



“Efecto del incremento del área superficial sobre el contenido de compuestos bioactivos en muestras de zanahoria durante su almacenamiento”



Juan García Romero



FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

“Efecto del incremento del área superficial sobre el contenido de compuestos bioactivos en muestras de zanahoria durante su almacenamiento”

TFG de carácter experimental

Autor: Juan García Romero

Sevilla, a 22 de Noviembre de 2018

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal

Área de Nutrición y Bromatología

Tutora: Carla María Stinco Scanarotti

RESUMEN

La zanahoria, *Daucus carota*, almacena diversos compuestos bioactivos, como carotenoides y compuestos fenólicos. Estos compuestos suscitan gran interés por sus propiedades antioxidantes y protectoras frente a especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, además gran parte de los carotenoides presentan actividad provitamina A (necesaria para la visión nocturna, buen estado de la piel y tejidos superficiales). Es por esta razón por la que cada vez son más los estudios que demuestran su papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas tales como el cáncer, el envejecimiento o las cataratas.

La producción de daño tisular en la zanahoria produce la activación de sistemas productores de compuestos fenólicos, pues estos actúan como fitoalexinas protegiendo a la planta de posibles infecciones bacteriana o fúngicas. Como se demuestra en el estudio realizado, al aumentar el área superficial de la zanahoria realizando diferentes cortes para ello, se produce un aumento del nivel fenólico durante el almacenamiento, además, este aumento es mayor cuanto mayor es el daño infligido al vegetal. En cambio, los carotenoides no aumentan, todo lo contrario, se produce una disminución de su contenido debido a la pérdida de la integridad celular que produce la oxidación de estos compuestos, siendo mayor esta degradación en las muestras con un área superficial mayor.

El color es uno de los atributos sensoriales más importantes de los alimentos, relacionado con la aceptación y percepción de calidad por parte de los consumidores. En el caso de la zanahoria el color viene determinado por su contenido en carotenoides, pues son pigmentos vegetales, por lo tanto como era de esperar, se produce una variación en el color durante el almacenamiento que acompaña a la degradación de los carotenoides.

Palabras clave: carotenoides, compuestos fenólicos, área superficial, color, zanahoria.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.-Compuestos fenólicos	5
1.2.-Carotenoides.....	9
1.3.-El color: significado y medida	12
2.-OBJETIVOS.....	14
3.-METODOLOGÍA	15
3.1.-Muestras.....	15
3.2.- Métodos empleados.....	16
3.2.1.-Determinación del área superficial.....	16
3.2.2.-Evaluación del color	16
3.2.3-Determinación del contenido en compuestos fenólicos	17
3.2.4-Determinación del contenido en carotenoides	22
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.-Pérdida de peso	26
4.2.-Contenido en compuestos fenólicos	26
4.3.- Contenido en carotenoides	30
4.4-Color.....	32
5.-CONCLUSIONES.....	35
6.-BIBLIOGRAFÍA	37

1.- INTRODUCCIÓN

La zanahoria es una planta perteneciente a la familia de las *Umbelliferae*, especie *Daucus carota*. La zanahoria es la raíz pivotante engrosada de la planta que almacena los nutrientes necesarios para el crecimiento de la parte aérea de la planta. La raíz contiene gran cantidad de hidratos de carbono y fibra, tanto soluble como insoluble, aportando una pequeña cantidad de calorías, pero su interés como alimento reside en la presencia de gran cantidad de fitoquímicos como carotenoides y compuestos fenólicos.

1.1.-Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos químicos con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, pero todos ellos tienen en común la presencia en su molécula de un anillo fenólico.

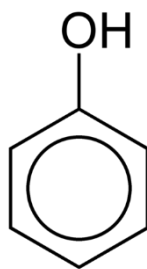


Figura 1. Anillo fenólico. (Tomada de <https://www.lifeder.com/hidroxilo/>)

Los compuestos fenólicos o polifenoles son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados *de novo* por las plantas y actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (Gimeno ,2004).

