

Implementación de la extracción y análisis de
 β -caroteno en zanahoria (*Daucus carota* L.)
por fluidos supercríticos (FSC) y UHPLC-DAD

IMPLEMENTACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE β -CAROTENO EN ZANAHORIA (DAUCUS CAROTA L.) POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FSC) Y UHPLC-DAD

Melissa Román Páez^a, Natalia Cadavid Muñoz^a, María Isabel Betancur Nieto^a,
Bladimir Martínez Varela^a, Juan Manuel Monsalve^a, Alex Jiménez Henao^b,
Catarina Pássaro Carvalho^a

^aSENA-Centro de la Innovación, Agroindustria y la Aviación (Grupo GIGACA), marp5518@gmail.com, natalia.cadavidqf@gmail.com, mbetancurn@sena.edu.co, martinezbladimir6@gmail.com, juanmonchomm@gmail.com, cpassaro@gmail.com

^bSENA-Centro de la Innovación, Agroindustria y la Aviación Aprendiz Tecnología en Control de Calidad de Alimentos, ojimenez343@sena.edu.co

RESUMEN

Se considera que la principal fuente de procesos oxidativos, tales como envejecimiento, alteraciones cardiovasculares y procesos cancerígenos son producto de gran cantidad de agentes perjudiciales, incluyendo la polución química, subproductos de combustión, estrés, dieta, entre otros. La zanahoria se ha consolidado como una excelente fuente de antioxidantes (carotenoides) para mitigar este tipo de enfermedades. El objetivo de este trabajo fue implementar un método analítico para la cuantificación por UHPLC-DAD de β -caroteno en la zanahoria, utilizando como método de extracción fluidos supercríticos (FSC). La condición óptima obtenida para la extracción fue de 80 °C y 450 bar, donde se logró cuantificar mayor cantidad de β -caroteno por UHPLC-DAD. Se obtuvo entre 8,5 y 19,5 mg de β -caroteno por cada 100 g de zanahoria, valores normales de acuerdo a los encontrados en la literatura (12 -66 mg). Con el aumento de la temperatura se visualizó un notable incremento en el rendimiento de β -carotenos de hasta 45,8%. La técnica implementada por UHPLC permitió una rápida detección del compuesto, minimizar costos en solvente y mayor velocidad de flujo. Paralelamente, la extracción por FSC permitió acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento

de extracción y mejorar la calidad del extracto, utilizando CO₂ lo que es completamente amigable con el ambiente. Adicionalmente, no hay que evaporarlo ni es contaminante para el usuario y el ambiente, no deja trazas en el extracto por lo que no hay restricciones para su uso en alimentos.

Palabras clave: carotenoides, extracción supercrítica, cromatografía líquida.

ABSTRACT

It is considered that the main source of oxidative processes, such as aging, cardiovascular alterations and carcinogenic processes are the product of many harmful agents, including chemical pollution, products of combustion, stress, diet, among others. The carrot has been established as an excellent source of antioxidants (carotenoids) to mitigate this type of diseases. The objective of this work was to implement an analytical method for the quantification by UHPLC-DAD of β -carotene in the carrot, using Supercritical Fluids (FSC) as a method of extraction. The optimum condition obtained for extraction was 80 ° C and 450 bar, where it was possible to quantify a greater amount of β -carotene by UHPLC -DAD. It was obtained between 8.5 and 19.5 mg of β -carotene per 100 g of carrot, normal values according to those found in the literature (12 -66 mg). We observed with increases up to 45.8% when increased the yield of β -carotene. The technique implemented by UHPLC allowed rapid detection of the compound, minimizing costs in solvent and higher flow rate. At the same time, FSC extraction made it possible to shorten extraction time, reduce solvent consumption, increase extraction efficiency and improve extract quality, using CO₂ which is completely friendly to the environment. Additionally, it does not have to evaporate nor is it contaminating to the user and the environment, leaves no traces in the extract so there are no restrictions for its use in food.

