



## TÍTULO

**ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LICOPENO Y  
ÁCIDO ASCÓRBICO EN TOMATE Y FRESA, EN PRESENCIA  
DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS**

## AUTORA

**Clara Aranda Alonso**

**Esta edición electrónica ha sido realizada en 2013**

Director

Antonio Gil Serrano

Tutor

Miguel Ángel Rodríguez Carvajal

Curso

Máster en Biotecnología Avanzada

ISBN

978-84-7993-898-7

©

Clara Aranda Alonso

©

De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía

**Fecha  
documento**

**Diciembre de 2012**



## Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

### Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

### Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
  - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
  - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
- 
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
  - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
  - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA – UMA/UNIA



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA- UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE  
LICOPENO Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN TOMATE Y  
FRESA, EN PRESENCIA DE MICROORGANISMOS  
ENDÓFITOS**

Clara Aranda Alonso

Sevilla, Diciembre 2012



**Índice**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LICOPENO EN TOMATE	1
1.2. ÁCIDO ASCÓRBICO EN FRESA	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. LICOPENO	6
2.1.1. REACTIVOS	6
2.1.2. MUESTRAS	6
2.1.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ESTÁNDARES DE CAROTENOIDES	7
2.1.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS (HPLC-MS/MS-APCI)	7
2.1.5. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	10
2.1.6. CONDICIONES DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, <sup>1</sup> H-RMN	10
2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO EN FRESA	11
2.2.1. REACTIVOS	11
2.2.2. MUESTRAS	11
2.2.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ESTÁNDARES DE ÁCIDO ASCÓRBICO	12
2.2.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	12
3. RESULTADOS	14
3.1. LICOPENO	14
3.1.1. EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES	14
3.1.2. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE HPLC/MS-MS	14
3.1.3. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.	20
3.1.4. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE RMN	21
3.2. ÁCIDO L-ASCÓRBICO	24
3.2.1. EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES	24
3.2.2. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE HPLC-PDA	24
4. CONCLUSIONES	30
5. BIBLIOGRAFÍA	32

**Abreviaturas**

2D-COSY	Espectroscopía de correlación bidimensional ( <i>Bidimensional correlated spectroscopy</i> )
AA	Ácido L-ascórbico
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
AIA	Ácido 3-indolacético
APCI	Ionización química a presión atmosférica ( <i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i> )
BHT	Butilhidroxitolueno (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
CID	Disociación inducida por colisión ( <i>Collision-induced dissociation</i> )
DHA	Ácido L-deshidroascórbico
DTT	Ditiotreitol ( <i>treo</i> -1,4-dimercaptobutan-2,3-diol)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
LC	Cromatografía líquida
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
MTBE	<i>terc</i> -Butil metil éter
NBRIP	<i>National Botanical Research Institute's phosphate growth medium</i>
PDA	<i>Photodiode array</i>
PGP	Promotor del crecimiento vegetal ( <i>Plant growth promoting</i> )
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tiempo de retención ( <i>Retention time</i> )
SD	Desviación estándar
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TSB	Medio de digerido de soja y caseína ( <i>Tryptic soy broth</i> )
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
XIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
YED	Medio de extracto de levadura y sacarosa ( <i>Yeast-extract dextrose</i> )

## 1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo forma parte del proyecto “Microorganismos endófitos como inductores de moléculas naturales de interés agronómico” (referencia IPT-2011-0989-060000) cuyo objetivo general es caracterizar y utilizar microorganismos endófitos (bacterias, hongos y endomicorrizas) aislados de cultivos de interés agronómico o industrial (frutos rojos, tomate, soja y plantas usadas para la producción de bioinsecticidas) y usarlos como inoculantes de segunda generación con el fin de inducir modificaciones metabólicas secundarias que permitan la adquisición de propiedades competitivas y generar mayor valor industrial en las plantas inoculadas, gracias al incremento en la producción de moléculas bioactivas como son, por ejemplo, licopeno o ácido ascórbico.

Su carácter innovador reside en el hecho de formular inoculantes de segunda generación a base de bacterias y hongos endófitos que actuarían directamente en el interior de la planta, en combinación con hongos formadores de micorriza arbuscular.

### 1.1. Licopeno en tomate

Los carotenoides son compuestos poliisoprenoides sintetizados por plantas, algas y microorganismos fotosintéticos. El organismo humano no es capaz de sintetizarlos, por lo que es necesario introducirlos a través de la dieta. Están presentes en un gran número de alimentos, principalmente frutas y hortalizas y en muchos casos, son los responsables de su pigmentación roja, anaranjada o amarilla.

Se clasifican en (Figura 1):

- Carotenos o carotenoides hidrocarbonados, constituidos únicamente por carbono e hidrógeno: p.ej.  $\beta$ -caroteno o licopeno.
- Xantofilas o carotenoides oxigenados, cuyas estructuras incluyen además, grupos epóxido, carbonilos, hidroxilos, metoxilos, etc: p.ej. violaxantina o zeaxantina.

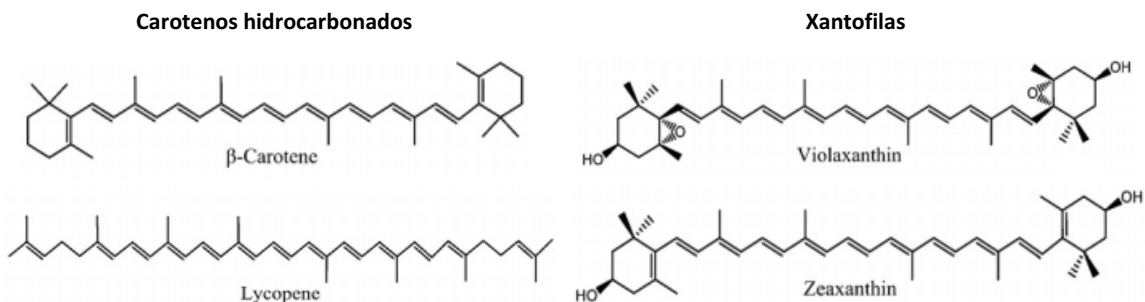


Figura 1: Clasificación de carotenoides.

Este tipo de moléculas actúan como reguladores de crecimiento, fotoprotectores o precursores de hormonas como el ácido abscísico en plantas. En el caso de humanos y

animales, son precursores de la vitamina A y compuestos retinólicos utilizados en la morfogénesis.<sup>1</sup> Sin embargo, el interés en estos compuestos no sólo se debe a su actividad de provitamina A, sino también al carácter antioxidante<sup>2</sup> que presentan, ya que son capaces de contrarrestar la acción de los radicales libres y disminuir el estrés oxidativo en el organismo. De hecho, existen numerosos estudios que constatan la estrecha relación entre el consumo de carotenoides y la disminución del riesgo de enfermedades como el cáncer,<sup>3</sup> degeneración ocular, lesiones neuronales<sup>4</sup> o enfermedades cardiovasculares.<sup>5</sup>

El **licopeno** (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, 536,89 g/mol), pigmento carotenoide rojo más abundante en el tomate (Figura 2), es la forma acíclica del β-caroteno. Se trata de una estructura altamente insaturada, conteniendo 11 dobles enlaces conjugados y 2 sin conjugar. Este hecho hace del compuesto una sustancia muy poco volátil y altamente inestable, de modo que sus dobles enlaces pasan con enorme facilidad de *trans* (forma termodinámicamente más estable presente en tomates frescos) a alguna de las 71 posibles formas *cis* (Figura 3).

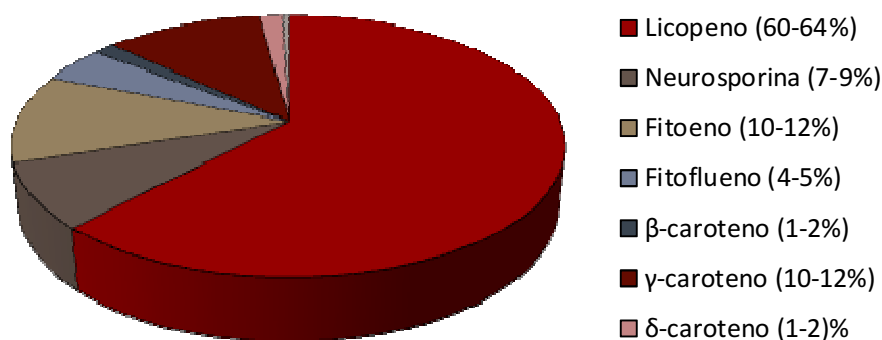


Figura 2: Perfil de carotenoides en tomate.

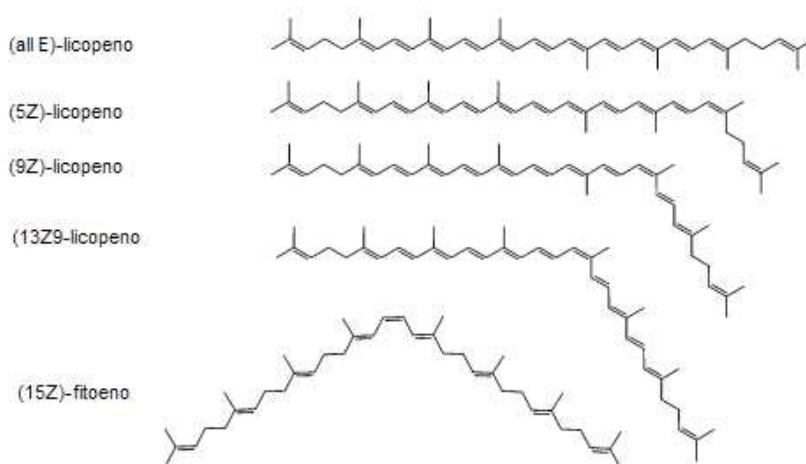


Figura 3: Principales isómeros del licopeno.

La inestabilidad mencionada anteriormente implica un alto grado de dificultad a la hora de manipular las muestras y llevar a cabo los procedimientos experimentales. Es por ello



esencial, proporcionar métodos analíticos rápidos y fiables para la determinación cuantitativa del licopeno en diferentes matrices.

Algunos de los métodos publicados para el análisis de carotenoides en productos alimentarios son: HPLC acoplado a detectores PDA<sup>6,7</sup> o MS,<sup>8</sup> espectrofotometría y colorimetría. Aunque estos dos últimos métodos proporcionan una rápida evaluación del contenido en licopeno, es la cromatografía líquida de alta resolución la que permite una mayor versatilidad, selectividad, sensibilidad y fiabilidad para la determinación de este carotenoide en productos derivados del tomate u otros alimentos. La técnica más empleada es HPLC en fase reversa<sup>9</sup> con columnas C18 y C30, proporcionando estas últimas mejor resolución para carotenoides de polaridad similar (como pueden ser el  $\beta$ -caroteno y el licopeno).<sup>10</sup> Se opera en modo isocrático o gradiente con una gran variedad de fases móviles, MeOH/THF; ACN/MTBE; MeOH/MTBE, empleando dopantes<sup>11</sup> y usando como detectores UV-Vis, PDA<sup>9</sup> o MS.<sup>12,13</sup> En cuanto a los métodos de extracción, existe un amplio abanico desde los más sencillos<sup>1, 14</sup> a los más tediosos,<sup>9, 14-15</sup> empleando una gran variedad de disolventes: cloroformo,<sup>16</sup> hexano,<sup>17</sup> fluidos supercríticos,<sup>18</sup> etc.

El objetivo de este trabajo ha sido establecer un método de cuantificación rápido, eficaz y económico, teniendo en cuenta los recursos disponibles y el carácter lábil del licopeno. Así pues, la preparación de las muestras fue lo más sencilla posible, se utilizó el disolvente para la extracción más compatible con las fases móviles y se optimizó el método de HPLC/MS para disminuir al máximo los tiempos de análisis de cada una de las tesis. Además, para tener una referencia de apoyo en cuanto a caracterización y cuantificación del analito, se ha llevado a cabo otros dos análisis en paralelo: Resonancia Magnética Nuclear de protón en una y dos dimensiones (<sup>1</sup>H-RMN, 2D-COSY) y un ensayo de espectrofotometría UV-vis.

## **1.2. Ácido ascórbico en fresa**

La fresa es la fruta de temporada estival más popular debido a su sabor, textura y aroma. Su valor nutricional radica en el contenido en vitamina C que presenta, vitamina que resulta ser la de mayor importancia en nutrición humana debido a su carácter antioxidante y que se suple a través de la fruta y la verdura. De su actividad biológica destacan la reducción de enfermedades carcinogénicas y cardiovasculares, la estimulación del sistema inmune<sup>23</sup> humano, producción de colágeno, oxidación de la fenilalanina y tirosina, conversión del ácido fólico a ácido tetra-hidrofílico, etc. Está involucrada además en los procesos inflamatorios y la carencia de esta vitamina produce la enfermedad del escorbuto.<sup>24</sup>

El ácido L-ascórbico (AA) representa el 90% del contenido total en vitamina C y es la forma predominantemente activa. Se oxida reversiblemente a la forma L-deshidroascórbico (DHA), que también presenta actividad biológica<sup>2</sup> (Figura 4).

