarez, Martín y Martín, 1999). Recientemente se realizó el primer análisis exhaustivo del perfil carotenoides de *H. chilense*, y se encontró que más de la mitad de la luteína presente estaba esterificada, siendo el patrón de esterificación similar al del anfiploide. Esto verifica lo comentado antes, de manera que el patrón de esterificación de tritordeum debe derivarse del fondo genético de esta cebada silvestre (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2015).

La utilidad de la ingeniería metabólica para mejorar la nutrición humana alcanza sus mejores propósitos en el campo de los alimentos básicos (*staple foods*), los cuales tienen un efecto importante en la nutrición de poblaciones con bajos recursos. La generación de nuevos cultivos con la etiqueta *Golden* como *Golden Potato* o *Golden Canola* son cada vez más numerosos sumándose al bien conocido *Golden Rice* (Beyer, 2010; Bai *et al.*, 2011). Es justamente el éxito de éste último caso el que ha impulsado los programas de manipulación de otras especies. La intensa investigación desde los primeros intentos realizados con dicho cultivo por Burkhardt *et al.* (1997) hasta los más recientes con la generación del *Golden Rice 2* (Paine *et al.*, 2005) ha proporcionado ideas estimulantes para tal fin. La expresión del gen *y1* de maíz en el endospermo

de trigos harineros hexaploides constituye un ejemplo (Cong *et al.*, 2009). El maíz también cuenta con algunos ensayos al respecto. La utilización mejorada del promotor  $\gamma$ -zein, (Marzábal *et al.*, 1998), altamente específico para la expresión en tejido endospermico (super  $\gamma$ -zein), se tradujo en un aumento de carotenoides totales de hasta 34 veces con una acumulación preferencial en el mismo de  $\beta$ -caroteno (Aluru *et al.*, 2008). Una estrategia más compleja fue la ideada por Zhu *et al.* (2008) mediante la generación de toda una batería de plantas transgénicas de maíz que resultaron de las múltiples combinaciones posibles derivadas de una transformación multigénica. Más recientemente, el aumento simultáneo en el contenido de tres vitaminas (vitaminas A, B y C) que implica la manipulación simultánea de tres rutas metabólicas distintas (Naqvi *et al.*, 2009), coloca al maíz como un cultivo prometedor para potenciar carotenoides provitamina A, ya que muestra menos restricciones que otros, como arroz o trigo (Wurtzel, Cuttriss y Vallabhaneni, 2012). Las investigaciones más recientes con *Golden Rice* se centran ahora en el estudio de la estabilidad y transferencia de los transgenes para la obtención de cultivares de arroz con un mayor rendimiento mediante introgresión y otras técnicas de mejora (Datta *et al.*, 2006, 2007). Otros granos minoritarios, como sorgo y mijo, pero también de gran importancia en poblaciones de bajos recursos, como la africana, están adaptándose cada vez más a estas técnicas y haciéndose un hueco en la biofortificación mediada por manipulación genética (O'Kennedy, Grootboom y Shewry, 2006; [www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx](http://www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx)).

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio se desarrolla en el marco de proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-14850\ALI), la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (P08-AGR-3477), y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Red IBERCAROT, ref. 112RT0445). Elena Mellado-Ortega ha disfrutado de una beca predoctoral del programa JAE del CSIC, cofinanciada por ESF.

## REFERENCIAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists), 2000. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. Saint Paul: AACC.
- Abdel-Aal, E.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J. 2007. *Journal of Cereal Science* 55: 787-794.
- Abdul-Hamid, A., Sulaiman, R.R.R., Osman, A., Saari, N. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 627-637.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7825-7834.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2297-2306.
- Agrasys. <http://www.agrasys.es/es/index.html> [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Ahmad, F.T., Asenstorfer, R.E., Soriano, I.R., Mares, D.J. 2013. *Journal of Cereal Science* 58: 408-413.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K., Rodermeil, S. 2008. *Journal of Experimental Botany* 59: 3551-3562.
- Álvarez, J.B., Ballesteros, J., Arriaga, H.O., Martín, L.M. 1995. *Journal of Cereal Science* 23: 291-299.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M., Martín, A. 1998. *Plant Breeding* 117: 287-289.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M., Martín, A. 1999. *Plant Breeding* 118: 187-189.
- Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. 2014. *Trends in Analytical Chemistry* 56: 49-73.
- Andersen, M.L., Erichsen, H.R., Skibsted, L.H., Graversen, H.B., Rodrigues-Filho, U.P. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 494-498.
- Arvayo-Enríquez, H., Moncada-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., Rodríguez-Ramírez, R. 2013. *Analytical Methods* 5: 2916-2924.
- Arya, S.S., Parihar, D.B. 1981. *Food Nahrung* 25: 121-126.
- Atienza, S.G., Ramírez, C.M., Hernández, P., Martín, A. 2004. *Plant Breeding* 123: 303-304.
- Atienza, S.G. Avila, C.M., Ramírez, M.C., Martín, A. 2005. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 85-89.
- Atienza, S., Ballesteros, J., Martín, A., Hornero-Méndez, D. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4244-4251.
- Atienza, S.G., Martín, A.C., Ramírez, M.C., Martín, A., Ballesteros, J. 2007a. *Plant Breeding* 126: 5-8.
- Atienza, S.G., Martín, A., Pecchioni, N., Platani, C., Cattivelli, L. 2008. *Euphytica* 159: 325-331.
- Bai, C., Twyman, R.M., Farré, G., Sanahuja, G., Christou, P., Capell, T., Zhu, C. 2011. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 205-221.

## REFERENCIAS

- Ballesteros, J.B., Ramírez, M.C., Martínez, C., Atienza, S.G., Martín, A. 2005. *Crop Science* 45: 2662-2663.
- Bechoff, A., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M., Tomlins, K.I., Boulanger, R., Dufour, D., Westby, A. 2010. *Food Chemistry* 121: 348-357.
- Belefant-Miller, H., Grace, S.C. 2010. *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 358-363.
- Beleggia, R., Platani, C., Nigro, F., Cattivelli, L. 2010. *Journal of Cereal Science* 52: 106-110.
- Berardo, N., Brenna, O.V., Amato, A., Valoti, P., Pisacane, V., Motto, M. 2004. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 393-398.
- Berardo, N., Manzzinelli, G., Valoti, P., Lagaña, P., Redaelli, R. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2378-2384.
- Beyer, P. 2010. *New Biotechnology* 27: 478-481.
- Blanco, A., Colasuonno, P., Gadaleta, A., Mangini, G., Schiavulli, A., Simeone, R., Digesù, A.M., De Vita, P., Mastrangelo, A.M., Cattivelli L. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 255-264.
- Blessin, C.W., VanEtten, H., Wiebe, R. 1958. *Cereal Chemistry* 35: 359-365.
- Blessin, C.W. 1962. Carotenoids of corn sorghum: I. *Cereal Chemistry* 39: 236-242.
- Blessin, C.W., Brecher, J.D., Dimler, R. J. 1963. *Cereal Chemistry* 40: 582-590.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Fares, C., Platani, C., Di Fonzo, N. 2003. *Cereal Chemistry* 80: 225-231.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C., Troccoli, A. 2008. *Journal of Cereal Science* 48: 494-502.
- Britton, G. 1985. *Method Enzymology* 111: 113-149.
- Britton, G., Hornero-Méndez, D. 1997. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*,
- Britton, G., Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol. 5: Nutrition and Health*. Basilea: Birkhäuser.
- Burkhardt, P.K., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, A., Armstrong, G.A., Schledz, M., Lintig, J.V., Potrykus, I. 1997. *The Plant Journal* 11: 1071-1078.
- Burkhardt, S., Böhm, V. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8295-8301.
- Burt, A., Grainger, C., Young, J., Shelp, B., Lee, E. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8286-8292.
- Calucci, L., Capocchi, A., Galleschi, L., Ghiringhelli, S., Pinzino, C., Saviozzi, F., Zandomenoghi, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4274-4281.