Debido a su diversidad estructural los polifenoles se pueden clasificar de diferentes maneras, pero existen dos grandes grupos según su estructura química:

- Flavonoides: Es el grupo más abundante en la naturaleza. Su esqueleto químico está basado en compuestos de 15 carbonos (C6-C3-C6), en concreto, son dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. La

mayoría aparecen en la naturaleza como O-glucósidos, normalmente en las posiciones C3 o C5 del anillo A del esqueleto flavonoide. Todos los flavonoides están hidroxilados en sus anillos aromáticos, y por lo tanto son estructuras polifenólicas. Dentro de este grupo encontramos diversos subgrupos que podemos clasificar en función del estado de oxidación del anillo de heterociclo y la posición del anillo B. Cada subgrupo presenta una gran variedad de compuestos que a su vez se diferencian por el número y posición de los grupos hidroxilos, así como por los grupos funcionales que presentan. Los principales subgrupos son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Quiñones *et al.*, 2012).

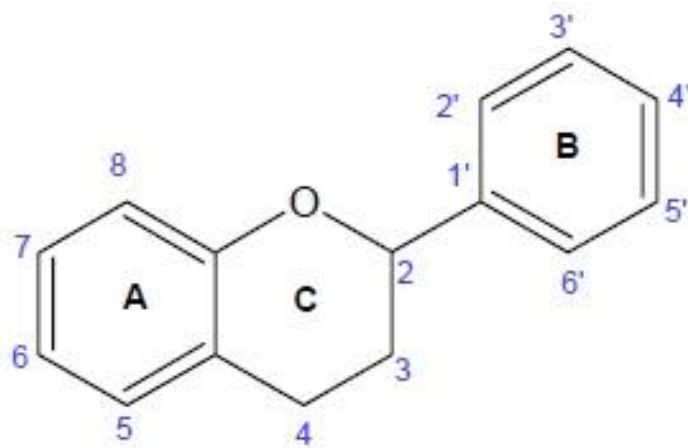
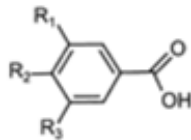


Figura 2. Estructura básica de flavonoides. (Tomada de <https://www.infoescola.com/bioquimica/flavonoides/>)

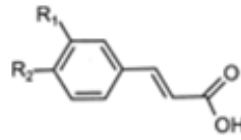
- No flavonoides: Existen varios subgrupos, entre ellos los ácidos hidroxibenzoicos, que se componen de un anillo fenólico y un ácido carboxílico asociado, con estructura C6-C1, los más destacables son el ácido gálico, vinílico y p-hidroxibenzoico. Otro subgrupo son los ácidos hidroxicinámicos con un esqueleto C6-C3, que se encuentran principalmente como ácido cumárico, cafeico y ferúlico, conjugados con ácido tartárico o quínico formando unos conjugados denominados ácidos clorogénicos y en raras ocasiones en estado libre. Por otro lado están los taninos hidrolizables, como los galotaninos y los elagitaninos, caracterizados por un grupo poliol en la parte central, donde las funciones hidroxilo están esterificadas con el ácido gálico. Los estilbenos, otro subgrupo, donde se engloba al resveratrol, principal representante de este

grupo y al que se le atribuyen propiedades preventivas del cáncer y enfermedades degenerativas. Por último existe un subgrupo de compuestos diversos en el que se engloban los lignanos y las cumarinas (Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

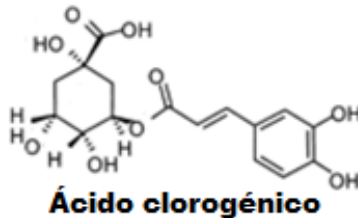
Ácidos hidroxibenzoicos Ácidos hidroxicinámicos



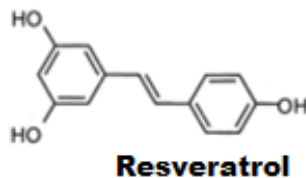
R1=R2=OH, R3=H: Ácido protocatequico
R1=R2=R3=OH: Ácido gálico



R1=OH: Ácido cumarínico
R1=R2=OH: Ácido cafeico
R1=OCH3, R2=OH: Ácido ferúlico



Estilbenos



Lignanos

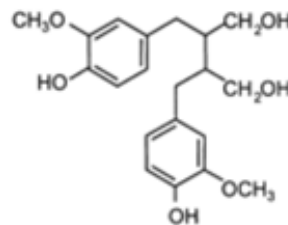


Figura 3. Fenoles no flavonoides (Tomada de Manach *et al.*, 2004)