Keywords: carotenoids, supercritical extraction, liquid chromatography.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, se ha venido investigando la relación existente entre el consumo de vitaminas y/o carotenoides y la génesis del cáncer. Uno de los mayores intereses en relación a los carotenoides, está relacionado

con su acción antioxidante que reduce el estrés oxidativo del organismo, previniendo determinados tipos de cáncer, alteraciones cardiovasculares e inmunológicas (Gomes, 2007; Leung, 2008).

Los carotenoides son pigmentos presentes tanto en el reino animal como en el vegetal con funciones muy importantes. Son compuestos liposolubles responsables del color rojo, amarillo, naranjado y púrpura de las frutas. Químicamente se dividen en Carotenos (ej. Licopeno y β caroteno), los cuales contienen grupos de carbono y de hidrógeno y Xantofilas (ej. luteína, zeaxantina, y β -criptoxantina) considerados derivados oxigenados. El β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina, son considerados precursores de la vitamina A (O'Connell et al., 2007).

Se cree que una de las principales razones para el escaso aprovechamiento de la biodiversidad es la falta de métodos de extracción efectivos para obtener sustancias con la calidad requerida para servir como materia prima en productos destinados al consumo humano, pues son cada vez más crecientes las exigencias de calidad e inocuidad para este tipo de materias primas. La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales utilizando solventes es una operación clásica aplicada en muchos procesos industriales, especialmente en la industria farmacéutica y cosmética. Sin embargo, el interés cada vez más creciente por sustancias bioactivas de origen natural impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento de sustancias bioactivas, en un corto periodo de tiempo y con bajo costo.

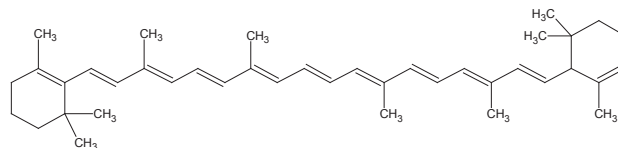
En este contexto, el objetivo de este trabajo se enfocó en la detección y cuantificación de β -caroteno en muestras de zanahoria (*Daucus carota* L.) utilizando UHPL-DAD e implementando como técnica de extracción fluidos supercríticos (FSC), bajo condiciones variables de temperatura en muestras de zanahoria cultivadas en Antioquia

2. REFERENTE TEÓRICO

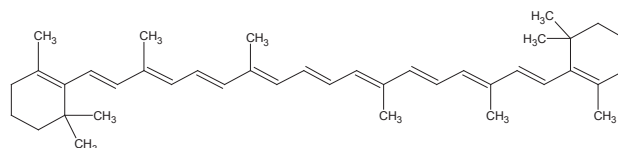
Carotenoides

Actualmente se sabe cómo los carotenoides actúan en las plantas para promover la fotosíntesis, la fotoprotección y la prevención del daño oxidativo, pero hay poca información de los carotenoides dietarios sobre su localización, distribución y acción en las células y membranas humanas y animales (Kupisz, Sujak, Patyra, Trebacz, & Gruszecki, 2008) (Socaciua et al., 2002).

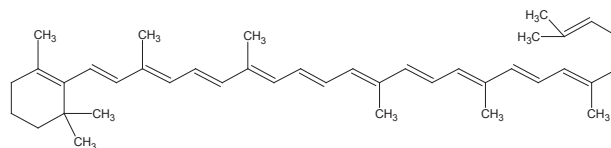
Los carotenoides son pigmentos liposolubles responsables del color rojo, amarillo, naranja y púrpura de frutas y vegetales. Desde el punto de vista químico se pueden dividir en dos grupos, carotenos y xantofilas. Los carotenos se caracterizan por estar compuestos de carbono e hidrógeno, mientras que los segundos tienen en su estructura oxígeno como grupos, hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o ácidos carboxílicos (Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006). En la figura 1 se pueden apreciar las estructuras de algunos carotenoides.