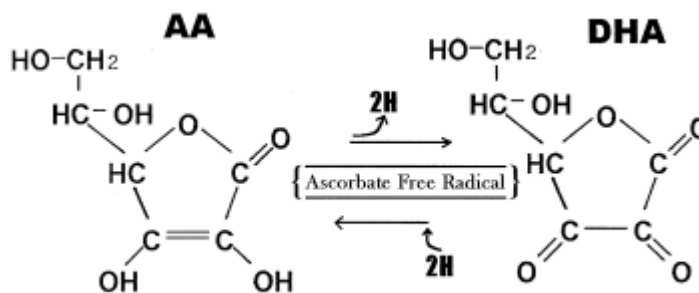


Figura 4: Reacción rédox del AA y DHA

Aunque para cuantificar de forma precisa el contenido en vitamina C de la matriz biológica en cuestión es importante determinar el contenido de ambos, se puede considerar únicamente el porcentaje de ácido L-ascórbico en una determinación rápida y aproximada.

El tratamiento de las muestras que proceden de matrices biológicas debe ser extremadamente cuidadoso, ya que la lisis celular producida durante los procesos de extracción permite a las enzimas responsables de la degradación del AA ponerse en contacto con el sustrato.<sup>19</sup> Además, cualquier variación de temperatura y en el tiempo de preparación favorece dicho proceso. Resulta pues necesario evitar la acción enzimática mediante la disminución del pH, lo que favorece la estabilidad del AA. Para la extracción del AA procedente de material biológico se suelen emplear soluciones ácidas; entre los ácidos más usados, están los ácidos meta-fosfórico,<sup>20</sup> fosfórico, acético e incluso oxálico, bien solos o bien en mezclas y añadiendo o no antioxidantes.

Muchos son los métodos descritos para el análisis del AA: espectrofotometría, fluorimetría, fluorimetría indirecta, electroforesis capilar, quimioluminiscencia, voltametría y, por último, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector UV-Vis, siendo este último el que proporciona resultados más limpios y fiables al incrementar la sensibilidad y especificidad.<sup>21</sup>

En este trabajo se presenta un método de análisis HPLC-PDA en fase reversa, que no compromete la integridad del ácido ascórbico y que a la vez proporciona unos resultados fiables, siendo rápido y de bajo coste. Se emplea un sencillo método de extracción que consta de tan solo cinco pasos, con una duración aproximada de 30 min, usando una mezcla de ácido fosfórico (8%) y ácido acético (3%). A pesar de que muchos autores recomiendan el uso de antioxidantes como DTT (ditiotretol) o BHT, su utilización presenta ventajas e inconvenientes. La principal ventaja es la precisión de los datos sobre contenido en vitamina C total que se obtienen, ya que se determinan tanto el contenido en AA como en DHA. Normalmente se reduce el DHA a AA empleando el DTT, cuantificando después por diferencia entre el contenido total de AA antes y después de la reducción del DHA. Sin embargo, la acción del DTT es muy baja al pH de la solución extractora con fosfórico (1,5-2,0), por lo que es necesario

reajustar el pH a la neutralidad para que el DTT sea efectivo. Para ello, según describen Milagres Campos y Rocha Ribeiro,<sup>19</sup> es necesario utilizar un buffer hasta alcanzar un pH de entre 5,5-6,0 realizar la reducción en esas condiciones y, antes de inyectar, ajustar de nuevo el pH con ácido sulfúrico hasta 2,0. El considerable aumento en el tiempo de extracción resulta ser una gran desventaja, teniendo en cuenta que cuanto mayor sea, más posibilidades de degradación del AA existen. Por esta razón, el método de extracción que se presenta en este trabajo resulta mucho más sencillo y rápido, con la única exigencia de preparar las muestras el mismo día en que vayan a ser analizadas por HPLC, preservarlas de la luz y de posibles aumentos de temperatura y mantenerlas en frío justo antes de inyectar. Procediendo de esta manera los resultados que se obtienen son de una calidad considerable y para hacer estudios comparativos resultan más que aceptables.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Licopeno**

Todas las manipulaciones se llevaron a cabo con el mayor cuidado posible en cuanto a protección de la luz solar y artificial directa y evitando en todo momento posibles aumentos de temperatura. Cuando fue necesario el transporte de las muestras, se envolvieron en papel de aluminio y /o se emplearon viales ámbar.

#### **2.1.1. Reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico: TEA y cloroformo procedentes de Sigma-Aldrich (Alemania), hexano procedente de Panreac Química SLU (España). Los disolventes orgánicos para HPLC fueron de grado HPLC: MeOH procedente de Alfa-Aesar (Alemania), y MTBE y ACN procedentes de Sigma-Aldrich (Alemania). El agua fue obtenida a partir de un sistema Milli-Q.

#### **2.1.2. Muestras**

La variedad de tomates empleada en este trabajo fue *Marmande* (Figura 5), una variedad de crecimiento indeterminado y ciclo precoz. El tamaño medio del fruto ronda los 70 g y su morfología es aplanada y acostillada, con cuello verde de 5-7 lóbulos. La siembra se realizó en maceta a mediados del mes de julio y a mediados del mes de agosto se trataron con 3 cepas bacterianas (NTAB-T27, NTAB-T43 y RBA-OR133) a una dilución 1/100, excepto en los controles (plantas sin inocular y plantas tratadas con el medio de cultivo de las bacterias, TSB), tal como se recoge en la Tabla 1. Todo el cultivo se llevó a cabo en maceta y en invernadero. Los tomates empezaron a aparecer a principios del mes de septiembre, pero no fue hasta finales de noviembre cuando se realizó la cosecha.



Figura 5: Tomate variedad *Marmande*.

TESIS	TRATAMIENTO	BACTERIA	CARACTERÍSTICAS
1	Control	-	Fue la primera tesis en dar frutos.
2	TSB 15/8	Medio de cultivo	No se obtuvo ningún fruto.
3	RBA-OR133	<i>Pseudomonas Lurida</i>	- Productora de ACC desaminasa - Productora de sideróforos - Solubiliza fosfato (en medios NBRIP y YED) - Agente biocontrolador de hongos y bacterias fitopatógenas
4	ENT27 15/8	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T)	- Productora de sideróforos - Productora de AIA - Antagonista frente a bacterias y hongos fitopatógenos
5	ENT43 15/8	Sin caracterizar	En los ensayos de re-inoculación de plantas de tomate se observó que éstas presentaban un tamaño más grande y mejor aspecto que las plantas no tratadas.

Tabla 1: Tesis empleadas en el estudio de licopeno.

### **2.1.3. Preparación de muestras y estándares de carotenoides**

Se ha empleado el siguiente procedimiento para la preparación de muestras: Aproximadamente 50 g de pulpa de tomate, una vez retiradas pepitas y piel, se trituran y, a continuación, se procede a la lisis celular mediante rotura mecánica en mortero con nitrógeno líquido para liberar todo el licopeno posible procedente de los cloroplastos. A la pasta obtenida se le añaden 20 ml de cloroformo y se introduce la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 15 min. Posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 7 min, obteniéndose dos fases. Se retira por succión la fase orgánica y se pasa a través de filtros de nylon de 0,45 µm. Por último el extracto se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Además de extractos de tomate, se han usado como primera aproximación de estándares, un preparado farmacéutico “Lycocor” procedente de Gelfipharma International (Italia) enriquecido en licopeno (4,5 mg de licopeno según composición del prospecto) y un extracto comercial “Lyc-O-Mato®” procedente de Vital Health care UK Limited (Reino Unido), con un 15% de licopeno. Ambos se presentan en cápsulas blandas y el procedimiento de extracción ha consistido en extraer el contenido con cloroformo, sonicar y secar bajo corriente de nitrógeno. Los disolventes empleados para uno y otro respectivamente fueron MeOH/ACN y *n*-hexano, todos procedentes de Sigma-Aldrich (Alemania). Estos extractos se utilizaron para identificar los picos correspondientes al licopeno y sus isómeros, así como para hacer las primeras estimaciones del contenido en licopeno de extracto de tomates comerciales.

Para la preparación de la recta de calibrado externa se ha empleado un patrón de licopeno (riqueza del 90%) procedente de Aldrich (Alemania).

### **2.1.4. Condiciones cromatográficas (HPLC-MS/MS-APCI)**

El análisis cuantitativo de licopeno se ha realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem empleando APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) como fuente de ionización.

Esta técnica consiste en la introducción de la muestra y separación de sus componentes a través del sistema HPLC, transformación del analito en especies iónicas en fase gaseosa, separación y análisis de los iones pseudomoleculares y de los fragmentos cargados seleccionados según su relación  $m/z$ .

### HPLC

La separación cromatográfica se ha realizado utilizando un sistema de HPLC Perkin Elmer *Series 200* acoplado con un sistema híbrido QTRAP LC-MS/MS (Applied Biosystems MDS Sciex) con una columna en fase reversa YMC-C30 250 x 4,6 mm 5  $\mu\text{m}$  de Teknokroma (España) y un flujo de 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ , usando un gradiente binario de metanol conteniendo TEA al 0,1% (v/v) (A) y MTBE (B). El perfil de elución es el siguiente:

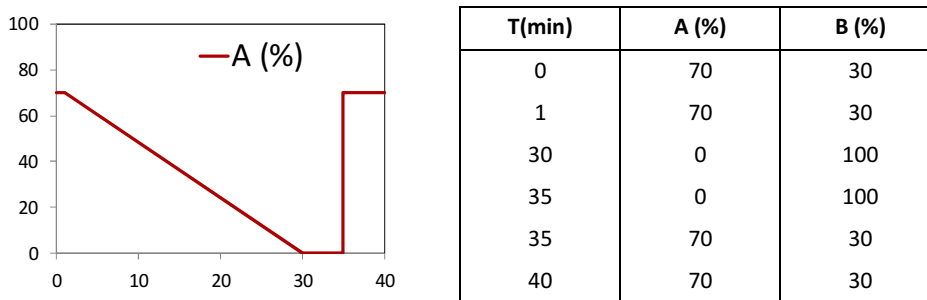


Figura 6: Perfil de elución

### Espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas es una técnica esencial en la determinación estructural de compuestos, ya que determina la relación masa/carga de iones en fase gaseosa sometidos a un campo eléctrico y magnético. Esta información se usa para deducir la masa molecular del analito con gran precisión. Además, la espectrometría de masas en tándem permite estudiar los fragmentos procedentes de la descomposición de dichos iones (*MS-MS*).

El sistema utilizado es un triple cuadrupolo de geometría QqQ<sub>LIT</sub> (Figura 7) en el que el primer y tercer cuadrupolo actúan como analizadores, mientras que el segundo opera como celda de colisión de baja energía. En el analizador Q-1 se selecciona la masa de un ión dado procedente del haz de iones producidos en la fuente de ionización. El ión seleccionado, denominado “ión precursor”, se direcciona hasta una región de relativamente alta presión donde se hace colisionar con moléculas de gas. Al colisionar, una porción de la energía cinética del ión se convierte en energía interna, produciéndose una reacción de fragmentación (*CID: Collision Induced Dissociation*). Los iones-fragmento pasan entonces al segundo analizador de masas, Q-3. El resultado es un espectro de *MS/MS* que proporciona información no sólo acerca del ión molecular o pseudomolecular de cada analito, sino además de los iones fragmento procedentes de roturas características.

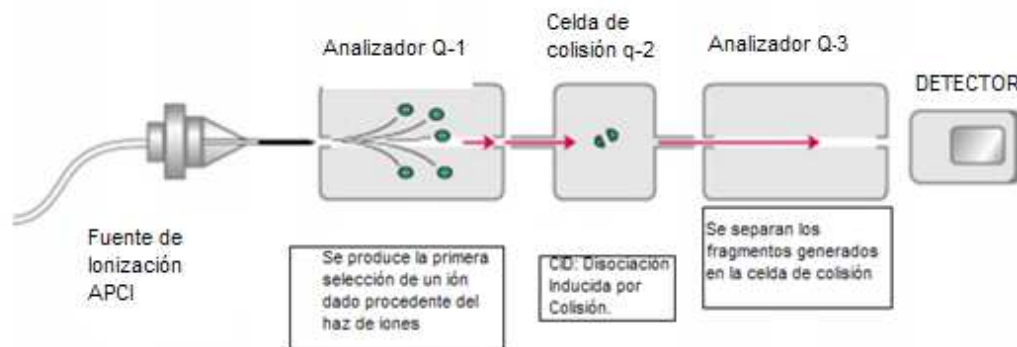


Figura 7: Esquema simplificado del espectrómetro de masas APCI-MS/MS.