Muchos compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal, y por tanto tienen importancia en la calidad de los mismos. Por ejemplo, las antocianidinas que proporcionan coloración roja, azul y violeta a muchas frutas (fresas, ciruelas, uvas, etc.), hortalizas y al vino tinto, o los flavonoles que dan una tonalidad crema-amarillenta, presentes principalmente en las partes externas de frutas y hortalizas. Hay polifenoles con sabor amargo, como las flavononas de los cítricos o la oleuropeína presente en las aceitunas. Los taninos condensados e hidrolizables confieren astringencia a los frutos, y algunos

fenoles sencillos como el eugenol, proporcionan aroma a determinadas frutas. Los derivados de ácidos hidroxicinámicos, están presentes en un buen número de frutas, hortalizas y alimentos derivados, siendo en algunos casos los fenoles mayoritarios, pero no tienen impacto directo sobre las características organolépticas de los alimentos que los contienen. Aunque pueden afectar indirectamente a dichas características de modo negativo, si son oxidados por las enzimas oxidativas que se encuentran en los tejidos vegetales y dan lugar a la formación de polímeros pardos que imparten al producto un aspecto no siempre deseable (Tomás-Barberán, 2003).

La importancia nutricional de los polifenoles se debe a sus propiedades antioxidantes y protectoras frente a especies reactivas de oxígeno. Los grupos fenólicos pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, interrumpiendo así la reacción de oxidación en cadena de componentes celulares. Los estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre el riesgo de enfermedades humanas crónicas y el consumo de una dieta rica en polifenoles vegetales.

Los polifenoles de las plantas pueden ejercer actividades contra el cáncer a través de una variedad de mecanismos, que incluyen la eliminación de agentes cancerígenos, la modulación de la señalización celular, la detención del ciclo celular, la promoción de la apoptosis y la modulación de las actividades enzimáticas. Existe buena evidencia de que los polifenoles presentes en el té, el vino tinto, el cacao y el aceite de oliva influyen en el desarrollo y la progresión del tumor. La tasa de daño oxidativo aumenta durante el envejecimiento debido al deterioro de los mecanismos antioxidantes y de reparación. La capacidad antioxidante del plasma está relacionada con la ingesta dietética de antioxidantes, encontrando así una correlación positiva entre una dieta rica en polifenoles y la reducción de los efectos nocivos del envejecimiento (Cobb, 2017).

En cuanto a la salud cardiovascular, los fenoles pueden inducir relajación endotelio-dependiente, teniendo efectos vasodilatadores. También hay estudios que avalan su capacidad para mejorar el perfil lipídico, lo cual le confiere efectos antiaterogénicos, que puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de enfermedades cardiovasculares (Quiñones *et al.*, 2012).

Surjadinata y Cisneros-Zevallos (2012), estudiaron la biosíntesis de antioxidantes fenólicos en tres cultivares de zanahorias (Navajo, Legend y Choctaw) cuando se sometía a stress producido por el cortado en secciones de distinto tamaño. En este trabajo, se observó que a mayor relación área/peso (A/W), mayor era la presencia de fenólicos solubles, principalmente el ácido clorogénico y sus correspondientes isómeros. Además este incremento conllevaba a una mayor capacidad antioxidante (AOX) y actividad enzimática (PAL) para todos los cultivares. Por esto concluyeron que simplemente aumentando la intensidad del estrés de la herida era posible mejorar la biosíntesis de fenólicos antioxidantes.

1.2.-Carotenoides

Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, pues actúan como pigmentos esenciales en la fotosíntesis (transfieren la energía que captan a las clorofilas) y fotoprotección de los organismos fotosintéticos, e imparten color a las estructuras que los contienen, por lo que son responsables del color de muchas flores y frutas amarillas, naranjas y rojas que atraen a los polinizadores y dispersadores de semillas en las plantas superiores (Cazzonelli, 2011). Esta es la razón por la que en los vegetales se encuentra en mayor concentración y variedad, aunque también están presentes en bacterias, algas, hongos, además de en animales, aunque estos no pueden sintetizarlos. Dentro de los vegetales la composición y cantidad de carotenoides tiene diferentes patrones, siendo los mayoritariamente presentes en verduras: luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina; y en frutos suelen ser mayoritarias las xantofilas. En alimentos de origen animal podemos encontrar carotenoides en la yema de huevo (luteína y zeaxantina, y trazas de β -caroteno), en el salmón (astaxantina), o en los crustáceos, formando caroproteínas que confieren colores azulados, que cuando se desnaturalizan durante el cocinado proporcionan el color rojizo propio de los carotenoides (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). En el caso de la zanahoria, vegetal que protagoniza este estudio, destaca el contenido de β -caroteno y α -caroteno, aunque también podemos encontrar luteína y trazas de criptoxantina.