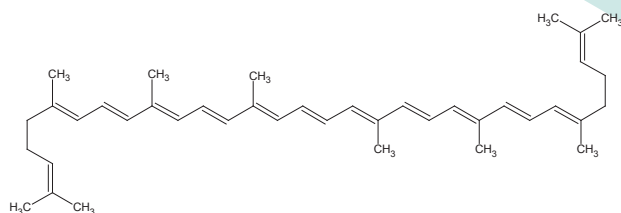
α -caroteno



β caroteno



γ caroteno



Licopeno

Elaborado en con el programa ACD Labs. 6,0.

Figura 1. Estructura de algunos carotenos: a. α -caroteno, b. β caroteno, c. caroteno, d. Licopeno.

Fuente: Elaboración propia, utilizando el programa ACD Labs. 6,0.

Los carotenoides predominantes encontrados en el plasma son el α y el β -caroteno, licopeno, luteína, β -criptoxantina y zeaxantina. Algunos de estos carotenos son empleados ampliamente en experimentos in vitro para demostrar su acción, normalmente asociados con su capacidad antioxidante, la cual es usualmente considerada para explicar sus efectos benéficos en la salud humana (Socaciua et al., 2002)

En el cuerpo humano algunos carotenoides como β -caroteno, licopeno y luteína se localizan en la piel y son considerados de vital importancia en la reducción del envejecimiento de la piel y el riesgo de desarrollar cáncer (Meinke, Darvin, Vollert, & Lademann, 2010). Se ha establecido que la luteína está presente en ojo humano, especialmente en la capa del axón receptor, en los segmentos de los bastones externos y epitelio pigmentario de la retina, donde actúa como un filtro de luz azul para proteger las estructuras subyacentes del daño fototóxico y como antioxidante. Es por eso que una deficiencia en la ingesta de luteína está relacionado con la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y las cataratas.

En cuanto a los colorantes se ha observado un cambio en la preferencia de estos por parte del consumidor al preferir los naturales sobre los de origen químico. A principios del siglo XX, fueron sintetizados un gran número de colorantes para ser adicionados en los alimentos; sin ninguna precaución, por lo que a mediados de este siglo se comenzó a regular su uso, debido a que muchos de ellos contenían plomo, cobre y arsénico que representan

riesgos muy significativos para la salud del consumidor (De Saint Blanquat, 2000).

Sin embargo, a finales del siglo XX, el mercado ha sufrido un cambio que muestra una fuerte tendencia hacia el consumo de productos de origen natural. Entre las razones que justifican esta preferencia están, principalmente, el cambio en el perfil del consumidor el cual desde finales de la década de los 80 prefiere el uso de productos naturales por considerarlos como símbolo de inocuidad y como productos que aumentan la expectativa de vida o mejoran su calidad, cubriendo de esta manera los sectores salud, alimentación e higiene.

FSC

Actualmente, se han desarrollado diversas técnicas de extracción de compuestos bioactivos siguiendo la tendencia de extracción limpia, entre ellas las más destacas son la extracción con fluidos supercríticos (EFS), la extracción acelerada con microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer selectivamente compuestos químicos bajo la combinación de temperatura y presión de un solvente, típicamente dióxido de carbono (CO₂) (Herrero, Cifuentes & Ibañez, 2006). Algunas aplicaciones comerciales de la extracción con los FSC en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria están relacionadas con la obtención de ingredientes bioactivos como insumos para el desarrollo de productos que contribuyan a mejorar el estado de salud o prevenir riesgos de enfermedades.