## REFERENCIAS

- Carbonell, J.V., Piñaga, F., Yusá, V., Peña, J.L. 1986. *Journal of Food Engineering* 5: 179-193.
- Chander, S., Guo, Y.Q., Yang, X.H., Zhang, J., Lu, X. Q., Yan, J. B., Song, T.M., Rocheford, T.R., Li, J.S. 2008. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 223-233.
- Cheftel, J.C. 1986. *Food Chemistry* 20: 263-283.
- Chelowski, J. 1994. *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Developments in food Science*. Ámsterdam: Elsevier.
- Choi, Y., Jeong, H., Lee, J. 2007. *Food Chemistry* 103: 130-138.
- Clarke, F.R., Clarke, J.M., McCaig, T.N., Knox, R.E., Depauw, R.M. 2006. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 133-141.
- Cong, L., Wang, C., Chen, L., Liu, H., Yang, G., He, G. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8652-8660.
- Cristóbal, J.A.R. 1965. *Anales del Instituto de Investigaciones Veterinarias* 15: 85-92.
- Datta, K., Rai, M., Parkhi, V., Oliva, N., Tan, J., Datta, S.K. 2006. *Current Science* 91: 935-939.
- Datta, S.K., Datta, K., Parkhi, V., Rai, M., Baisakh, N., Sahoo, G., Rehana, S., Bandyopadhyay, A., Alamgir, M., Ali, M.S., Abrigo, E., Oliva, N., Torrizo, L. 2007. *Euphytica* 154: 271-278.
- De Oliveira, G., Rodriguez-Amaya, D. 2007. *Journal of Food Science* 72: S79-S85.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M.J. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4209-4216.
- Di Silvestro, R., Marotti, L., Bosi, S., Bregola, V., Segura-Carretero, A., Sedej, I., Mandic, A., Sakac, M., Benedettelli, S., Dinelli, G. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2800-2810.
- Digesù, A.M., Platani, C., Cattivelli, L., Mangini, G., Blanco, A. 2009. *Journal of Cereal Science* 50: 210-218.
- Doblado-Maldonado, A.F., Pike, O.A., Sweley J.C., Rose, D.J. 2012. *Journal of Cereal Science* 56: 119-126.
- Egesel, C.O., Wong, J.C., Lambert, R.J., Rocheford, T.R. 2003. *Crop Science* 43: 818-823.
- El-Agamey, A., McGarvey, D.J. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol 4: Natural Fuctions*. Basilea: Birkhäuser.
- Eversole, K., Feuillet, C., Mayer, K.F.X., Rogers, J. 2014. *Science* 18: 285-287.
- Fardet, A. 2010. *Nutrition Research Reviews* 23: 65-134.
- Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C. 2008. *Journal of Cereal Science* 48: 258-276.

## REFERENCIAS

- Fares, C., Codianni, P., Nigro, F., Platani, C., Scazzina, F., Pellegrini, N. 2008. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2435-2444.
- Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., Christou, P. 2010. *Plant Science* 179: 28-48.
- Farrington, F.F., Warwick, M.J., Shearer, G. 1981. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 948-950.
- Fernández-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L., Hornero-Méndez, D. 2013. *Food Chemistry* 141: 2864–2872
- Fish, W.W., Davis, A.R. 2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3582-3585.
- Fratianni, A., Irano, M., Panfili, G., Acquistucci, R. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2373-2378.
- Fratianni, A., Di Criscio, T., Mignogna, R., Panfili, G. 2012. *Food Chemistry* 131: 590-595.
- Frei, M., Becker, K. 2005. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2380-2384.
- Fu, B.X., Schlichting, L., Pozniak, C.J., Singh, A.K. 2013. *Journal of Cereal Science* 57: 560-566.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M.J. 1999. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1625-1634.
- Graham, R.D., Rosser, J.M. 2000. *Food & Nutrition Bulletin* 21: 404-409.
- Grand Challenges in Global Health. [www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx](http://www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.aspx) [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Guzmán-Tello, R., Cheftel, J.C. 1990. *International Journal of Food Science & Technology* 25: 420-434.
- Harvestplus. Breeding Crops for Better Nutrition. <http://www.harvestplus.org/> [consulta: 4 de diciembre de 2014].
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., Abecassis, J. 2007. *Journal of Cereal Science* 46: 327-347.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bohm, V., Bitsch, R. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6663-6668.
- Hernández, P., Dorado, G., Prieto, P., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Laurie, D.A., Snape, J.W., Martín, A. 2001. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1259-1264.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., Piscozzi, R. 2006. *Journal of Cereal Science* 44: 182-193.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. 2008. *Food Chemistry* 107: 444-448.