Esta técnica facilita la cuantificación y elucidación estructural de carotenoides individuales que coeluyen, como es el caso del licopeno y sus isómeros estructurales  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno.

El estudio realizado por Fang et al.<sup>10</sup> muestra que estos isómeros producen iones moleculares de relación  $m/z$  536 empleando APCI en modo negativo<sup>22</sup> como fuente de ionización. Sin embargo, durante el proceso CID, sólo el ión molecular del licopeno formaba dos iones fragmento. Un primer fragmento  $[M-69]^-$  muy abundante con relación  $m/z$  467, que se corresponde con la pérdida de un fragmento de isopreno terminal, y un segundo ión fragmento menos abundante, resultado de la pérdida de los dos isoprenos terminales de la molécula con una relación  $m/z$  398.<sup>13</sup> En este trabajo se ha empleado sólo la transición  $536 \rightarrow 467$  para distinguir al licopeno de sus isómeros estructurales.

#### Ionización química a presión atmosférica (APCI)

En la ionización química a presión atmosférica, las moléculas de la muestra en fase gaseosa se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear un gas reactivo con electrones. Permite el análisis de moléculas con bajo masa molecular (1300 u) y no volátiles y permite obtener espectros de masas de iones positivos y negativos. El flujo de trabajo permitido es alto (0,2 - 2,0 ml/min).

El proceso se puede resumir en tres pasos (Figura 8):

1. Mediante un alto voltaje se ioniza el gas nebulizante (nitrógeno) formando los primeros iones.
2. Estos primeros iones reaccionan inmediatamente con las moléculas de disolvente formando iones reactivos.
3. Los iones reactivos reaccionan, por transferencia de un protón, con las moléculas del analito formando  $[M+H]^+$  en modo positivo o  $[M-H]^-$  en modo negativo.

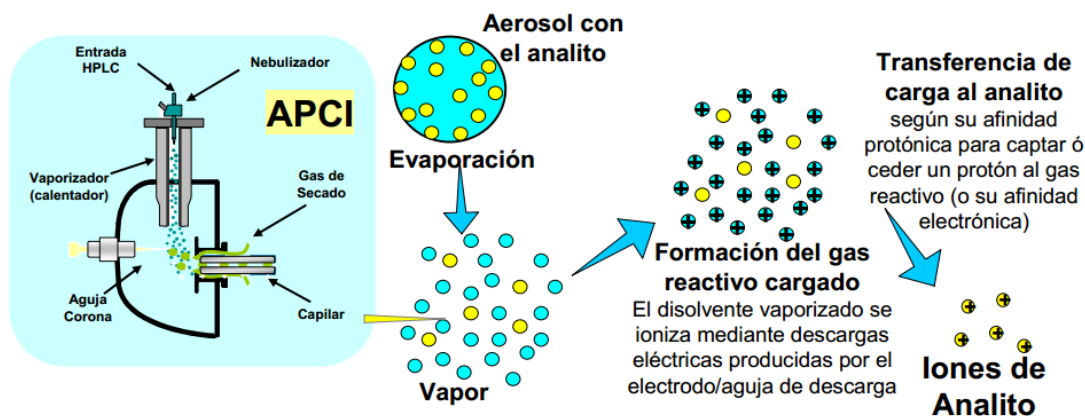


Figura 8: Funcionamiento de fuente de ionización APCI (Fuente: *Agilent Technologies*)

### Experimento MRM

La adquisición de datos en un espectrómetro de masas en tándem puede emplear el método MRM (*Multiple Reaction Ion Monitoring*). En dicho método se selecciona un ión precursor con el primer cuadrupolo y se elige un ión fragmento con el tercer cuadrupolo procedente de alguna fragmentación característica. Se registra señal sólo cuando se observa esa fragmentación, con lo que este modo de operación resulta ser muy sensible y selectivo a la hora de caracterizar familias de compuestos, como son los carotenoides.

#### **2.1.5. Espectrofotometría UV-vis**

Para confirmar la cuantificación del licopeno mediante el método de HPLC, se llevó a cabo un ensayo espectrofotométrico en el rango ultravioleta-visible para registrar las absorbancias máximas tanto del licopeno, como de los otros carotenoides mayoritarios (principalmente  $\beta$ -caroteno). La tesis empleada como confirmación fue la tesis control y su preparación se limitó a disolver el extracto ya seco en 5 ml de acetona, empleado como blanco dicho disolvente. Una vez realizada las medidas, se procesaron los datos empleando para ello el coeficiente de extinción molar correspondiente (ver apartado 3.1.3).

#### **2.1.6. Condiciones de Resonancia Magnética Nuclear, $^1\text{H-RMN}$**

Para comprobar que efectivamente lo que se estaba extrayendo en las primeras pruebas era licopeno, se realizaron dos experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): un experimento monodimensional de  $^1\text{H}$  y un experimento bidimensional de correlación homonuclear  $^1\text{H-}^1\text{H}$ : 2D-COSY con el fin de identificar y corroborar la presencia del licopeno y sus isómeros estructurales. Para ello, se disolvió el extracto seco de tomate comercial en unos 2 ml de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , 99,8%) y se llevó a un tubo de RMN. El equipamiento



empleado para el análisis fue un Espectrómetro Bruker Advance AVIII500 de 500,40 MHz equipado con una criosonda TXI de 5 mm para  $^1\text{H}$ , de elevada sensibilidad para muestras de RMN en disolución. El espectro fue registrado a temperatura ambiente. El espectro de protones para el análisis de los carotenoides se referenció usando la señal residual de  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta=7,26$  ppm). Las condiciones para cada uno de los experimentos mencionados arriba fueron:

El espectro monodimensional de  $^1\text{H}$  se registró usando pulsos de  $30^\circ$  de acuerdo con el protocolo estándar de Bruker.<sup>23</sup> Se registró un ancho espectral de 10,05 ppm utilizando 64K puntos y, posteriormente, se aplicó una apodización exponencial con  $\text{LB} = 0,5$ .

El espectro COSY se adquirió usando el programa de pulsos estándar de Bruker,<sup>23</sup> aplicando 2048 x 128 puntos en F2 y F1, respectivamente, para registrar un ancho espectral de 10,05 ppm. Los datos se expandieron utilizando un llenado de ceros hasta 2K x 1K y se aplicó una función seno cuadrado en ambas dimensiones.

Los datos obtenidos fueron procesados con los programas *TopSpin 3.0* y *Sparky*.

## **2.2. Ácido ascórbico en fresa**

### **2.2.1. Reactivos**

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y grado HPLC:  $\text{AcOH}$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  procedentes de Panreac Química SLU (España),  $\text{MeOH}$  de Sigma-Aldrich (Alemania), el agua fue obtenida a partir de un sistema Milli-Q y el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de Panreac Química SLU (España).

### **2.2.2. Muestras**

Una de las tareas del proyecto de investigación en el que este trabajo participa consiste en el seguimiento de las hormonas vegetales de fresas a distintos tiempos de maduración: 30, 60 y 90 días. Las plantas de 90 días presentaban frutos maduros, que fueron recogidos, triturados y congelados.

Las plantas se trataron con diferentes bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPs), dando lugar a 11 tesis que se especifican en la Tabla 2:

TESIS	TRATAMIENTO	BACTERIA	CARACTERÍSTICAS
1	control	-	-
2	NTABE-P310	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199(T)	- Fosfatasa NBRIP - Ureasa - Sideróforos - Actividad AIA (mg/l) 12,00 - Lipasa - Proteasa
3	NTABE-Pi14	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204(T)	- Celulolíticas - Amilasa - Quitinasa - Actividad AIA (mg/l) 234,00 - ACC - Proteasa - Antagonismo frente a hongos fitopatógenos: <i>Botryotinia fuckeliana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> - Antagonismo frente a bacterias fitopatógenas: <i>Pseudomonas Savastanoi</i> , <i>X. Campestris var citri</i>
5	Abv5	<i>Azospirillum Brasilense v5</i>	- Fijadora de nitrógeno
6	NTABE-P310+ Micorriza	(ver 2)	-
7	NTABE-Pi14+ Micorriza	(ver 3)	-
8	Abv5 + Micorriza	(ver 5)	-
9	Abv6	<i>Azospirillum Brasilense v6</i>	- Diazótrofos
10	NTABE-P310 + NTABE-Pi14 + Abv6	(ver 2, 3 y 9)	-
11	Abv6 + Micorriza	(ver 9)	-

Tabla 2: Características y tratamientos de cada tesis.

### **2.2.3. Preparación de muestras y estándares de ácido ascórbico**

Para la preparación de la muestra de fresas y posterior extracción de vitamina C se ha utilizado el siguiente procedimiento: se parte de unos 10 g de fresas trituradas. Mediante la adición de nitrógeno líquido, se lleva a cabo la rotura mecánica de las células en mortero y, a continuación, se procede a liofilizar la muestra. El liofilizado (0,6 g, equivalentes a los 10 g de fresa triturada) se trata con 10 ml de disolución preparada de  $H_3PO_4/AcOH$  al 3% y 8% respectivamente, se centrifuga a 15000 rpm durante 10 min a 5 °C y se recoge el sobrenadante, que se diluye con agua hasta 50 ml. El extracto resultante se pasa a través de filtros de nylon de 0,45  $\mu m$  para su posterior inyección en el HPLC-PAD.

Para la preparación de los patrones se ha empleado una disolución madre de 1000 ppm de ácido L-ascórbico en  $H_2SO_4$  0,01%.

### **2.2.4. Condiciones cromatográficas**

Se ha utilizado un sistema de HPLC Waters-Alliance 2695 acoplado a un detector PDA Waters 2996 (Photo Diode Array), con una pre-columna SecurityGuard Cartridge C18 4 x 3,0

mm ID y una columna Hyperclone ODS C18 - 5 $\mu$ m x 4,0 mm x 250 mm procedente de Phenomenex (Estados Unidos). El loop de inyección del sistema es de 100  $\mu$ l y el volumen de inyección para cada ensayo fue de 100  $\mu$ l. El tiempo de análisis para cada pinchazo fue de 30 minutos, ya que se incluyó un periodo de limpieza con metanol después de la aparición del AA. El perfil de elución se muestra en la Figura 9:

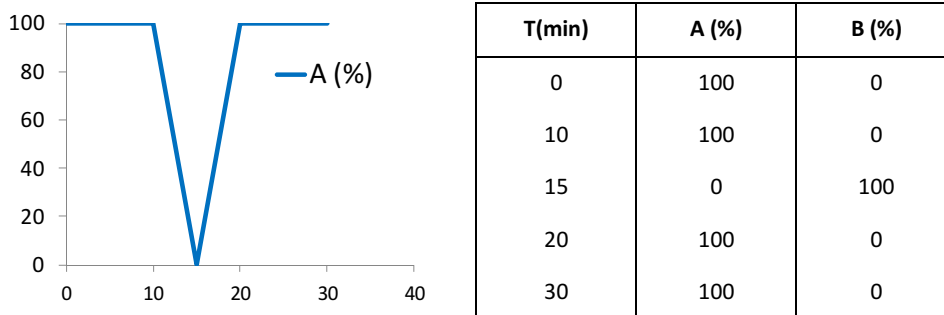


Figura 9: Perfil de elución.

Debido a la inestabilidad térmica observada en las muestras y en los patrones, hubo que tener especial precaución a este respecto, preparándolos frescos para cada análisis y manteniendo en hielo los viales justo antes de introducirlos en el carrusel del equipo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Licopeno

##### 3.1.1. Evaluación de la extracción de carotenoides

La cosecha de los tomates se realizó 2 meses después de la aparición de los primeros frutos. Fue una maduración lenta y con diferencias de una tesis a otra. En el caso de la planta control, tanto la aparición de los frutos como la maduración de éstos se produjo antes que en ninguna otra, seguida por la tesis ENT27, ENT43 y RBA-OR133. Fueron necesarias varias podas y abonos una vez por semana para la obtención de los frutos presentados en la figura 10.