Los carotenoides son compuestos lipídicos, y por lo tanto insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, aunque la unión a proteínas o glicosilación les permiten estar en medios acuosos. Con respecto a su estructura química la característica más

importante es su sistema de dobles enlaces conjugados, debido a su estructura de tetraterpenoides (la gran mayoría), uniéndose ocho unidades de isoprenoides en disposición “cabeza-cola”, excepto las centrales que se enlazan del modo “cabeza-cabeza”. La mayoría de ellos contienen anillos en sus extremos, aunque algunos son acíclicos. En función de los elementos químicos presentes en sus moléculas podemos clasificar a los carotenoides en: carotenos, que son hidrocarburos (formados sólo por C e H) y xantofilas, que contienen además de C e H, oxígeno (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007) (Figuras 4 y 5).

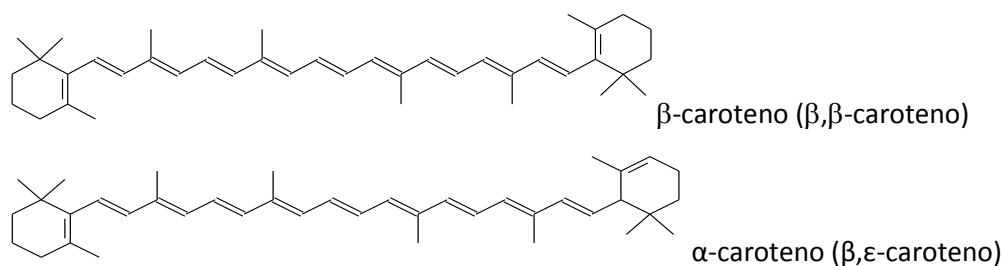


Figura 4. Estructuras químicas de carotenos.

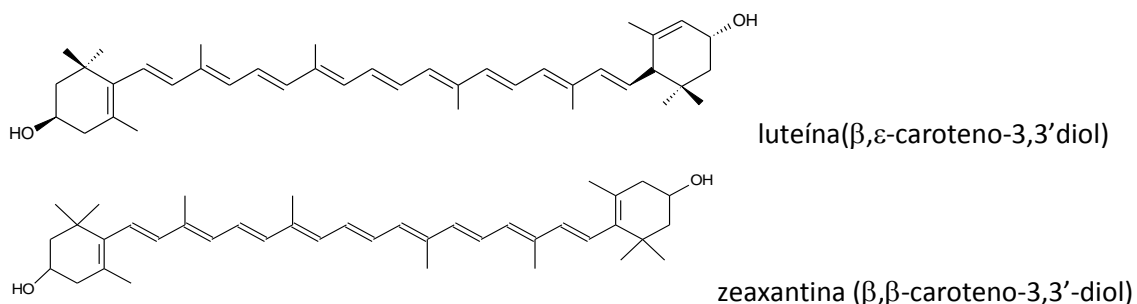


Figura 5. Estructuras químicas de diversas xantófilas.

La importancia nutricional de los carotenoides reside en su actividad provitamina A, aunque no todos ellos tienen dicha actividad, pues depende de la presencia de un anillo β-ionona, necesario para que los animales puedan transformar los carotenoides en retinol (vitamina A). Por esta razón el β-caroteno es el carotenoide más importante al presentar dos de estos anillos. Diferentes modificaciones en este anillo hacen que la actividad provitamina A se disminuya, como ocurre con α- y γ-caroteno, o la β-criptoxantina, que presenta dos anillos de β-ionona, pero uno de ellos está hidroxilado, transformándose así en retinol con la mitad de eficacia que el β-caroteno. Además en estos compuestos pueden existir isomería *cis/trans*, presentando los isómeros *cis* menor actividad como provitamina A que los *trans*. La vitamina A es muy importante

para la visión nocturna y para el mantenimiento en buen estado de la piel y los tejidos superficiales (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). El déficit de vitamina A produce trastornos de la visión nocturna (nictalopía), sequedad y queratinización de la conjuntiva y cornea (xeroftalmia), hiperqueratosis con atrofia de las glándulas sudoríparas y sebáceas, cabellos y uñas quebradizas, trastornos en el gusto y el olfato, anemia y enfermedades infecciosas (Sommer, 2001).