## REFERENCIAS

- Hidalgo, A., Brandolini, A. 2008a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11300-11305.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Ratti, S. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6342-6348.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. 2010. *Food Chemistry* 121: 746-751.
- Howitt, C.A., Pogson, B.J. 2006. *Plant, Cell & Environment* 29: 435-445.
- Howitt, C.A., Cavanagh, C. R., Bowerman, A. F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J. L., ogson, B. J. 2009. *Functional & Integrative Genomics* 9: 363-376.
- Hu, Q.P., Xu, J.G. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2026-2033.
- Huber, L., George, S.A. 1993. En J. Cazes (ed.). *Diode array detection in HPLC, Chromatographic Science Series*, Nueva York, Basilea, Hong Kong, Marcel Dekker,
- Humphries, J.M., Graham, R.D., Mares, D.J. 2004. *Journal of Cereal Science* 40: 151-159.
- Ibrahim, K., Juvik, J. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4636-4644.
- ICC (International Association for Cereal Science and Technology), 1990. Method 152. Determination of the yellow pigment content of durum wheat semolina and flour.
- Jood, S., Kapoor, A.C. 1994. *Plant Foods for Human Nutrition* 46: 237-243.
- Juliano, B.O. 1994. En B.O. Juliano (ed.). *Rice: Chemistry and Technology*, Saint Paul: AACC.
- Kahlon, T.S., Chow, F.I., Hoefler, J.L., Betschart, A.A. 1986. *Cereal Chemistry* 63: 490-493.
- Kalt, W. 2005. *Journal of Food Science* 70: R11-R19.
- Kandlakunta, B., Rajendran, A., Thingnganing, L. 2008. *Food Chemistry* 106: 85-89.
- Kaneko, S., Oyanagi, A. 1995. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 2312-2313.
- Kaneko, S., Nagamine, T., Yamada, T. 1995. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 1-4.
- Kean, E.G., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2619-2626.
- Kean, E.G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9918-9926.
- Kean, E.G., Bordenave, N., Ejeta, G., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. 2011. *Journal of Cereal Science* 54: 450-459.

## REFERENCIAS

- Kim, J.K., Lee, S.Y., Chu, S.M., Lim, S.H., Suh, S., Lee, Y., Cho, H.S., Ha, S. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12804-12809.
- Koca, N., Burdurlu, H.S., Karadeniz, F. 2007. *Journal of Food Engineering* 78: 449-455.
- Konopka, I., Kozirok, W., Rotkiewicz, D. 2004. *Food Research International* 37: 429-438.
- Konopka, I., Czaplicki, S., Rotkiewicz, D. 2006. *Food Chemistry* 95: 290-300.
- Kurilich, A.C., Juvik, J.A. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1948-1955.
- Lachman, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z. 2013. *Journal of Cereal Science* 57: 207-214.
- Lamberts, L., Delcour, J.A. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11914-11919.
- Lavelli, V., Hidalgo, A., Pompei, C., Brandolini, A. 2009. *Journal of Cereal Science* 49: 319-321.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. 2006. *European Journal of Agronomy* 25: 170-176.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. 2006a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1710-1715.
- Lemmens, L., De Vleeschouwer, K., Moelants, K.R.N., Colle, I.J.P., Loey, A.M.V., Hendrickx, M.E. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6816-6824.
- Lepage, M., Sims, R.P.A. 1968. *Cereal Chemistry* 45: 600-604.
- Li, W., Beta, T. 2012. *Food Chemistry* 133: 782-786.
- Liaaen-Jensen, S., Lutnaes, B.F. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids, vol 4: Natural Functions*. Basilea: Birkhäuser.
- Lier, J.B., Lacroix, L.J. 1974. *Cereal Chemistry* 51:188-194.
- Lindley, M.G. 1998. *Trends in Food Science & Technology* 9: 336-340.
- Liu, R.H. 2007. *Journal of Cereal Science* 46: 207-219.
- Luterotti, S., Kljak, K. 2010. *Acta Chimica Slovenica* 57: 781-787.
- Luterotti, S., Marković, K., Franko, M., Bicanic, D., Madžgalj, A., Kljak, K. 2013. *Food Chemistry* 140: 390-387.
- Lv, J., Lu, Y., Niu, Y., Whent, M., Ramadan, M.F., Costa, J., Yu, L. 2013. *Food chemistry* 138: 454-462.
- Mace, E.S., Jordan, D.R. 2011. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 169-191.