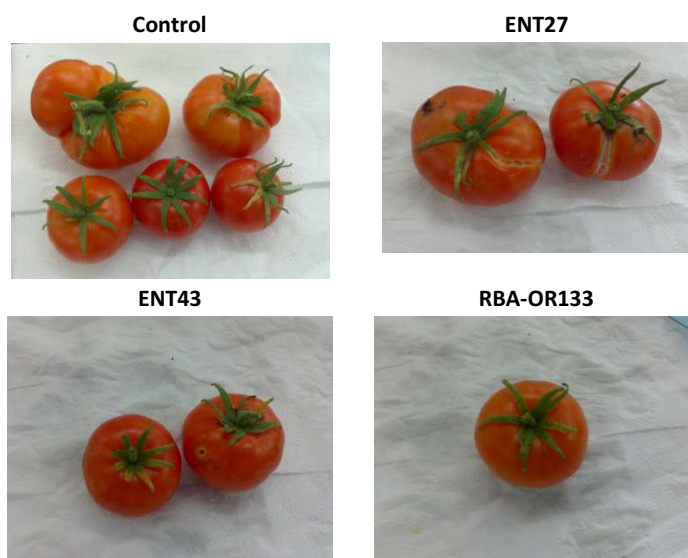


Figura 10: Tesis

El método de extracción utilizado en este trabajo se basó en el protocolo propuesto por Tiziani et. al 2006<sup>16</sup> con leves modificaciones. Tras este proceso, la pulpa de tomate pasó a ser de una tonalidad amarillo pálido, con lo que se consideró aceptable la extracción del analito.

##### 3.1.2. Evaluación del método de HPLC/MS-MS

La mezcla MeOH/MTBE con 0,1% TEA<sup>14,1</sup> empleada como fase móvil proporcionó una buena resolución de picos, como se puede apreciar en la Figura 11. El empleo de TEA mejoró la respuesta de los carotenoides y redujo la degradación en columna. En cuanto a los tiempos de retención, se hicieron varios ensayos para intentar acortarlos modificando los gradientes: los primeros ensayos se hicieron con un gradiente de 95-5% y finalmente se pasó a 70-30%, lo que redujo considerablemente (aproximadamente 10 min) el tiempo de análisis. Por otro lado, antes de utilizar la columna C30, se hicieron ensayos con la C18 para ver las diferencias en resolución y separación de los carotenoides y tras ver los resultados se constató la capacidad de la C30 para resolver entre isómeros estructurales como son el  $\beta$ -caroteno y licopeno.

En cuanto a las condiciones del espectrómetro de masas, se realizaron varias pruebas modificando las energías de colisión para intentar provocar las fragmentaciones características del licopeno. Aunque en la bibliografía se describe argón como gas de colisión, el sistema empleado en este trabajo sólo puede trabajar con nitrógeno, mucho menos eficaz a la hora de fragmentar este tipo de moléculas. Se han ensayado distintos valores de energía de colisión, desde -20 eV, donde no se observaba fragmentación, hasta -80 eV, donde la fragmentación secundaria era excesiva y se obtenían fragmentos no deseados. Finalmente, usando una energía de colisión de -60 eV se han detectado los iones fragmento característicos del analito, si bien en pequeña proporción, obteniéndose espectros con mucho ruido. Por este motivo, no se pudo utilizar esta segunda fragmentación para la cuantificación, sino sólo con fines identificativos.

Para la cuantificación del licopeno, se utilizó el método de calibrado externo que consiste en comparar la respuesta instrumental de diferentes concentraciones de un estándar o patrón, mediante la construcción de una recta. Se mide a continuación la respuesta del analito en la muestra problema y mediante extrapolación, haciendo uso de la ecuación de regresión lineal de la recta anterior, se determina la concentración del analito. Para ello, se prepararon disoluciones del estándar, tanto de licopeno como de  $\beta$ -caroteno, en *n*-hexano, con las concentraciones: 100, 200, 300, 500, 700, 800 y 1000 ppb. Todos los ensayos se hicieron por triplicado para asegurar la reproducibilidad.

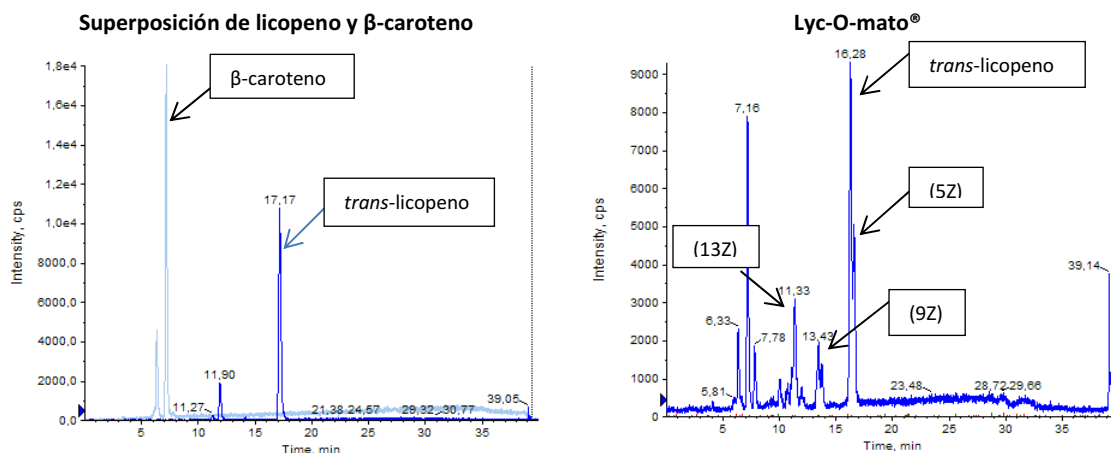


Figura 11: Perfiles cromatográficos de los estándares de licopeno y  $\beta$ -caroteno (izquierda), donde aparecen a 11,90 min el isómero *cis* (13Z) y a 17,17 min el *trans*-licopeno, y a 7,30 min el pico mayoritario del  $\beta$ -caroteno. A la derecha, el perfil cromatográfico del extracto de *Lyc-O-mato*®, donde además aparecen picos correspondientes a otros carotenoides.

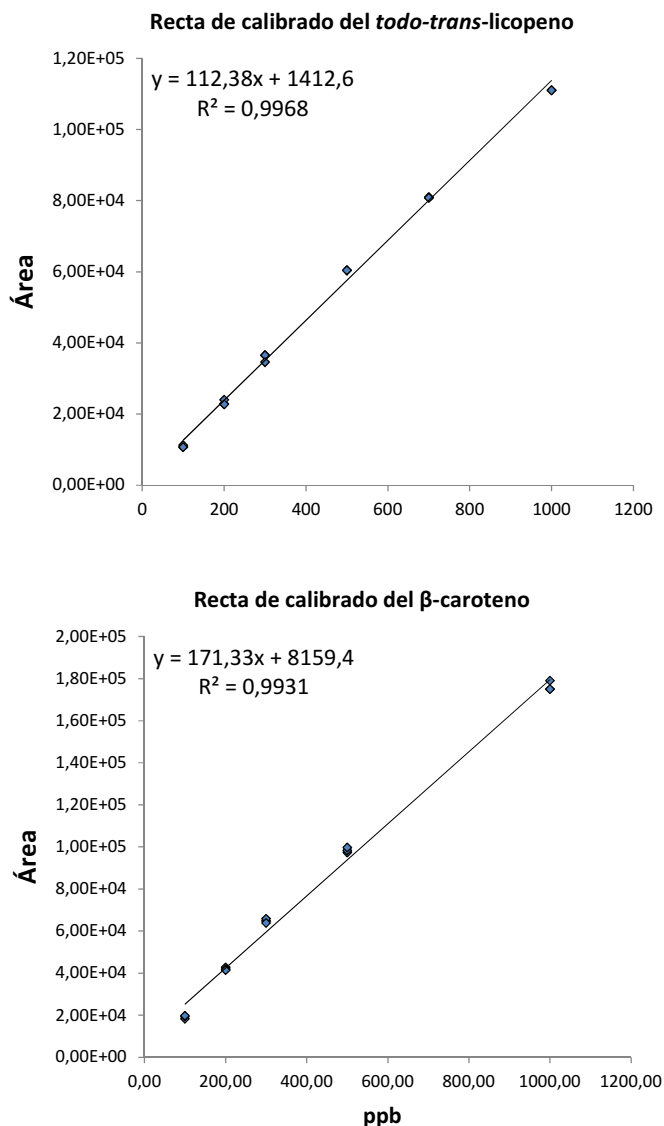


Figura 12: Rectas de calibrado (calibración externa) correspondientes a los estándares de *todo-trans*-licopeno y  $\beta$ -caroteno.

El método de análisis mediante HPLC en las condiciones mencionadas, se evaluó atendiendo a los parámetros de linealidad, límites de detección y cuantificación.

El estudio estadístico de los resultados se realizó de acuerdo al método descrito en el libro “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”<sup>24</sup> y se resume en la Tabla 3.

	Licopeno HPLC (n = 12)	$\beta$ -caroteno HPLC (n = 15)
Ecuación de regresión lineal	Area= 1412,6 + 112,38x	Area= 8159,4 + 171,33x
Coefficiente de correlación	$R^2 = 0,9968$	$R^2 = 0,9931$
Límite de detección (LD)	52,10 ppb	85,59 ppb
Límite de cuantificación (LQ)	173,66 ppb	285,29 ppb

Tabla 3: Parámetros de linealidad, límite de detección y cuantificación del licopeno y  $\beta$ -caroteno mediante HPLC.

### *Linealidad*

El licopeno puro es un reactivo caro (unos 180 €/mg en Sigma-Aldrich), por lo que para los primeros estudios sobre linealidad y estimaciones cuantitativas se han utilizado extractos comerciales procedentes de complementos dietéticos; en el estudio por HPLC-MS/MS se observa una buena linealidad entre 100 y 1000 ppb. En el caso del  $\beta$ -caroteno, este procedimiento no ha sido necesario. Una vez estudiado el comportamiento cromatográfico de los analitos, se obtuvieron las rectas de calibrado de los estándares de licopeno y  $\beta$ -caroteno. Se prepararon en las mismas condiciones que los extractos (*n*-hexano) y se inyectaron en un rango de concentraciones de entre 100 ppb-1 ppm, repitiéndose tres veces cada elución.

La linealidad del método fue confirmada mediante los estudios de regresión estadística detallados anteriormente. Como puede deducirse de los parámetros de linealidad mostrados en la Tabla 3, los coeficientes de correlación están por encima de 0,990.

Es interesante mencionar que la comparación de las pendientes obtenidas a partir de las curvas de calibración de los extractos de *Lyc-O-Mato*<sup>®</sup> (8,735) y de licopeno puro (112,38) son muy diferentes, lo que indica una fuerte dependencia de la matriz. Este hecho hace que no se pueda utilizar este tipo de extracto como alternativa al licopeno puro comercial, aunque sí para obtener una buena colección de carotenoides (Figura 11).

### *Límites de detección y cuantificación*

El límite de detección (LD) fue definido como la concentración resultante de la extrapolación del valor de la ordenada más tres veces la desviación estándar de los valores de ordenadas ( $a + 3s_{x/y}$ ). Los límites de detección obtenidos mediante HPLC fueron de 52,10 ppb para el licopeno y de 85,59 ppb para el  $\beta$ -caroteno y los de cuantificación ( $a + 10s_{x/y}$ ) de 173,66 ppb y 285,29 ppb respectivamente.

Con estos datos, se deduce que el método de HPLC utilizado fue lo suficientemente sensible para analizar este tipo de muestras biológicas.

### *Reproducibilidad*

La reproducibilidad se constató a través de los tiempos de retención que, como se muestra en la Figura 13 y la Figura 14, son casi idénticos entre estándares y muestras, con RT de 17,10 y 7,35 min para *trans*-licopeno y  $\beta$ -caroteno respectivamente.

También se constató la repetitividad del procedimiento cromatográfico a partir del promedio de las desviaciones estándar relativas de cada conjunto de valores de ordenada cuando se repite cada elución por triplicado ( $DER_{\text{promedio}} = 1,5\%$ ).

### Aplicación a las muestras

El método de HPLC se aplicó a las muestras obtenidas a partir de las tesis (ver apartado 2.1.2); 4 tesis de las cuales 3 fueron tratadas con microorganismos endófitos promotores del crecimiento, más el control, sin tratar, y 3 variedades distintas de tomate: “cherry”, “rama” y “pintón”. Los resultados se presentan en la Tabla 4. Se realizó una primera estimación de las cantidades presentes en cada muestra y, posteriormente, se ajustó la concentración de cada una para que estuviese incluida en el rango de concentraciones utilizado en la curva de calibración.