HPLC

De otra mano, técnicas analíticas como la cromatografía líquida es ampliamente utilizada para la separación, detección y cuantificación de compuestos con baja volatilidad y/o inestabilidad térmica (Queiroz et al, 2012), caracterizándose por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Además, las fases estacionarias empleadas C18 no resuelven bien todos los picos y en la mayor parte de los estudios realizados en los últimos años se han utilizado columnas de C30 (García et al, 2012). La cromatografía acoplada con la columna C30 resolvió eficientemente quince carotenoides y sus isómeros en un tiempo de ejecución inferior a 20 min. La aplicación de este método a diversas matrices como frutos y hojas de tomate, hojas de Arabidopsis y frutos de pimiento verde mostró

la versatilidad y robustez del método. El método sería útil para el análisis de alto rendimiento de gran número de muestras alimentarias (Gupta et al, 2015)

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología del Tecnoparque SENA Nodo Rionegro en Antioquia, y los análisis se realizaron con el apoyo de los aprendices asociados al programa de Tecnología en Control de Calidad de Alimentos.

3.1 Reactivos y materiales

Se usó un estándar de β -caroteno marca Sigma-Aldrich Type I, $\geq 93\%$ (UV) (St, Louis, MO, USA), metanol grado HPLC (marca Merck), acetona grado HPLC (marca Merck), cloroformo grado HPLC (marca Merck) y agua tipo I o grado HPLC. La solución madre de β -caroteno de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se preparó disolviendo 10 mg en 100 ml de cloroformo con aproximadamente 0,002 g de ácido gálico p.a (marca Merck) y se guardó la solución en congelación (-20°C). Se inyectó una muestra de la solución madre en el UHPLC para identificar por medio del detector DAD aquella longitud de onda en la cual la absorbancia es máxima, valor en el cual se realizarán los análisis posteriores. En cuanto al β -caroteno, su espectro de absorción tuvo un valor de máxima absorbancia a 453 nm

3.2 Preparación y secado del material vegetal

La zanahoria fresca (*Daucus carota* L.) fue adquirida comercialmente en la ciudad de Rionegro (Antioquia) bajo condiciones ambientales normales (aproximadamente 20°C). Los equipos, utensilios, materiales y superficies fueron lavados con Degratex 21 (marca Tecnas) de 50 a 100 ml por litro de agua empleada. Después de verificar que la superficie estuviera completamente limpia, se procedió a aplicar el desinfectante Pentaquat (marca Tecnas) a 400 ppm con un tiempo mínimo de contacto de 20 minutos y se retiró con enjuague.

El material vegetal fue limpiado, lavado y desinfectado por inmersión con Citrosan utilizando 2,5 a 3,0 ml por litro de agua empleada. Aproximadamente 1,5 kilos de zanahoria fresca fueron desintegrados con un rayador de verduras casero y se extendió en una en una bandeja. Luego se deshidrató en un horno de convección forzada (marca Memmert modelo PMP200) a una temperatura de 40°C y un tiempo de secado de 40 horas (figura 2).



Figura 2. Material vegetal seco de zanahoria. Elaboración propia.

Seguidamente, se procedió a medir el porcentaje de sólidos secos (SS) en una balanza de humedad marca Toledo modelo HB47. Se disminuyó el tamaño de partícula del material vegetal seco con un molino de cizalla (marca IKA modelo MF10BS1) a 4000 rpm para obtener un polvo fino.

3.3 Extracción a través de Fluidos Supercríticos (FSC)

En los recipientes del equipo de Extracción por Fluidos Súper Críticos (Marca Applied Separations modelo Spe-SFE versión 4.1) se pesaron entre 40 a 41 g de material vegetal seco y molido. Durante el proceso de extracción por FSC del β -caroteno, a presión controlada de 450 bar, flujo de CO₂ a 5 g/minutos y tiempo de proceso de una hora para cada ensayo. La temperatura se varió en tres niveles: 40, 60 y 80°C para evaluar el efecto de esta variable sobre el β -caroteno extraído en las muestras de zanahoria. Se seleccionó un proceso isobárico y variar la temperatura debido a que se han obtenido mayores rendimientos en altas presiones de trabajo de acuerdo a lo sugerido por de M.M. R. de Melo, 2014.