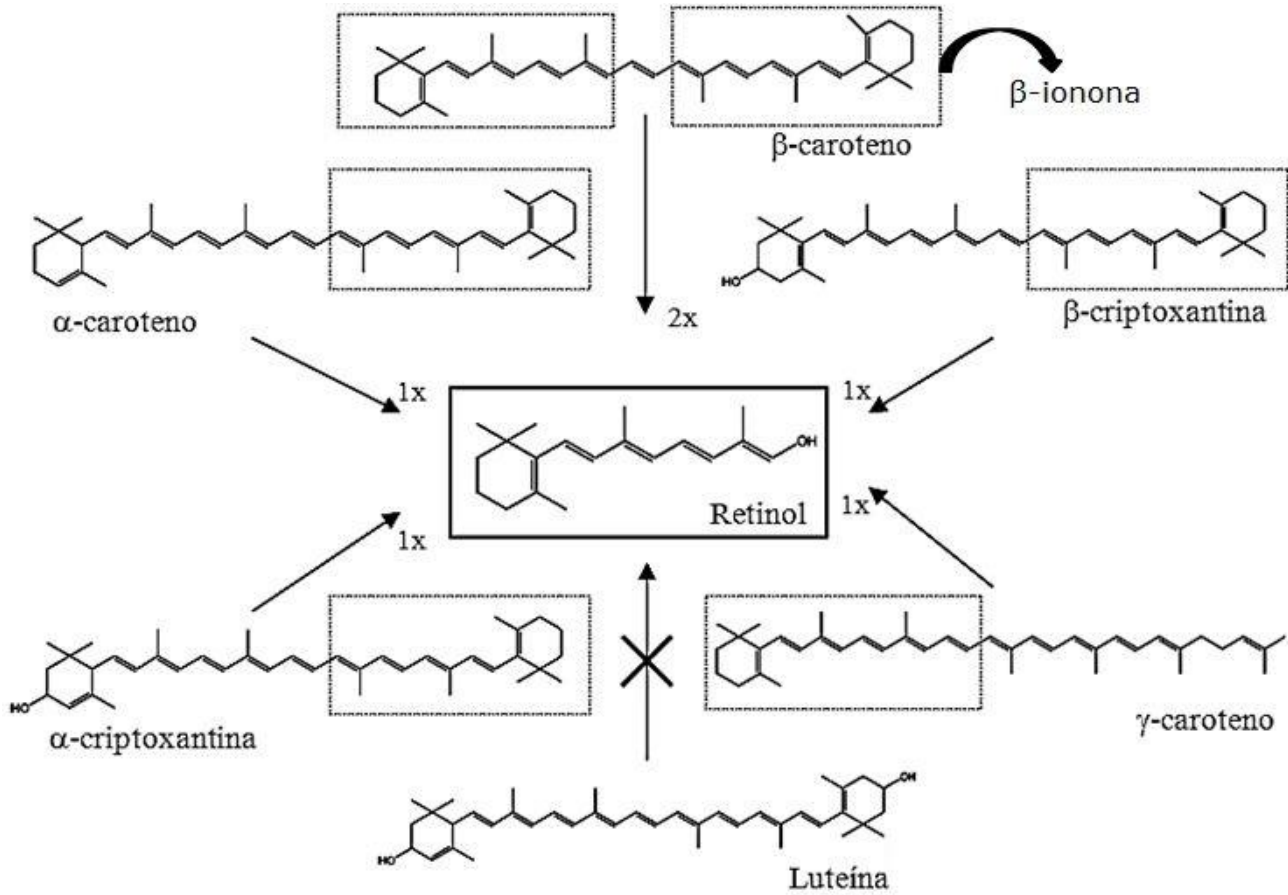


Figura 6. Formación del retinol. (Tomada de <http://www.cromatografialiquida.com.br/carotvita.htm>)

Se estima que el 60% de la ingesta de esta vitamina se hace en forma de provitamina A por el consumo de frutas y vegetales, llegando a un 82% en países en desarrollo.