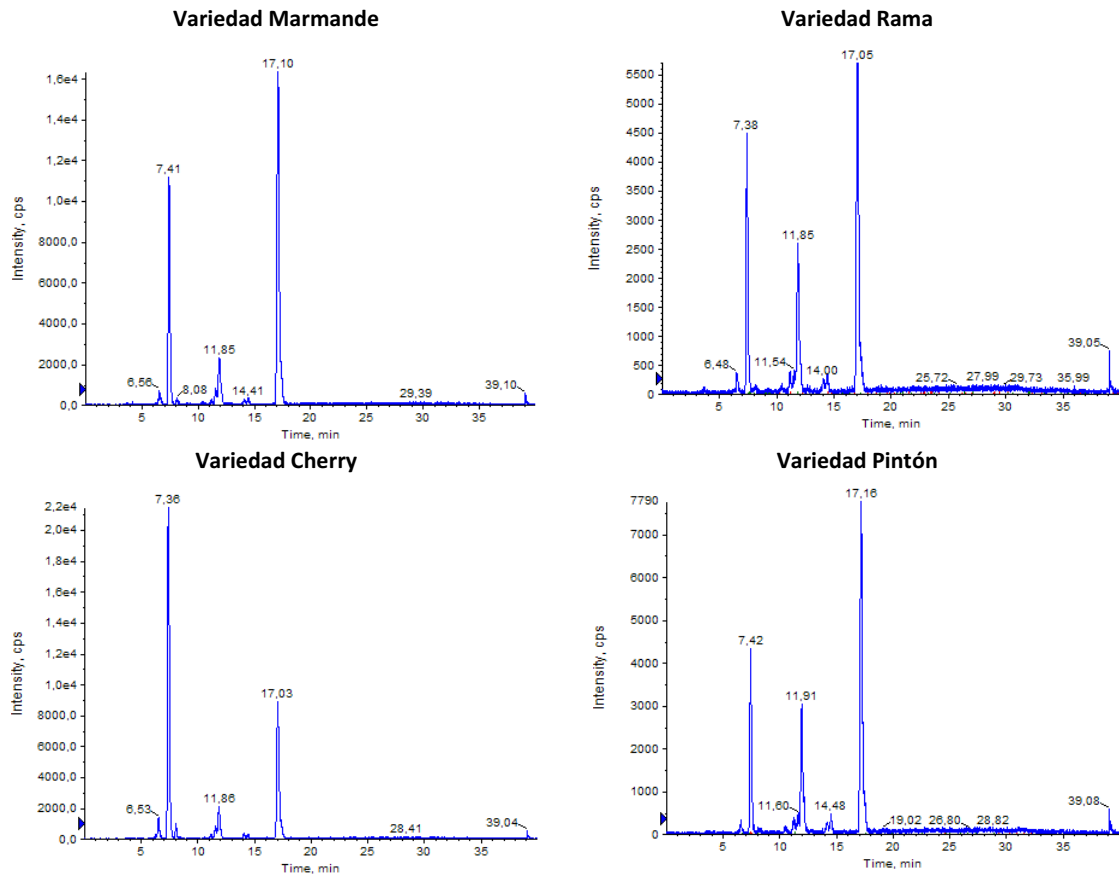


Figura 13: Cromatogramas XIC de MRM correspondientes a las cuatro variedades de tomates: Marmande, cherry, rama y pintón. Se observan los picos de:  $\beta$ -caroteno a aproximadamente 7,35 min, (9Z)- cis-licopeno a aproximadamente 11,85 min y *todo-trans*-licopeno a aproximadamente 17,10 min,.



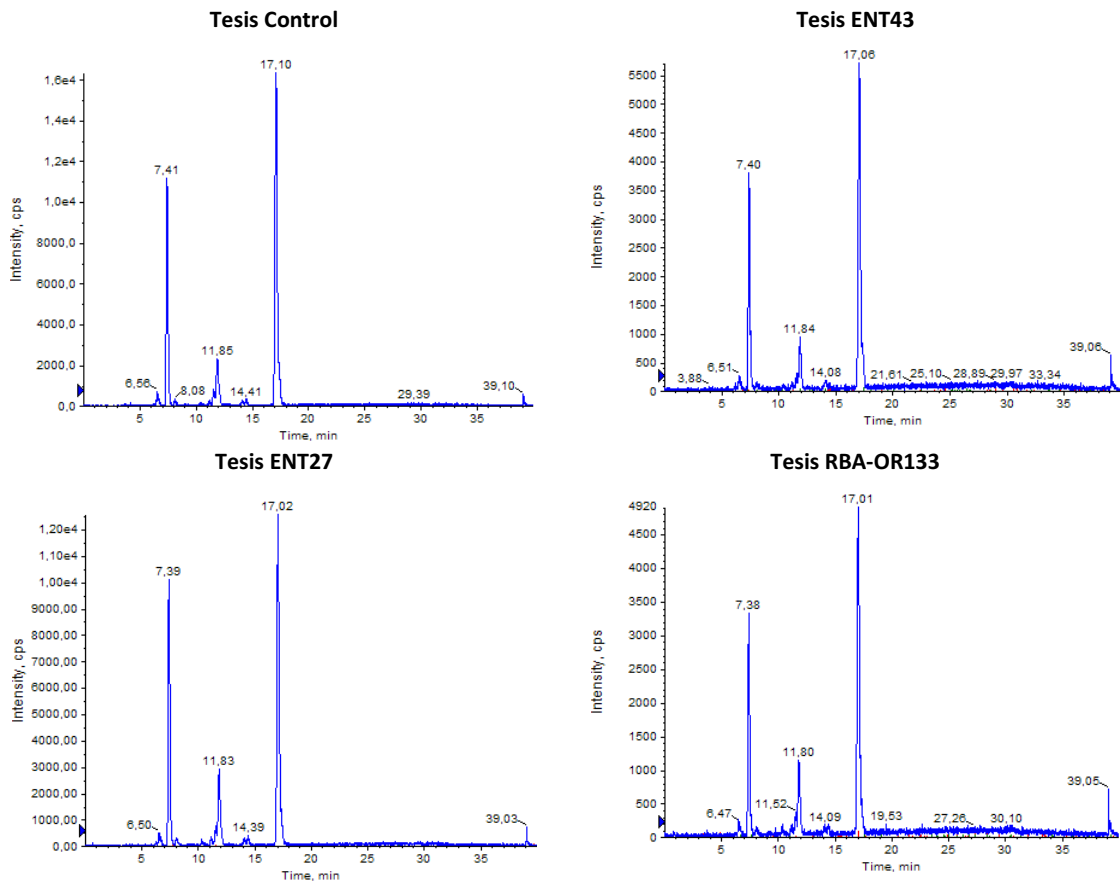


Figura 14: Cromatogramas XIC de MRM correspondientes a las cuatro tesis analizadas: control, T43 T27 y OR133. Se observan los picos de:  $\beta$ -caroteno a 7,40 min aproximadamente.; (9Z)- cis-licopeno a 11,85 min y trans-licopeno a 17,10 min aproximadamente.

	Licopeno (mg/100g)	$\beta$ -caroteno (mg/100g)	Carotenoides totales (mg/100g)
<b>Control</b>	0,897 $\pm$ 0,033	0,240 $\pm$ 0,056	1,144 $\pm$ 0,056
<b>T43</b>	0,408 $\pm$ 0,014	0,094 $\pm$ 0,024	0,502 $\pm$ 0,048
<b>T27</b>	0,745 $\pm$ 0,029	0,276 $\pm$ 0,048	1,021 $\pm$ 0,095
<b>OR133</b>	0,789 $\pm$ 0,010	0,105 $\pm$ 0,016	0,894 $\pm$ 0,032
<b>Cherry</b>	0,644 $\pm$ 0,014	0,582 $\pm$ 0,024	1,226 $\pm$ 0,048
<b>Rama</b>	0,665 $\pm$ 0,014	0,121 $\pm$ 0,024	0,786 $\pm$ 0,048
<b>Pintón</b>	0,796 $\pm$ 0,029	0,039 $\pm$ 0,048	0,835 $\pm$ 0,095

Tabla 4: Contenido en licopeno y  $\beta$ -caroteno (en mg por cada 100 g de tomate fresco)  $\pm$  desviación estándar en las diferentes tesis y en 3 variedades diferentes de tomate.

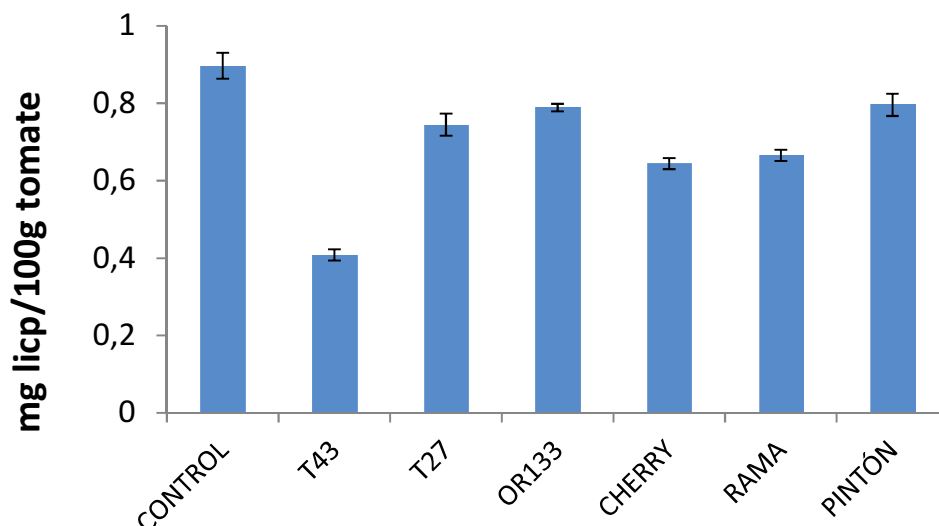


Figura 15: Comparativa de concentración de licopeno en mg/100 g en cada tesis analizada.

En todos los extractos se detectaron  $\beta$ -caroteno y *trans*-licopeno con sus isómeros *cis* (5Z, 9Z, 13Z), aunque el 5Z es apenas detectable en los extractos, sí que está presente en el extracto comercial *Lyc-O-Mato*<sup>®</sup>.

El perfil cromatográfico es distinto para cada variedad de tomate estudiada: así, la proporción entre  $\beta$ -caroteno y licopeno es mayor en el caso del tomate cherry, mientras que es la variedad *marmande* la que presenta una mayor proporción de *trans*-licopeno. Dentro de la misma variedad, (*marmande* en este caso), el perfil se mantiene aproximadamente constante (Figura 14), cambiando únicamente la cantidad total de carotenoides.

### **3.1.3. Espectrofotometría UV-vis.**

Para comprobar que los resultados obtenidos no fueron consecuencia de un efecto matriz acusado, se realizó un ensayo de espectrometría UV-vis con la tesis control. Como disolvente se empleó acetona, que le fue adicionada al extracto previamente secado y se registró el espectro de absorbancia en la región que abarca desde 329 a 550 nm a temperatura ambiente. El espectro obtenido (Figura 16) presenta 3 máximos de absorbancia: 503, 475 y 446 nm. Los dos primeros son los de interés y se corresponden con los picos de absorción del licopeno y del  $\beta$ -caroteno respectivamente.

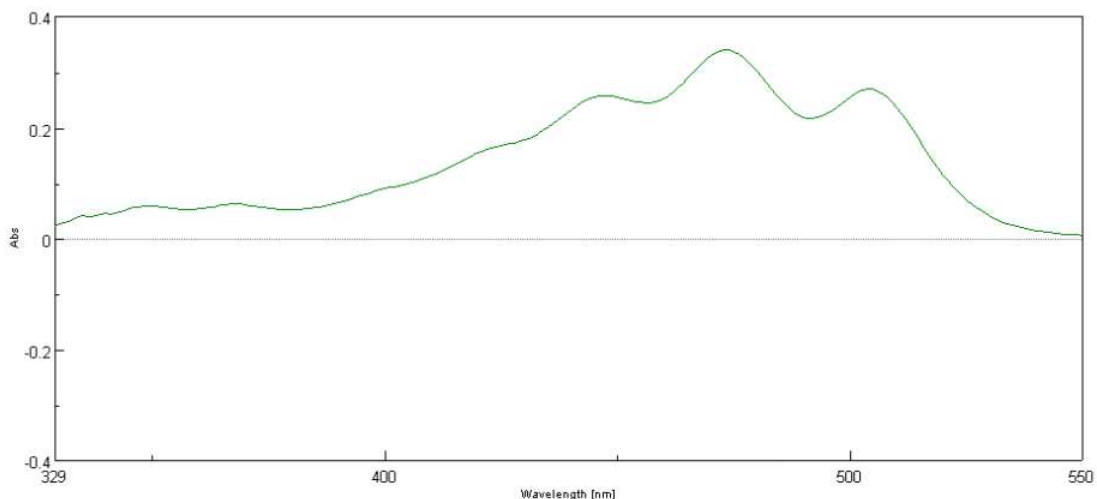


Figura 16: Espectro de absorción del UV-vis de la tesis control donde aparecen los máximos mencionados en el texto: 503, 473, 446 nm.