Figura 3. Extracto con carotenoides extraídos por FSC de muestras de zanahoria.

Fuente: Elaboración propia.

Los extractos obtenidos (figura 3) fueron preservados en viales de vidrio envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz. Seguidamente fueron almacenados en un ultracongelador (marca KALTIS modelo 390) a -80°C hasta su preparación y procesamiento por UHPLC.

3.4 Análisis del β -caroteno por UHPLC

Preparación de la curva de calibración

El rango de linealidad seleccionado para la curva de calibración fue de 2 a 10 $\mu\text{g/ml}$ según lo reportado por Perez et al. (2010). Se prepararon 5 niveles con sus réplicas, con las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/ml}$ diluidos en acetona.

Método de detección y cuantificación

Los análisis fueron realizados por triplicado en un UHPLC UltiMate™ 3000 y los resultados procesados con el software Chromeleon 7.2. (Dionex, Thermo Scientific, United States), equipado con una bomba cuaternaria, un sistema degasificador, un automuestreador y un detector DAD (Detector de Arreglo de Diodos de longitud de onda variable). Las muestras fueron reconstituidas con acetona grado HPLC. Se utilizó una columna Acclaim™ C30 (5 μm , 150 x 4.6 mm) (Dionex Bonded Silica Products, lote No: 01425144 Thermo Scientific, USA), un volumen de inyección de 10 μL y una velocidad e flujo de 1 mL/min a 20 °C. La fase móvil usada fue metanol (A) y acetona (B). La elución fue en gradiente. Durante el primer minuto la fase móvil A se mantuvo al 100% y luego se hizo incrementar la fase móvil B hasta el 100% durante 5 minutos. Finalmente, se regresa al 100% de fase móvil A por 5 minutos, para obtener un tiempo total de gradiente de 12 minutos. El β -caroteno fue detectado a una longitud de onda UV de 453 nm (Znidarčič, Ban, & Sircelj, 2011) e identificado comparando el tiempo de retención y los espectros con los estándares (Álvarez et al., 2015).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa Statgraphics Centurion XVI.II Version 16.2.04 y a través de un análisis de varianza ANOVA se hizo el análisis estadísticos de los datos obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La humedad en el material seco y desintegrado fue de 8.4% (b.h). En la figura 4, se observan las muestras agotadas de material seco, luego de la extracción del β -caroteno a diferentes temperaturas de proceso en FSC.



Figura 4. Muestras agotadas luego del proceso de extracción en FSC.
Elaboración propia

En la figura 5, se muestran los extractos que fueron disueltos en 10 ml de acetona para luego ser procesado mediante la técnica de UHPLC.

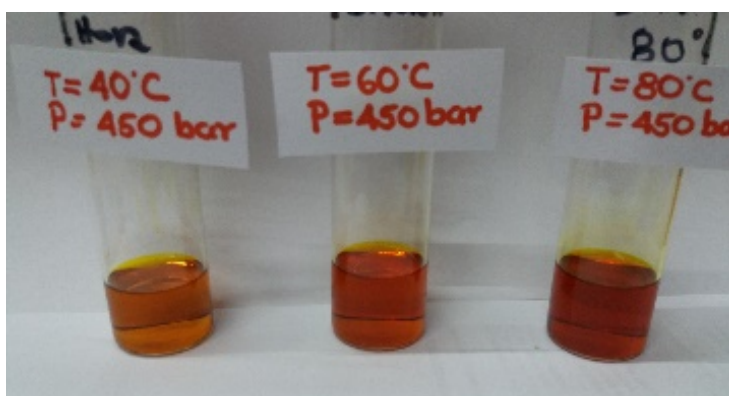


Figura 5. Extractos diluidos en acetona. Elaboración propia.

En la tabla 1, se muestra la cantidad de extracto obtenido luego del proceso de extracción de β -caroteno mediante la técnica de FSC a partir de aproximadamente 40 g de muestra seca.