Se ha establecido que un equivalente de retinol (1 μ g) equivale a 12 μ g de (all-trans)- β -caroteno o a 24 μ g de otros carotenoides provitamínicos. La actividad vitamínica se

expresa como equivalentes de actividad de retinol (EAR) por litro o kg de alimento y se calcula a partir la siguiente fórmula (Food and Nutrition Board, 2002):

$$EAR = \frac{\mu\text{g } \beta\text{-caroteno}}{12} + \frac{\mu\text{g } \beta\text{-criptoxantina} + \mu\text{g } \alpha\text{-caroteno}}{24}$$

Además de ser provitamínicos, su interés actual reside en su actividad como antioxidantes, es decir, la capacidad de disminuir los efectos adversos de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, en condiciones fisiológicas normales en humanos. Por esta razón, cada vez son más los estudios que avalan el papel de estos compuestos en la prevención de enfermedades degenerativas como aterosclerosis, cáncer, envejecimiento, cataratas, etc. El papel protector frente a la luz ultravioleta en las células humanas ha resultado ser mayor en el caso de β -caroteno en comparación con determinados antioxidantes, por su localización en la membrana. Luteína y zeaxantina se localizan en cantidades apreciables en la retina, protegiéndola por sus propiedades antioxidantes. Además, hay estudios que relacionan la aparición de ciertos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, por lo que son considerados como anticancerígenos, no solo debido a sus propiedades antioxidantes, sino a otros efectos como la inhibición de la proliferación de células, mejora de la diferenciación celular y estimulación de la comunicación intercelular, entre otros (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

1.3.-El color: significado y medida

El color se define como la respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina. Se considera como un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de una fuente luminosa (Wyszecki y Stiles, 1982).

El color de los alimentos es uno de los atributos sensoriales de mayor importancia, que influye directamente en la aceptación y percepción de la calidad por parte de los consumidores. Además anticipa sensaciones relacionadas con otras características organolépticas como el sabor y el aroma, de ahí su relación directa con la aceptabilidad de un alimento. Además es el único atributo del que se dispone de métodos analíticos de medida con la suficiente precisión como para poder sustituir una medida sensorial.

La medida del color se puede realizar de dos maneras: mediante evaluación visual o análisis instrumental. El análisis visual consiste en la evaluación de sus características por medio de los sentidos.

Para las medidas instrumentales del color mediante la colorimetría triestímulo se suelen utilizar tres tipos de instrumentos: colorímetros, espectrofotómetros y espectrorradiómetros. Recientemente se ha comenzado a utilizar la digitalización y análisis de imagen (DIA) para la medida instrumental del color. Esta metodología se basa en la adquisición de una imagen para su posterior análisis, del cual se puede obtener no sólo el color total sino también la apariencia del objeto.

2.-OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo realizado es el estudio del efecto que produce el aumento del área superficial en el contenido en compuestos bioactivos de la zanahoria durante el almacenamiento. Otros objetivos son determinar los carotenoides y compuestos fenólicos mayoritarios de dicho vegetal y la variación de color que se produce durante el almacenamiento.

3.-METODOLOGÍA

3.1.-Muestras

Se adquieren 2 Kg de zanahorias frescas en el supermercado con buen aspecto y sin “heridas” aparentes. Para la preparación de las muestras se cortan porciones de 10cm de zanahoria, y se clasifican en función de su longitud, diámetro (lo más parecido en todo su largo) y peso, en grupos de tres. Una será la zanahoria entera (E), otra, cortada en rodajas de aproximadamente 1,25 cm de grosor será la zanahoria en rodajas (R) y por último la zanahoria en triángulos (T), que se obtiene cortando las rodajas en 4 trozos iguales.

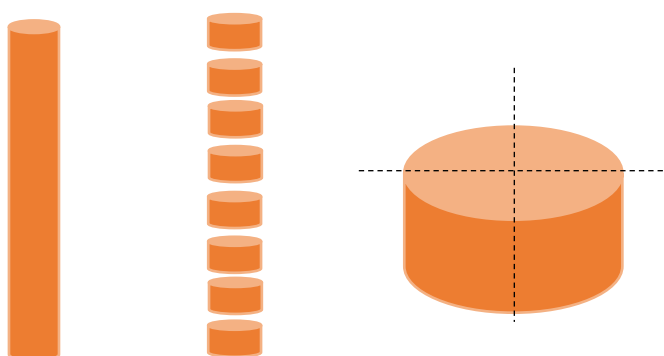


Figura 7. Tipos de cortes realizados

En primer lugar, se toman medidas, con un calibrador de Vernier, del diámetro de todas las muestras y del grosor de las rodajas y los cuartos, para realizar posteriormente el cálculo del área superficial.