Para determinar la concentración de licopeno en el extracto, se empleó la siguiente relación, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar para el licopeno en acetona es: 3,12.<sup>25</sup>

$$[\text{Licopeno } (\mu\text{g}/\text{ml})] = 3,12 (Abs_{503})$$

	<b>Espectrofotometría Uv-vis</b>	<b>HPLC-MS/MS-APCI</b>
<b>mg/100g tomate fresco</b>	<b>0,788</b>	<b>0,897</b>

Tabla 5: Comparación de los resultados de cuantificación mediante HPLC-MS/MS y espectrofotometría.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se podría afirmar la eficiencia del método espectrofotométrico como aproximación a un análisis cuantitativo del licopeno, ya que se acerca bastante al valor procedente del HPLC-MS/MS.

### **3.1.4. Evaluación del método de RMN**

#### *Caracterización de carotenoides*

En este trabajo, la asignación de los carotenoides se consiguió combinando las técnicas en <sup>1</sup>H-RMN y 2D-COSY (Figura 18). Los datos sobre desplazamientos químicos característicos de estas biomoléculas provenientes de la bibliografía (Tabla 6) fueron tomados como referencia para la asignación de las muestras.<sup>16</sup> Los resultados se compararon también con los obtenidos mediante el análisis por HPLC-C30 en fase reversa.

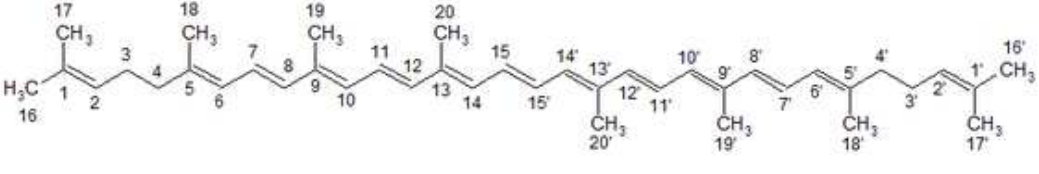
			
<sup>1</sup> H	δ <sub>H</sub> (ppm)	<sup>1</sup> H	δ <sub>H</sub> (ppm)
2 y 2'	5,12 (m, 1H)	12 y 12'	6,355 (d, 1H)
3 y 3'	2,09 (m, 2H)	14 y 14'	6,25 (m, 1H)
4 y 4'	2,11 (m, 2H)	15 y 15'	6,625 (m, 1H)
6 y 6'	5,951 (d, 1H)	16 y 16'	1,716 (s, 3H)
7 y 7'	6,491 (dd, 1H)	17 y 17'	1,629 (s, 3H)
8 y 8'	6,26 (d, 1H)	18 y 18'	1,805 (s, 3H)
10 y 10'	6,182 (d, 1H)	19 y 19'	1,998 (s, 3H)
11 y 11'	6,649 (dd, 1H)	20 y 20'	1,968 (s, 3H)

Tabla 6: Desplazamientos químicos (en ppm) de las señales de <sup>1</sup>H del licopeno en CDCl<sub>3</sub>. Entre paréntesis se indica la multiplicidad y el número de <sup>1</sup>H equivalentes.

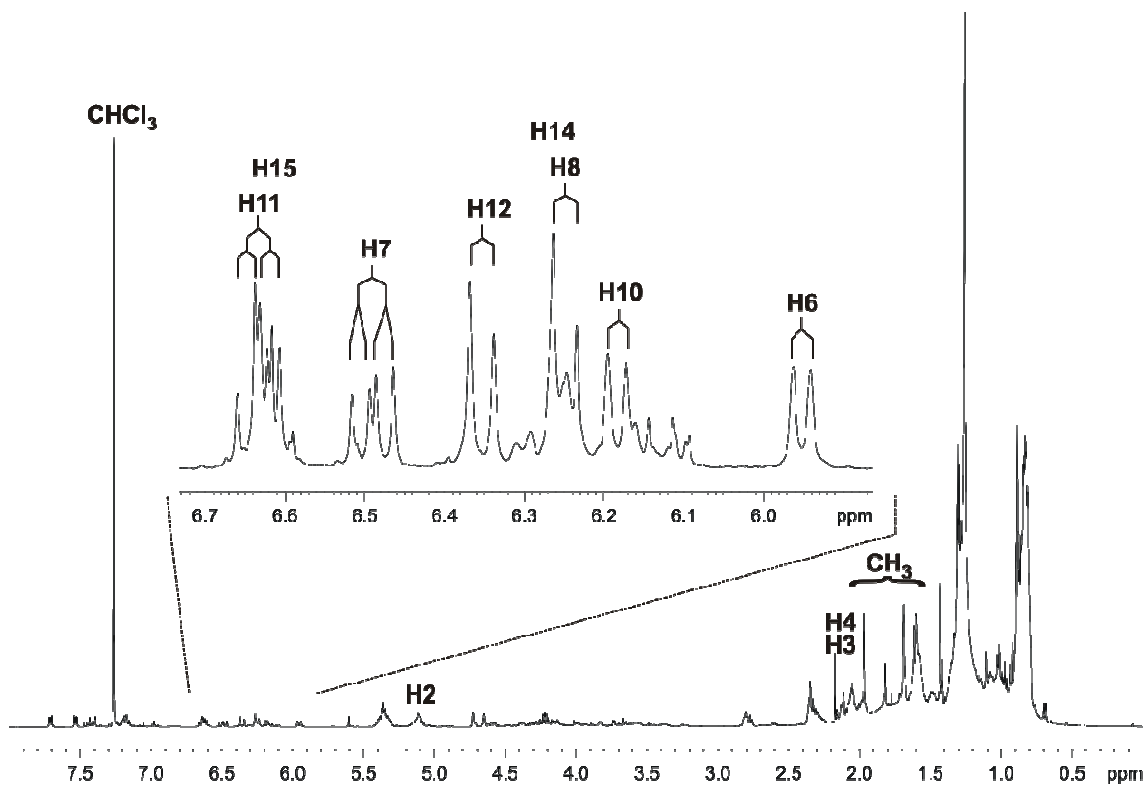


Figura 17: Espectro <sup>1</sup>H-RMN (500,40 MHz) del extracto de licopeno y ampliación de la región entre 6 y 7 ppm, que se corresponde con los dobles enlaces conjugados del licopeno. Se indica también su asignación.

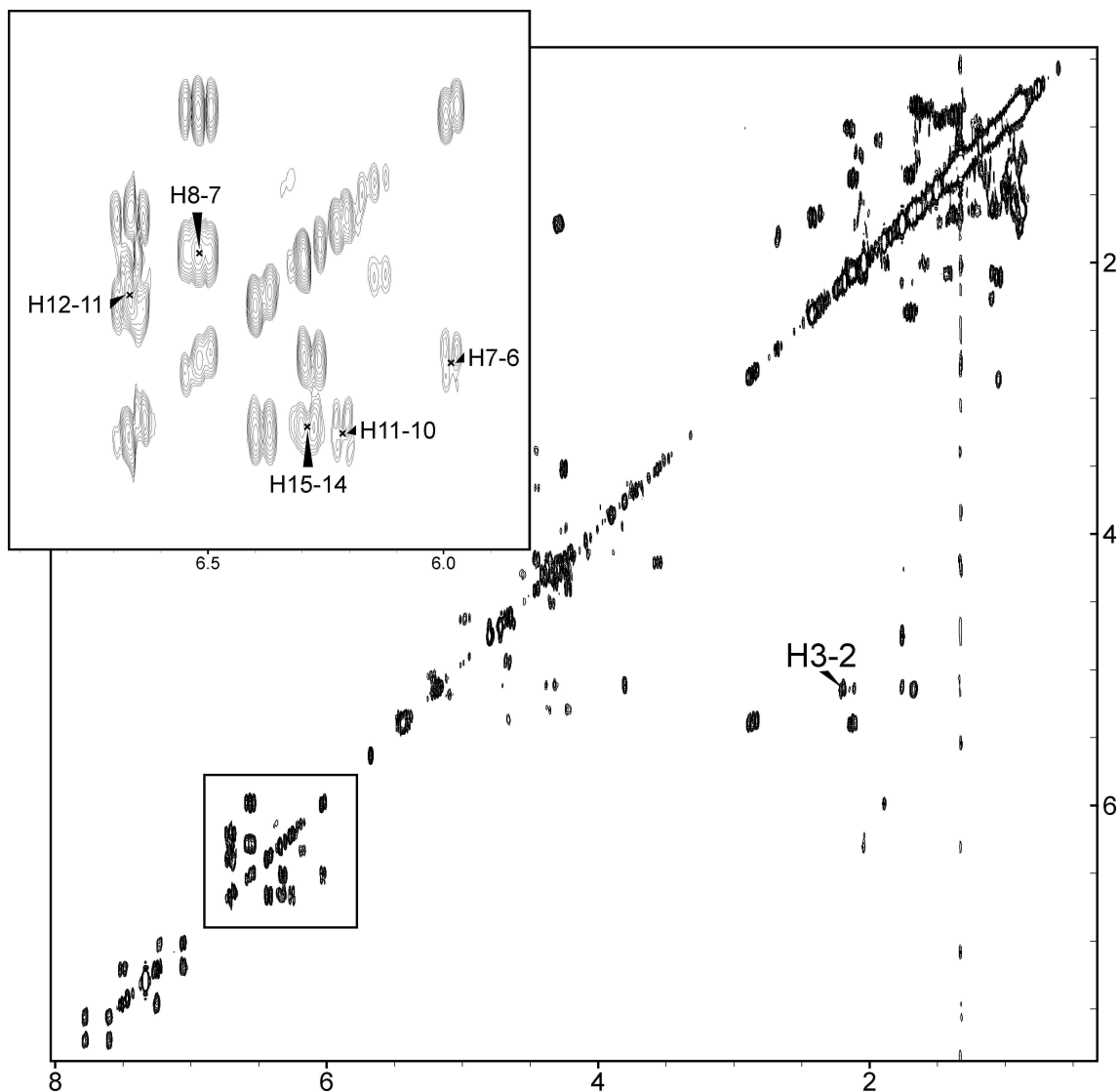


Figura 18: Espectro 2D-COSY del extracto de tomate, con ampliación de la región olefínica y su asignación.

Como se puede apreciar, las señales asignadas en el espectro 2D corresponden a los hidrógenos pertenecientes a los dobles enlaces conjugados en la zona de 6-7 ppm. Ésta resulta ser la región característica que identifica al *trans*-licopeno, ya que es una zona relativamente libre de otras señales. Por otro lado, en la imagen correspondiente al espectro en una dimensión, se indican las señales generadas por los hidrógenos =C-H- entre 5 y 5,5 ppm (señal 2), los hidrógenos -CH<sub>2</sub>- alrededor de 4 ppm (señal 3) y los correspondientes a los grupos metilo terminales -CH<sub>3</sub> que aparecen a un desplazamiento químico de aproximadamente 2 ppm (señal 4). Estas asignaciones fueron corroboradas con la bibliografía.<sup>26</sup>

### 3.2. Ácido L-ascórbico

#### 3.2.1. Evaluación de la extracción de antioxidantes

Como se mencionó en el apartado 2.2.3, las fresas se cosecharon de 3 plantas por cada tesis, tras un cultivo de 90 días y un proceso de trituración y congelación previo.

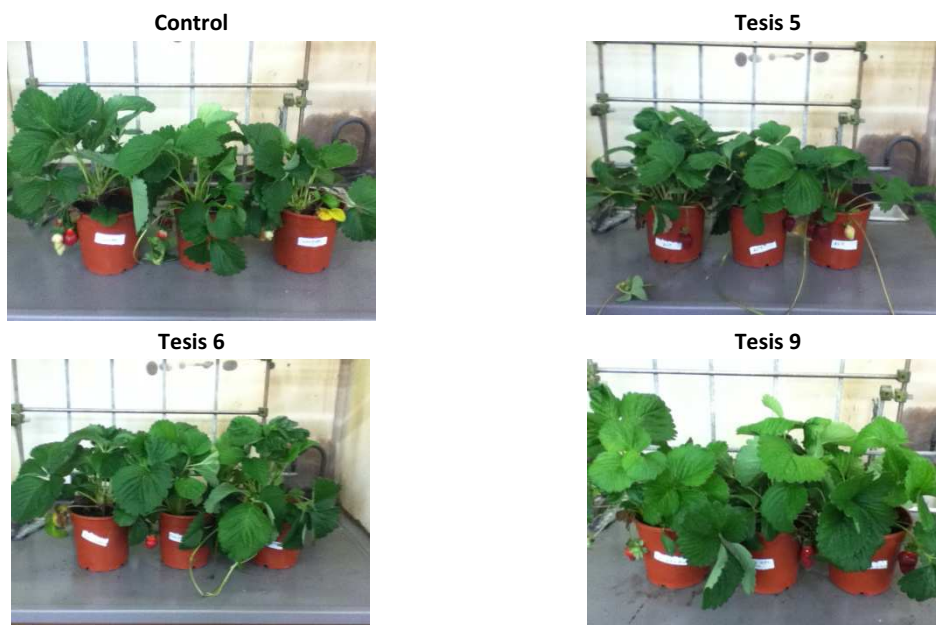


Figura 19: Tesis tras 90 días.