## REFERENCIAS

- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. 2009. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: S194-S218.
- Mamatha, B., Sangeetha, R., Baskaran, V. 2011. *International Journal of Food Science and Technologies* 46: 315-323.
- Martín, A., Chapman, V. 1977. *Cereal Research Communications* 5: 365-368.
- Martín, A., Sánchez-Monge Laguna, E. 1982. *Euphytica* 31: 261-267.
- Martín, A., Álvarez, J.A., Martín, L.M., Barro, F., Ballesteros, J. 1999. *Journal of Cereal Science* 30: 85-95.
- Marzábal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D., Torrent, M. 1998. *The Plant Journal* 16: 41-52.
- McKeivith, B. 2004. *Nutrition Bulletin* 29: 111-142.
- Mellado-Ortega, E. 2013. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D. 2012. *Food Chemistry* 135: 1344-1352.
- Mellado-Ortega, E., Atienza, S.G. y Hornero-Méndez, D. 2015. *Journal of Cereal Science* 62: 134-142.
- Mellado-Ortega, E., Hornero-Méndez, D. 2015. *Journal of Cereal Science* 62:15-21.
- Menkir, A., Maziya-Dixon, B. 2004. *Maydica* 49: 313-318.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Jarén-Galán, M., Gandul-Rojas, B., Hornero-Méndez, D., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L. 1997. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. 1994. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1551-1554.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Hornero-Méndez, D., Pérez-Gálvez, A. 2002. En W.J. Hurst. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press.
- Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J., Yu, L. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6649-6657.
- Moros, E.E., Darnoko, D., Cheryan, M., Perkins, E.G., Jerrell, J. 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5787-5790.
- Nakornriab, M., Sriseadka, T., Wongpornchai, S. 2008. *Journal of Food Lipids* 15: 488-503.
- Naqvi, S., Zhu, C., Farre, G., Ramessar, K., Bassie, L., Breitenbach, J., Conesa, D.P., Ros, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 7762-7767.

## REFERENCIAS

- Ndolo, V.U., Beta, T. 2003. *Food Chemistry* 139: 663-671.
- Nghia, P.T., Liem, D.T., Hai, T.V., Hoa, T.T. C. 2006. *Omonrice* 14: 18-27.
- Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M. 1999. *Trends in Food Science & Technology* 10: 94-100.
- O'Kennedy, M.M., Grootbooma, A., Shewry, P.R. 2006. *Journal of Cereal Science* 44: 224-235.
- O'Neil, C.A., Schwartz, S.J. 1992. *Journal of chromatography A* 624: 235-252.
- Okarter, N., Liu, C., Sorrells, M., Liu, R. 2010. *Food Chemistry* 119: 249-257.
- Oliver, J., Palou, A. 2000. *Journal of Chromatography A* 881: 543-555.
- Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S., Mukai, K. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9967-9978.
- Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggner, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A., Drake, R. 2005. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Panfili, G., Fratianni, A., Distaam, M. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6373-6377.
- Panfili, G., Fratianni, A., Irano, M. 2005. *Tecnica Molitoria* 5: 493-498.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A. K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Ollilar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S. 2009. *Nature* 457: 551-556.
- Patil, R.M., Oak, M.D., Tamhankar, S.A., Sourdille, P., Rao, V.S. 2008. *Molecular Breeding* 21: 485-496.
- Pinzino, C., Nanni, B., Zandomenighi, M. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1333-1339.
- Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R., Clarke, J.M. 2007. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 525-537.
- Quackenbush, F.W. 1963. *Cereal Chemistry* 40: 266-269.
- Quackenbush, F., Firch, J., Rabourn, W., Mcquistan, M., Petzold, E., Kargl, T. E. 1961. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9: 132-135.
- Ravel, C., Dardevet, M., Leenhardt, F., Bordes, J., Joseph, J.L., Perretant, M.R., Exbrayat, F., Poncet, C., Balfourier, F., Chanliaud, E., Charmet, G. 2013. *Molecular Breeding* 31: 87-99.