Tabla 1. Cantidad de extracto de carotenos obtenido por FSC a diferentes temperaturas.

TEMPERATURA (°C)	40	60	80
Peso extracto obtenido en 1 hora de extracción (g)	0,29	0,21	0,27
Rendimiento β -caroteno en la muestra en 1 hora de extracción (%)	21,1	40,2	45,8

Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se presenta en la figura 6 la curva de calibración para el rango de linealidad seleccionado:

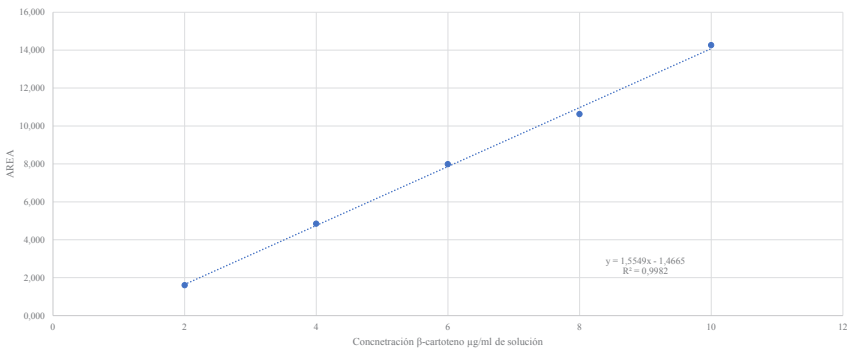


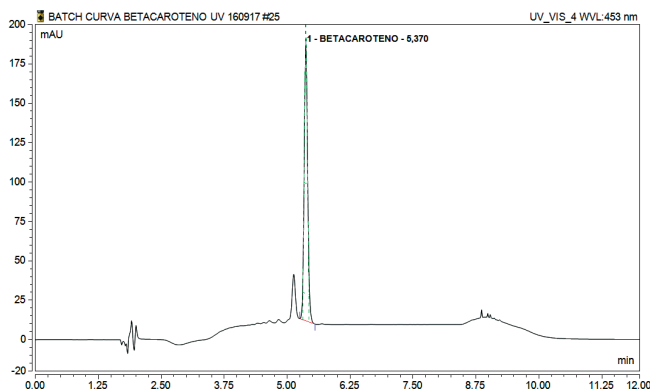
Figura 6. Curva de calibración de β -caroteno en zanahoria ($\mu\text{g/ml}$ de solución).
Elaboración propia.

La ecuación de la recta de calibración obtenida es:

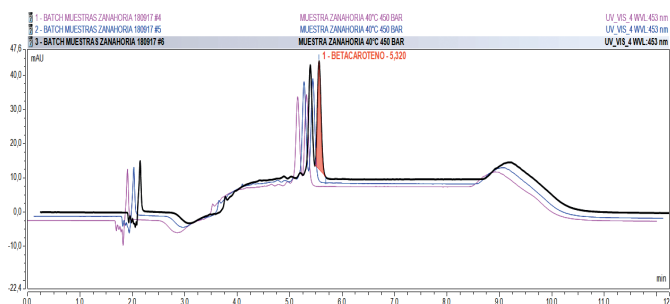
$$y = 1,5549X - 1,4665$$

Ecuación 1. Ecuación de la curva de calibración en el rango de linealidad.

Donde Y representa el área bajo la curva y X el valor de la concentración del β -caroteno presente en la muestra. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,9982.



a.



b.

Figura 7. a. Cromatogramas de la solución madre de β -caroteno.
b. Cromatogramas en extractos de zanahoria. Elaboración propia

En las figuras 7a y 7b se muestran los cromatogramas obtenidos para la solución madre de β -caroteno, concentración 100 μ g/mL a una longitud de onda de 453 nm y tiempo de retención de 5,370 minutos, que al compararlo con los cromatogramas correspondientes a los extractos obtenidos por fluidos supercríticos, se observa el mismo tiempo de retención en todas las muestras, corroborando de esta forma la presencia de este carotenoide en la zanahoria

En la tabla 2 se exponen los resultados obtenidos por UHPLC de β -carotenos presentes en las muestras de zanahoria.