Para la extracción de los antioxidantes hubo que tener especial cuidado para evitar la degradación del ácido L-ascórbico. El procedimiento se basó en el propuesto por Palauff *et al.*,<sup>27</sup> con algunas modificaciones para acortar aún más el tiempo del proceso y adecuarlo a las condiciones de las que se disponía.

Una de las modificaciones que dio muy buen resultado, fue el tratamiento con ultrasonidos durante 20 min, previa a la centrifugación. Con este paso se consiguió obtener una separación de fases realmente buena ayudando a que, tras el proceso de centrifugación, la interfase apareciese perfectamente definida.

#### 3.2.2. Evaluación del método de HPLC-PDA

El método de HPLC-PDA puesto a punto en este trabajo tomó como referencia bibliográfica fundamentalmente el propuesto por Palauff *et al.*,<sup>27</sup> con excepción del uso del DTT por los motivos mencionados en el apartado 2.2.3.

El uso de una disolución de ácido sulfúrico en la fase móvil, además de preservar el ácido ascórbico de la acción enzimática degradativa, ha proporcionado una buena resolución de

picos combinándolo con la columna Hyperclone ODS C18 - 5µm x 4,0 mm x 250 mm procedente de Phenomenex.

Antes de establecer el método de cuantificación, se hicieron ensayos para detectar el posible efecto matriz intrínseco en muestras biológicas. El *efecto matriz* es un tipo de interferencia que consiste en un aumento o disminución de la respuesta instrumental que proporciona el analito debido a la presencia de otros componentes. Es decir, que para la misma concentración de analito, el análisis de un patrón o de una muestra real, no proporciona la misma respuesta instrumental. La consecuencia es un error sistemático proporcional a la concentración de analito en la muestra, que se traduce en diferencias significativas entre las pendientes de las rectas construidas con y sin matriz problema. Así pues, para determinar dicho efecto, se construyeron sendas rectas con patrones de ácido ascórbico entre 10 y 150 ppm en H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01% en presencia y ausencia de extracto de fresas comerciales. El resultado se presenta en la Figura 20.

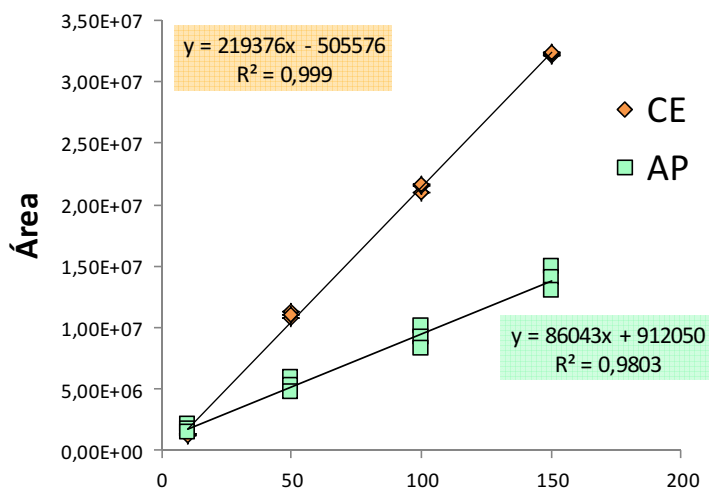


Figura 20: Estimación del efecto matriz. En naranja, curva obtenida en ausencia de extracto de fresas. En verde, curva obtenida añadiendo 850 µl de extracto de fresas a cada disolución de estándar.

Como puede apreciarse, la variación en las respuestas instrumentales fue considerable, por lo que se corroboró la presencia del efecto matriz. Una opción para evitarlo habría sido construir la recta de calibrado externo, tomando una muestra parecida a la muestra problema pero libre del analito y adicionarle cantidades conocidas de éste para obtener soluciones patrón. Sin embargo, esta opción resulta inviable en la gran mayoría de los casos, ya que el efecto matriz puede variar de una muestra a otra y normalmente es casi imposible obtener una muestra que no contenga el analito. Es por ello que la mejor alternativa para subsanar este efecto, es utilizar la técnica de las *adiciones estándar*<sup>24</sup> que consiste en añadir cantidades conocidas y crecientes de analito (patrón o estándar) a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de

adiciones estándar. La cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero.

El ácido L-ascórbico aparece aproximadamente a 4,10 min por lo que, en un principio, los tiempos de análisis fueron cortos (6 min). Sin embargo, a medida que se iban realizando más análisis se observaron cambios significativos en los tiempos de retención, por lo que se decidió incluir un ciclo de lavado de la columna con metanol para descartar posibles interferencias (Figura 21) (apartado 2.2.4). Este hecho trajo como consecuencia un tiempo de análisis mayor (30 min), pero preservó la columna de posibles atascos y fallos por sobrepresión.

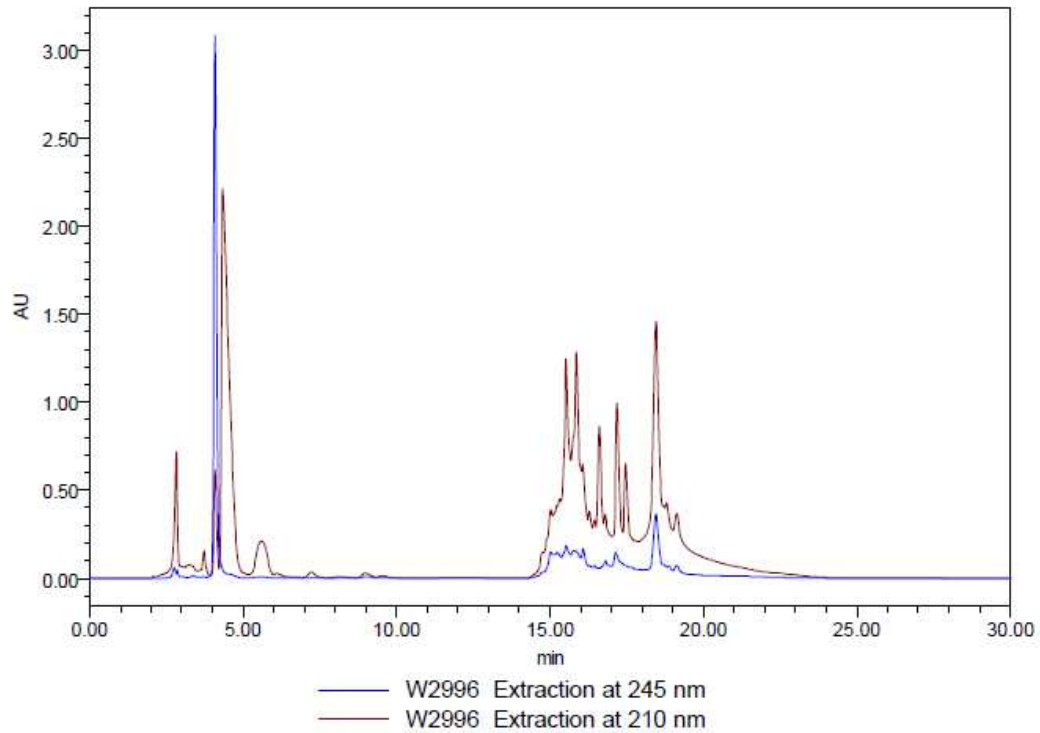


Figura 21: Cromatograma registrado a 245 y 210 nm. Se pueden apreciar las interferencias que aparecen alrededor del minuto 15 y que se consiguieron eliminar introduciendo el ciclo de lavado con MeOH.



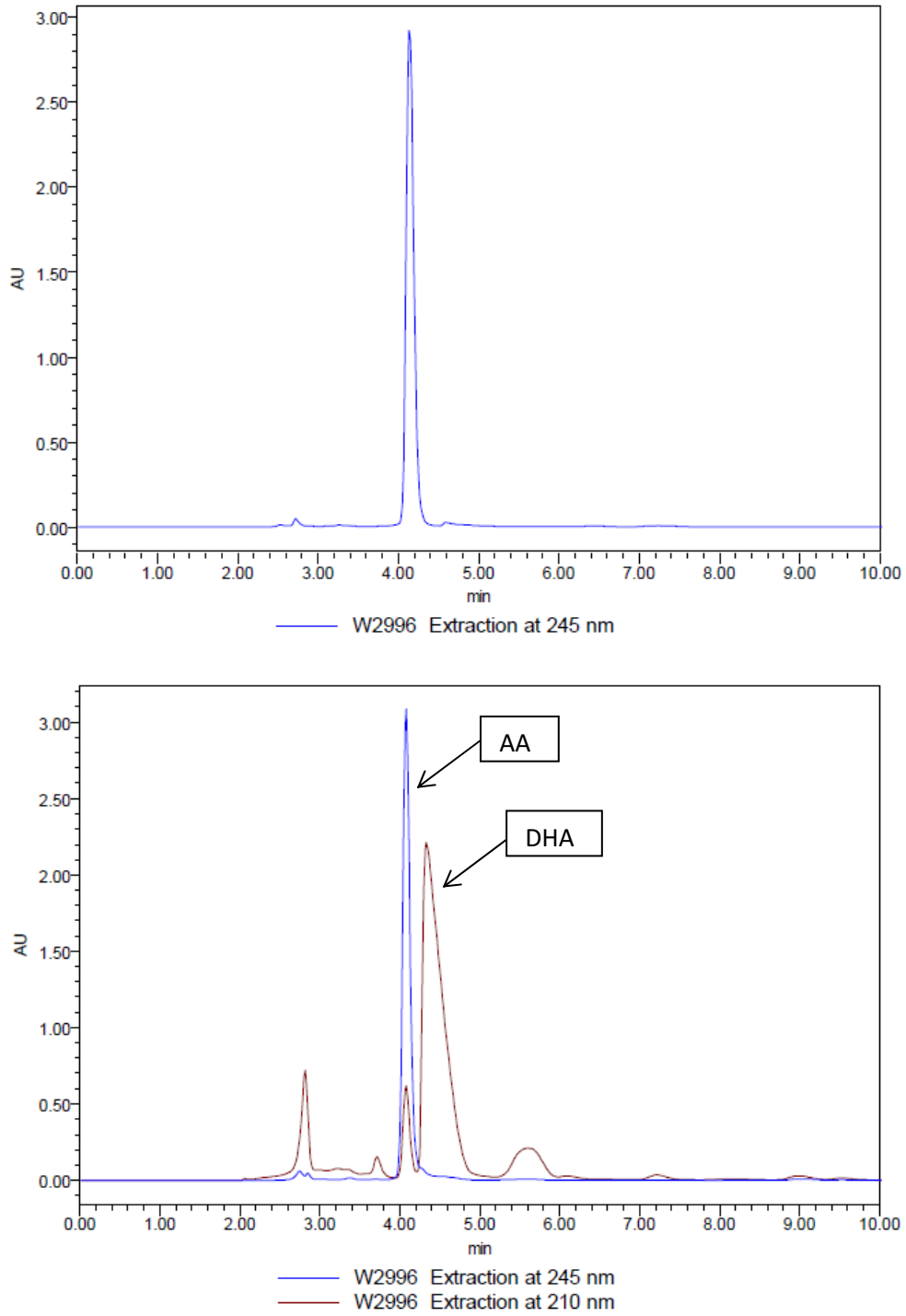


Figura 22: Cromatogramas correspondientes a la tesis 6 (NTABE-P310+Micorriza) a 150 ppm, registrado a 245 y 210 nm. Puede apreciarse la presencia del DHA (210 nm) a un tiempo de retención muy similar al del AA.