## REFERENCIAS

- Rivera, S., Canela, R. 2012. *Molecules* 17: 11255-11268.
- Rivera, S.M., Canela-Garayoa, R. 2012. *Journal of Chromatography A* 1224: 1-10.
- Rivera, S.M., Vilaró, F., Zhu, C., Bai, C., Farré, G., Christou, P., Canela-Garayoa. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5279-5285.
- Rivera, S.M., Christou, P., Canela-Garayoa, R. 2013. *Mass Spectrometry Reviews* 33: 353-372.
- Rizolo, A., Polesello, S. 1992. *Journal of Chromatography A* 624: 103-152.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1997. *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Arlington: Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI).
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, D.C.: ILSI Press.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 2003. *Forum of Nutrition* 56: 35-37.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Gutierrez, N., Ávila, C.M., Martín, A., Atienza, S.G. 2011. *Plant Genetic Resources* 9: 313-316.
- Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S.G. 2012. *BMC Plant Biology* 12: 200-210.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Gutiérrez, N., Ávila, C.M., Machado, A., Huttner, E., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Castillo, A., Kilian, A., Martín, A., Atienza, S.G. 2012. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 713-722.
- Salas-Fernandez, M.G., Hamblin, M.T., Li, L., Rooney, W.L., Tuinstra, M.R., Kresovich, S. 2008. *Crop Science* 48: 1732-1743.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M. 2000. *Journal of Chromatography A* 880: 189-202.
- Santra, M., Rao, V.S., Tamhankar, S.A. 2003. *Cereal Chemistry* 80: 130-131.
- Santra, M., Santra, D.K., Rao, V.S., Taware, S.P., Tamhankar, S.A. 2005. *Euphytica* 144: 215-221.
- Saxena, A., Maity, T., Raju, P.S., Bawa, A. S. 2012. *Food and Bioprocess Technology* 5: 672-679.
- Scott, C., Eldridge, A. 2005. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 551-559.
- Selim, K., Tsimidou, M., Biliaderis, C.G. 2000. *Food Chemistry* 71: 199-206.
- Sellappan, K., Datta, K., Parkhi, V., Datta, S. 2009. *Plant Science* 177: 557-562.
- Selman, J.D. 1994. *Food Chemistry* 49: 137-147.
- Serpen, A., Gökmen, V., Karagöz, A., Köksel, H. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7285-7292.

## REFERENCIAS

- Sharma, S.K., Le Maguer, M. 1996. *Food Research International* 29: 309-315.
- Siebenhandl, S., Grausgruber, H., Pellegrini, N., Del Río, D., Fogliano, V., Pernice, R., Berghofer, E. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8541-8547.
- Singh, S., Gamlath, S., Wakeling, L. 2007. *International Journal of Food Science & Technology* 42: 916-929.
- Suryanarayana Rao, K., Rukmini, C., Mohan, V. S. 1968. *Indian Journal of Agricultural Science* 38: 368-372.
- Tan, J., Baisakh, N., Oliva, N., Parkhi, V., Rai, M., Torrizo, L., Datta, K., Datta, S.K. 2005. *International Journal of Food Science & Technologies* 40: 563-569.
- Taungbodhitham, A.K., Jones, G.P., Wahlquist, M.L., Briggs, D.R. 1998. *Food Chemistry* 63: 577-584.
- Tee, E., Lim, C. 1991. *Food Chemistry* 41: 147-193.
- Tonon, R.V., Baroni, A.F., Hubinger, M.D. 2007 *Journal of Food Engineering* 82: 509-517.
- Trono, D., Pastore, D., Di-Fonzo, N. 1999. *Journal of Cereal Science* 29: 99-102.
- Tsimidou, M. 1997. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2890-2898.
- Van Breemen, R.B. 1997. *Pure and Applied Chemistry* 69: 2061-2066.
- Van Breemen, R.B., Dong, L., Pajkovic, N.D. 2012. *International Journal of Mass Spectrometry* 312: 163-172.
- Van Hung, P., Hatcher, D.W. 2011. *Food Chemistry* 125: 1510-1516.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Wagner, L.A., Warthesen, J.J. 1995. *Journal of Food Science* 60: 1048-1053.
- Weber, E.J. 1987. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 8: 1129-1134.
- Werner, S., Böhm, V. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1163-1170.
- Wong, J.C., Lambert, R.J., Wurtzel, E.T., Rocheford, T.R. 2004. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 349-359.
- Wurtzel, E.T., Cuttriss, A., Vallabhaneni, R. 2012. *Frontiers in Plant Science* 3(29): 1-12.
- Xu, J., Hu, Q., Wang, X., Luo, J., Liu, Y., Tian, C. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5751-5756.

## REFERENCIAS

- Zepka, L.Q., Borsarelli, C.D., Azevedo, M.A., Da Silva, P., Mercadante, A.Z. 2009. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7841-7845.
- Zhang, W., Lukaszewski, A.J., Kolmer, J., Soria, M.A., Goyal, S., Dubcovsky, J. 2005. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 573-582.
- Zhou, K., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1112-1117.
- Zhou, K., Yu, L. 2004a. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 37: 717-721.
- Zhou, K., Laux, J.J., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1118-1123.
- Zhou, K., Su, L., Yu, L. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6108-6114.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., Capell, T. 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 18232-18237.
- Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G., Janković, M., Gökmen, V. 2012. *Journal of Cereal Science* 56: 562-568.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado en el marco de proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-14850\ALI), Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014- 53195R), la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía 41 (P08-AGR-3477), y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Red IBERCAROT, ref. 112RT0445). Elena Mellado-Ortega ha disfrutado de una beca predoctoral del programa JAE del CSIC, cofinanciada por ESF.