Tabla 2. Concentraciones obtenidas por UHPLC de β -caroteno en muestras de zanahoria extraídas por FSC en diferentes concentraciones de temperatura.

TEMPERATURA	$\mu\text{g } \beta\text{-Carotenos en 100 g de muestra}$
40°C	8456 $\pm$ 620
60°C	16064 $\pm$ 314
80°C	18573 $\pm$ 1899

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a la tabla 2, a través de la técnica de UHPLC y el método empleado, se pudo establecer que a mayor temperatura durante el proceso de extracción en FSC, es mayor la cantidad de β -caroteno presente en el material de zanahoria seco y molido. Lo anterior, también se pudo corroborar por la coloración de cada uno de los extractos reconstituidos en acetona de acuerdo a la figura 5 y a la decoloración gradual en el material agotado de las muestras de zanahoria luego de su proceso de extracción en el equipo de FSC según se aprecia en la figura 4. Sin embargo, no se puede establecer un rendimiento óptimo de extracto por peso de muestra debido al poco tiempo empleado durante la extracción (1 hora) por FSC.

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA realizado a los datos obtenidos por UHPCL, el valor P (0,0001) del test F (65,17) fue inferior a 0,05 permitiendo concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de concentración ($\mu\text{g de } \beta\text{-caroteno en 100 g de muestra}$) de un nivel de temperatura a otro con un nivel de confianza del 95,0%.

De acuerdo a la prueba de rangos múltiples se evidenció diferencias significativas entre los tres niveles de temperatura con un nivel de confianza del 95,0% y dentro del cada nivel no se apreciaron diferencias significativas.

Por lo tanto, la condición óptima para la extracción de β -caroteno por FSC, manteniendo las demás variables constantes aumenta significativamente con el incremento de la temperatura, obteniéndose hasta 18,6 mg de β -caroteno por cada 100 g de muestra de zanahoria a una temperatura de 80°C. Dicho valor es mayor a lo reportado por Bonifaz, 2004 donde se obtuvo entre 3 a 13,9 mg de β -caroteno en muestras de zanahoria. Lo anterior debido a la implementación de un proceso de extracción por solventes diferente a FSC. Otros autores como Ventrera, 2012 reportan cantidades entre 12 y 20 mg de mg de β -caroteno en 100 g de muestra.

5. CONCLUSIONES

Los valores encontrados de beta-caroteno en 100g de m.s. de zanahoria por el método de UHPLC-DAD evaluado en este estudio, están por encima de los valores normales reportados en la literatura (entre 8,4 y 18,5 mg).

El proceso de extracción por FSC fue eficaz para la determinación de β -caroteno en zanahoria frente a otros procesos químicos convencionales reportados para la extracción de biocompuestos.

La utilización de condiciones supercríticas es una alternativa de proceso viable, porque volatiliza sustancias no volátiles y termolábiles a temperaturas moderadas como los carotenoides, reduce el requerimiento energético en comparación con la destilación; permite usar disolventes en estado supercrítico sin ser tóxicos para la industria farmacéutica y alimentaria como el CO₂ sin contaminar el producto y el impacto ambiental es nulo.

El sistema UHPLC-DAD proporcionó una satisfactoria detectabilidad y precisión. El método presentó linealidad en el rango seleccionado de 2 a 10 μ g de β -caroteno/ml de solución con un coeficiente de correlación R² del 0,9989. Se plantea la posibilidad de realizar una adecuada validación del método para evaluar los demás parámetros como selectividad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión y exactitud. Sin embargo, es necesario realizar estudios de cinéticas de extracción con tiempos de extracción más amplios (mayores de 1 hora) y/o controlando la temperatura. El parámetro de presión no se evaluó ya que diferentes autores pudieron demostrar que a mayores presiones se obtienen un mejor rendimiento de la extracción de β -caroteno.