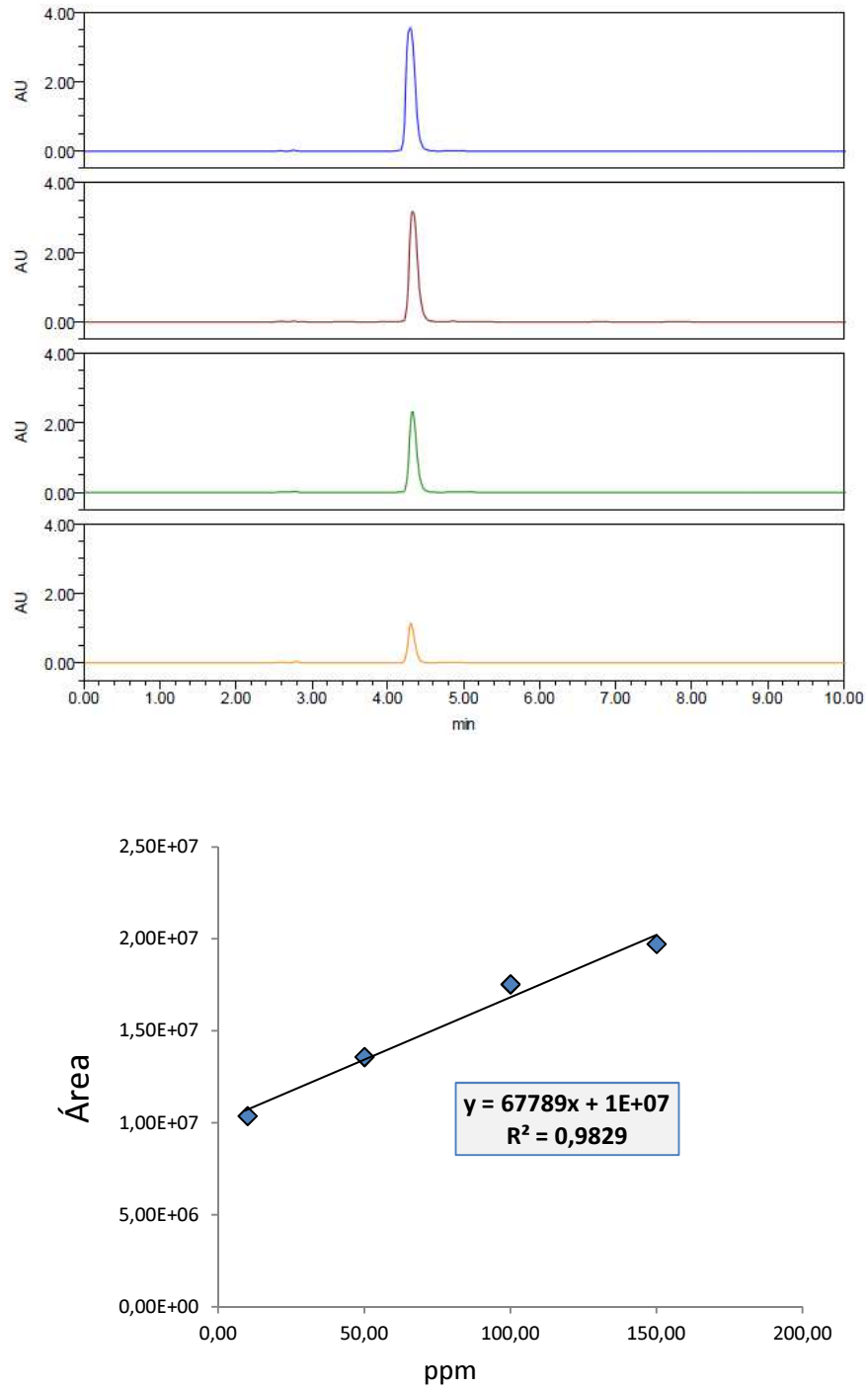


Figura 21: Superposición de los cromatogramas correspondientes a la tesis 6 de 10, 50, 100 y 150 ppm, a una longitud de onda de 245 nm y recta de adición patrón.

Tesis	Ácido L-ascórbico (mg/100g ± sd)
Control	4,65 ± 2,36
NTABE-P310	18,56 ± 1,18
NTABE-Pi14	17,03 ± 4,53
AbV5	70,33 ± 11,65
NTABE-P310+Micorriza	87,18 ± 12,71
NTABE-Pi14+Micorriza	13,35 ± 3,88
AbV5+Micorriza	38,82 ± 17,65
AbV6	25,71 ± 9,12

Tabla 7: Concentraciones de AA obtenidas.

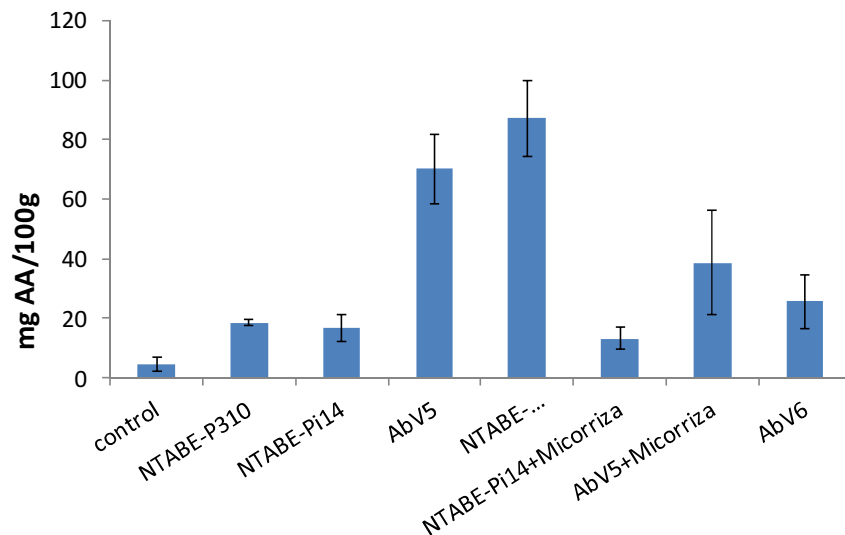


Figura 23: mg de ácido ascórbico por cada 100 g de pulpa de fresa en cada tesis analizada.

Como se aprecia en la figura, el incremento que se produce a causa de los microorganismos endófitos en las tesis 5 y 6 es más que notable. En todas ellas se produce un claro aumento, pero sin duda es en estas dos mencionadas en las que el efecto es mucho más acusado. Este resultado plantea la necesidad de realizar ensayos futuros más exhaustivos, para confirmar estas bacterias y hongos como agentes inductores de la biosíntesis de vitamina C.

#### 4. CONCLUSIONES

- Tanto para el análisis del ácido L-ascórbico como para el licopeno, se ha desarrollado un método en el que la cromatografía líquida de alta resolución resulta ser una técnica eficaz para la determinación de una amplia variedad de compuestos, tras un tratamiento previo de extracción simple.
- En el caso del licopeno, la cantidad que se ha conseguido extraer ha sido inferior al contenido descrito en bibliografía. Sin embargo, para el estudio comparativo que se pretendía hacer en este trabajo, resulta válido. Se podría pensar en un efecto matriz como el causante de la baja cuantificación, sin embargo, los datos obtenidos para la tesis control mediante la espectrofotometría UV-vis, confirman que el problema ha estado en el proceso de extracción. Éste no ha sido todo lo eficiente que se esperaba y para una cuantificación más precisa, habría que optimizar el método aún más, empleando quizás disolventes más eficaces (probablemente una mezcla de acetona, hexano y etanol) y una purificación más exhaustiva.
- Se ha podido comprobar el fuerte efecto matriz correspondiente al preparado comercial de licopeno *Lyc-O-Mato*<sup>®</sup>, por lo que no es conveniente su utilización a modo de estándar.
- En el caso del contenido en licopeno de las distintas variedades analizadas, la variedad en la que se ha centrado este trabajo, *marmande*, es la de mayor contenido, seguida de la variedad *rama* y *pintón*, quedando como última la variedad *cherry*.
- En cuanto al efecto de los microorganismos endófitos en el contenido de licopeno, este trabajo ha concluido que ninguno de ellos lo aumenta. Muy al contrario, se observa una disminución con respecto al control (sin inocular), especialmente en el caso de la tesis T43. De hecho, el tiempo de maduración de los frutos fue mucho más lento que en el caso del control.
- El estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones, pone de manifiesto la validez de esta técnica para identificar el licopeno y sus isómeros. Si bien es cierto que para una asignación más precisa de todas las señales, quizás sería conveniente obtener un espectro heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C para terminar de caracterizar las muestras.
- En el caso del análisis del ácido L-ascórbico, se ha de señalar la importancia del tiempo en la preparación de las muestras. Se ha desarrollado un método de extracción rápido y eficaz, sin necesidad de emplear antioxidantes, que proporciona unos resultados más que aceptables para establecer un estudio comparativo.
- El contenido en ácido L-ascórbico aumenta considerablemente en todas las muestras inoculadas con respecto al control. En el caso de las tesis 5 y 6, donde este efecto es especialmente importante, el contenido en ácido L-ascórbico es el doble del valor promedio descrito en bibliografía. Es importante insistir en la necesidad de un análisis

más preciso, determinando también el contenido en ácido L-deshidroascórbico y verificando la reproducibilidad de los datos con nuevos ensayos en plantas para poder confirmar el efecto mencionado.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Rivera, S. M.; Canela-Garayoa, R., Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of chromatography. A* **2012**, *1224*, 1-10.
2. Pennathur, S.; Maitra, D.; Byun, J.; Sliskovic, I.; Abdulhamid, I.; Saed, G. M.; Diamond, M. P.; Abu-Soud, H. M., Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free radical biology & medicine* **2010**, *49* (2), 205-13.
3. Giovannucci, E.; Clinton, S. K., Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* **1998**, *218* (2), 129-39.
4. Clinton, S. K., Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition reviews* **1998**, *56* (2 Pt 1), 35-51.
5. Olives, B. A. I.; Camara, H. M.; Sanchez, M. M. C.; Fernandez, R. V.; Saenz, d. T. M. L., Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chem.* **2005**, *95* (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 328-336.
6. Mitrowska, K.; Vincent, U.; von Holst, C., Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isobestic wavelength approach. *Journal of chromatography. A* **2012**, *1233*, 44-53.
7. de Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z., HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55* (22), 9135-41.
8. (a) Vertzoni, M. V.; Reppas, C.; Archontaki, H. A., Optimized determination of lycopene in canine plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2005**, *819* (1), 149-54;  
(b) Xu, F.; Yuan, Q. P.; Dong, H. R., Determination of lycopene and beta-carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2006**, *838* (1), 44-9.
9. Dias, M. G.; Oliveira, L.; Camoes, M. F.; Nunes, B.; Versloot, P.; Hulshof, P. J., Critical assessment of three high performance liquid chromatography analytical methods for food carotenoid quantification. *Journal of chromatography. A* **2010**, *1217* (21), 3494-502.
10. Fang, L.; Pajkovic, N.; Wang, Y.; Gu, C.; van Breemen, R. B., Quantitative analysis of lycopene isomers in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (4), 812-7.

11. Kauppila, T. J.; Kostianen, R.; Bruins, A. P., Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2004**, *18* (7), 808-15.
12. Burns, J.; Fraser, P. D.; Bramley, P. M., Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* **2003**, *62* (6), 939-47.
13. van Breemen, R. B.; Dong, L.; Pajkovic, N. D., Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry of Carotenoids. *International journal of mass spectrometry* **2012**, *312*, 163-172.
14. Tiziani, S.; Schwartz, S. J.; Vodovotz, Y., Profiling of carotenoids in tomato juice by one- and two-dimensional NMR. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54* (16), 6094-100.
15. Rozzi, N. L.; Singh, R. K.; Vierling, R. A.; Watkins, B. A., Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50* (9), 2638-43.
16. Tiziani, S.; Schwartz, S. J.; Vodovotz, Y., Profiling of Carotenoids in Tomato Juice by One- and Two-Dimensional NMR. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 6094-6100.
17. Lin, C. H.; Chen, B. H., Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of chromatography. A* **2003**, *1012* (1), 103-9.
18. Rozzi, N. L.; Singh, R. K.; Vierling, R. A.; Watkins, B. A., Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 2638-2643.
19. Campos, F. M.; Ribeiro, S. M. R.; Della, L. C. M.; Pinheiro-Sant'Ana, H. M.; Stringheta, P. C., Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quim. Nova* **2009**, *32* (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 87-91.
20. Frenich, A. G.; Torres, M. E.; Vega, A. B.; Vidal, J. L.; Bolanos, P. P., Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53* (19), 7371-6.
21. Burini, G., Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by HPLC. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1154* (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 97-102.
22. Kauppila, T. J.; Kotiaho, T.; Kostianen, R.; Bruins, A. P., Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (2), 203-11.

23. Parella, T., *Pulse Program Catalogue. NMR Guide v4.0*. Bruker Biospin: 2004.
24. Miller, J., *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 2002; p 296.
25. López, G. Mancha solar en el fruto de tomate: análisis de carotenoides y estudio histológico. Tesis de Licenciatura, Universidad de Málaga, 2002.
26. Torres, A. M. R., L.F., Estudio de Medios de Cultivo para la síntesis de licopeno a partir de *Clavibacter michiganensis* sub. *michiganensis*. *VITAE, Revista de la facultad de química farmacéutica* **2003**, 10 (2), 37-45.
27. Pallauf, K.; Rivas-Gonzalo, J. C.; del, C. M. D.; Cano, M. P.; de, P.-T. S., Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, 21 (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 273-281.