# Carotenoides en agroalimentación y salud

Antonio J. Meléndez-Martínez  
Coordinador



## Carotenoides en agroalimentación y salud

Primera edición: noviembre de 2017

### Comité Editorial

Dra. Lourdes Gómez Gómez

Facultad de Farmacia/Instituto Botánico  
Universidad de Castilla-La Mancha, sede de Albacete

Dr. Dámaso Hornero Méndez

Instituto de la Grasa  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio J. Meléndez-Martínez

Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla

Dra. Begoña Olmedilla Alonso

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y  
Nutrición

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio Pérez Gálvez

Instituto de la Grasa  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

**Coordinador general:** Antonio J. Meléndez-Martínez

D.R. © Aguilar-Espinosa, Margarita; Alcalde, María Jesús; Alonso, Gonzalo L.; Álvarez, Rocío; Angaman, Djédoux Maxime; Arhazem, Oussama; Ávalos, Javier; Bagur, María José; Benítez-González, Ana; Berman, Judit; Bonet, María Luisa; Boronat, Albert; Canas, Jose A.; Capell, Teresa; Cárdenas-Conejo, Yair; Carle, Reinhold; Cerda, Ariel; Chacón-Ordóñez, Tania; Christou, Paul; Cuéllar, Fabio A.; De Pourcq, Karel; Dias, Maria Da Graça; Esquivel, Patricia; Estévez-Santiago, Rocío; Farre, Gemma; Gallardo-Guerrero, Lourdes; Gámbaro, Adriana; Gandul-Rojas, Beatriz; García Romero, Josefa; García-Rodríguez, María del Valle; Garrido-Fernández, Juan; Garza-Caligaris, Luz Elena; Gavilán Bravo, Andrés; Ginés, Rafael; Godoy-Hernández, Gregorio; Gómez-Gómez, Lourdes; Hempel, Judith; Heredia, Francisco J.; Hernández-Gras, Francesc; Hornero Méndez, D.; Izquierdo, Marisol; Jarén-Galán, Manuel; Jiménez, Víctor M.; Lado, Joanna; Limón, M. Carmen; Lugo-Cervantes, Eugenia; Luque de Castro, Maria Dolores; Maldonado, Eliana M.; Mapelli-Brahm, Paula; Martínez Vázquez, Ana; Meléndez-Martínez, Antonio J.; Mellado-Ortega, Elena; Mercadante, Adriana Z.; Molina-Calle, María; Murillo, Enrique; Odorissi, Ana A.; Olmedilla-Alonso, Begoña; Ornelas-Paz, José de Jesús; Osorio, Coralia; Palou, Andreu; Pérez-Gálvez, Antonio; Ribot, Joan; Rivera-Madrid, Renata; Robaina, Lidia; Roca, María; Rodrigo, Maria Jesús; Rodríguez-Concepción, Manuel; Rubio-Moraga, Ángela; Ruiz-Sola, M. Águila; Saavedra, Gloria F.; Salinas, M. Rosario; Schweiggert, Ralf M.; Simpson, Kevin; Stange, Claudia; Stinco, Carla M.; Vargas-Murga, Liliana; Vicario, Isabel M.; Zacarías, Lorenzo; Zhu, Changfu; Zorrilla-Lopez, Uxue.

Las opiniones, conceptos, tablas, gráficas, ilustraciones y fotografías que aparecen en cada uno de los capítulos son responsabilidad exclusiva de los autores. Las figuras que aparecen reproducidas en diferentes capítulos se han usado con permiso de sus autores.

Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o método, sin autorización previa y por escrito de los titulares del copyright.

Producción: Editorial Terracota, SA de CV / México

Edición: Pilar Tapia

Realización: Jeanette Vázquez Gabriel

Fotografías: Autores y Freeimages

ISBN 978-84-15413-35-6

**Distribución:**

RED TEMÁTICA IBERCAROT

(referencia 112RT445) <http://carotenoides.us.es>

PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y  
TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO – CYTED