Es necesario ampliar el número de carotenoides para futuros análisis en UHPLC-DAD y su extracción en FSC, ya que, la zanahoria posee otros tipos de carotenoides como por ejemplo luteína y α -carotenos

4. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M. V., Hincapié, S., Saavedra, N., Alzate, L. M., Muñoz, A. M., Londoño-Londoño, J., & Jiménez Cartagena, C. (2015). Exploring feasible sources for lutein production: food by-products and supercritical fluid extraction, a reasonable combination. *Phytochemistry Reviews*, 1(2), 10–15.
- Bonifaz Peña, V. E. 2004. Selección de una metodología analítica para la determinación de provitamina A (beta-caroteno) en muestras de jugo de zanahoria (*daucus carota*). Tesis Licenciatura. Biología con área en Biotecnología. Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. Junio. 2004.
- Fikselová M., Šilhár S., Mareček J., Frančáková H. (2008): Extraction of carrot (*Daucus carota* L.) carotenes under different conditions. *Czech J. Food Sci.*, 26: 268–274.
- García S; Pérez R. M. (2012). Aspectos Analíticos sobre la Determinación de Compuestos Carotenoides en Microalgas mediante Cromatografía de Líquidos con Detector de Diodos. Ministerio de Econocmpia y Competitividad. Tomado de: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/43/028/43028577.pdf
- Gomez, F.S. Carotenoides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição*, v.20, p.537-548, 2007.
- Gupta, P., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 11, 5. <http://doi.org/10.1186/s13007-015-0051-0>
- Kupisz, K., Sujak, A., Patyra, M., Trebacz, K., & Gruszecki, W. I. (2008). Can membrane-bound carotenoid pigment zeaxanthin carry out a transmembrane proton transfer? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 2334–2340.
- Lancrajan, I., B, H. A. D., Socaciu, C., Engelke, M., & Zorn-Kruppa, M. (2001). Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and B-cyclodextrins. *Chemistry and Physics of Lipids*, 112, 1–10.

Leung, I.; Phill, M. Macular pigment: new clinical methods of detection and the role of carotenoids in age-related macular degeneration. *Optometry*, v.79, p.266-272, 2008.

Moeller, S. M., Jacques, P. F., & Blumberg, J. B. (2000). The Potential Role of Dietary Xanthophylls in Cataract and Age-Related Macular Degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 522S-527S.

O'Connell, O. F., Ryan, L., & O'Brien, N. M. (2007). Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27(5), 258-264. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2007.04.002>

Socaciua, C., Bojarskib, P., Aberlec, L., & Diehld, H. A. (2002). Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. *Biophysical Chemistry*, 99, 1-15.

Pinhero-Santana, Helena Maria, Stringheta, Paulo César, Brandao, Sebastião César Cardoso, Páez, Héctor Hernando, & Queiroz, Valéria Maria Vitarelli de. (1998). Evaluation of total carotenoids, alpha- and beta-carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. *Food Science and Technology*, 18(1), 39-4. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000100009>

Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Rosa, M. A. Validación de método multiresiduo para la determinación de pesticidas en alimentos empleando QuEChERS y UHPLC-MS/MS. *Química Nova*, v. 35, p. 185-192, 2012

Ventrera, Nancy Beatriz, Vignoni, Lucía, Alessandro, María Soledad, Césari, Matilde, Césari, Ricardo, Guinle, Viviana, Giménez, Adriana, & Tapia, Olga. (2013). Caracterización por contenido de β -carotenos de ocho cultivares de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su relación con el color. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 45(2), 00. Recuperado en 10 de octubre de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652013000200016&lng=es&tlng=es.