Después, las zanahorias se colocan en recipientes cerrados de 5 l. Los frascos se almacenan en la oscuridad a una temperatura de refrigeración (CAMARA CITIUS) a 4° C y se ventilan periódicamente (cada 12 h) para mantener la respiración aeróbica y evitar la acumulación de dióxido de carbono (<0,5%). Los tiempos de almacenamiento son de 0, 2 y 4 días. Una vez retiradas las muestras de la cámara se pesan, con el fin de calcular la pérdida de peso debido al almacenamiento. Finalmente las muestras se liofilizan para ser almacenadas a -20°C en oscuridad hasta su análisis.

3.2.- Métodos empleados

3.2.1.-Determinación del área superficial

A partir de los cortes realizados, se calcula el aumento de área superficial producido con cada tipo de corte. Con el primer corte, se obtienen 8 rodajas de un grosor uniforme, creándose por lo tanto 9 áreas circulares, que se calculan con la fórmula:

$$A = \pi r^2$$

Estas rodajas son cortadas de nuevo en cuartos, aumentando su área superficial con la creación de 8 áreas cuadradas por cada rodaja, siendo un total de 64 nuevas áreas, que se calculan con la siguiente fórmula:

$$A = rh$$

Siendo:

r: radio de la rodaja

h: altura de la rodaja

3.2.2.-Evaluación del color

Para la evaluación del color de las muestras de zanahoria se utiliza el método instrumental de digitalización y análisis de imagen (DIA). La adquisición de las imágenes se realiza con un sistema DigiEye (Luo *et al.*, 2001) que consta de una cámara digital Nikon D-80 conectado a una cámara de iluminación controlada (VeriVide DigiEye®, Leicester, Reino Unido) y un ordenador con el software DigiPix (Figura 8). Para este tipo de mediciones, las muestras son iluminadas por un simulador de iluminación difusa D65. La cámara se calibra con una carta de color estándar (Gretag Macbeth Colour Checker DC Chart) con el fin de caracterizar la respuesta de la cámara, relacionando sus señales RGB con las especificaciones CIE (Comisión Internacional de la Iluminación) bajo las condiciones de iluminación fijadas.



Figura 8. Sistema DigiEye (Imagen tomada de <https://aqinstruments.wordpress.com/>)

Materiales:

- Sistema Digieye:
 - ✓ Digital camera Nikon D-80.
 - ✓ Cabina de iluminación.
- Carta de color standard (Gretag Macbeth Colour Checker DC Chart).

Procedimiento:

Para las mediciones de color, las muestras de zanahoria se colocan en una bandeja con fondo blanco dentro de la cabina y se adquiere la imagen correspondiente. A partir de las imágenes obtenidas, se recortan áreas, las cuales se procesan utilizando el software DigiPix® a partir del cual se obtienen los parámetros colorimétricos.

3.2.3-Determinación del contenido en compuestos fenólicos

1.-Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos se siguió la metodología descrita por Jara Palacios *et al.* (2015).

Materiales:

- Tubos Falcon de 15 mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Centrífuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter)
- Vortex

- Baño ultrasonido Cleaner Rayper UCI-200
- Placas de hielo

Reactivos:

- Mezcla de extracción: Metanol: Agua (3:1)

Procedimiento:

Para la extracción de los compuestos fenólicos se añade en tubos Falcon 1 g de material liofilizado y 10 mL de mezcla de extracción (Metanol:Agua(3:1)). Estos tubos se dejan en agitación durante 24 horas y seguidamente se centrifugan durante 5 minutos a 4000 rpm y 4 °C. Con pipetas Pasteur de vidrio se separa la fase líquida del sedimento resultante y se recoge en otro tubo.

Posteriormente se realiza una segunda extracción añadiendo al tubo que contiene el sedimento, 10 mL de la mezcla de extracción, se agita en el vortex y después se coloca en un baño de ultrasonido durante 10 minutos (con placas de hielo para evitar un aumento de las temperaturas, que produciría la degradación de los compuestos fenólicos). Los tubos se centrifugan en las mismas condiciones anteriormente definidas, y se separa la fase líquida, desechando el sedimento residual. Se recogen las fases líquidas de ambas extracciones y se lleva a un volumen fijo (25 mL) con agua.

2.-Determinación del contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El contenido total de fenoles se determinó por el método de Folin–Ciocalteu (Singleton y Rossi, Jr., 1965) usando ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de muestra. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu que es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico. En medio básico, estos ácidos se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm.

Materiales:

- Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453 (Hewlett-Packard, Palo Alto, Ca, USA).
- Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España).

- Cubeta de plástico de 10 mm de paso de luz.
- Matraces aforados de 5 mL.

Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac; Barcelona, España), Ref. 251567.
- Ácido gálico (Analyticals Carlo Erba), Ref. 406335.
- Na_2CO_3 (Panreac; Barcelona, España), Ref. 141648.

Soluciones:

- Solución patrón de ácido gálico de 500 mg/L: se obtiene por disolución de 50 mg de ácido gálico (previamente desecado en estufa a 100°C durante dos horas) en 100 mL de agua destilada.
- Soluciones de trabajo de ácido gálico: se preparan 6 soluciones de trabajo por diluciones sucesivas de la solución patrón de ácido gálico con agua destilada. Las concentraciones finales fueron 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 mg/L.
- Solución de Na_2CO_3 al 20% (m/v): se obtiene por disolución de 200 g de carbonato sódico anhidro en 700-800 mL de agua destilada hervida y enfriada. Tras la disolución total se enfría a temperatura ambiente y se añade agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1L.

Procedimiento:**Recta de calibrado:**

La recta de calibrado se realiza a partir de las disoluciones de trabajo. La reacción se realizó utilizando matraces de 5 mL. A 100 μL de cada una de las soluciones se le adicionan 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y posteriormente, después de 30 segundos y antes de 8 minutos, se adicionan 1.5 mL de disolución de carbonato sódico al 20%. Finalmente se añade agua destilada hasta alcanzar el volumen de 5 mL. Tras un reposo de 2 horas a 24 °C se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 765 nm de cada disolución frente al blanco de reactivos. Con las absorbancias obtenidas y las concentraciones conocidas, se construye la recta de calibrado. La recta de calibrado obtenida se muestra en el Anexo 1.

Análisis de la muestra:

Las diferentes soluciones obtenidas tras las extracciones se utilizan para determinar el contenido en compuestos fenólicos presentes en ellas. Para ello se toman 100 µl de la solución mencionada, 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de disolución de carbonato cálcico al 20 % y se llevan a un matraz aforado de 5 mL. Se mezcla bien y se enrasa con agua. Tras un reposo de 2 horas a 24 °C para que la reacción se lleve a cabo en su totalidad, se determina la absorbancia de cada disolución frente al blanco de reactivos, a una longitud de onda de 765 nm y en cubetas de 10 mm de paso de luz.

Cálculos:

La concentración de fenoles totales expresada en mg de ácido gálico por gramo de muestra se calcula con los valores de absorbancia medidos a 765 nm y la recta de calibrado según la expresión siguiente:

$$FT (mg / g) = OA + (m \times Abs_{765nm})$$

Siendo:

FT: concentración fenoles totales expresada en mg de ácido gálico por gramo de muestra.

OA: ordenada al origen de la curva de calibrado del ácido gálico.

m: pendiente de la curva de calibrado del ácido gálico.

Abs_{765nm} : absorbancia medida en la muestra a 765 nm.

3.- Determinación del contenido de compuestos fenólicos por UHPLC

El análisis de la composición fenólica se realizó mediante cromatografía líquida ultrarrápida (UHPLC) siguiendo la metodología propuesta por Jara Palacios *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Para ello se utilizó un sistema Agilent 1290 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector de matriz de diodos que se ajustó a 200 a 770 nm. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 Eclipse Plus 120 ((1.8 µm) 50 × 2.1 mm). Las fases móviles utilizadas fueron:

- Fase móvil A: Agua: ácido fórmico 99.99:0.01 (v:v)
- Fase móvil B: Acetonitrilo

El gradiente de elución se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de elución.

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
5	95	5
20	50	50
21	100	0
22	100	0

El flujo de fase móvil se mantuvo a 0.8 mL/min y la temperatura de la columna fue 20 °C. Las longitudes de onda de detección seleccionadas fueron 280, 320 y 370 nm.

Materiales:

- Cromatógrafo líquido Agilent Technologies UPLC 1260 Infinity, equipado con:
 - ✓ Bomba cuaternaria (G1311B).
 - ✓ Inyector automático (G1329B).
 - ✓ Detector de diodos (G1315D).
 - ✓ Compartimento de columna (G1316A).
 - ✓ Columna Agilent Eclipseplus C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)
- Software Open labChemStation.
- Microviales 2 mL Agilent Technologies.

Reactivos:

- Acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido fórmico 98% (Fluka)
- Agua acidulada (agua mili-Q a pH 2 con HCl)
- Agua MilliQ obtenida de un equipo de filtración NANOpureDiamond (Barnsted Inc. Dubuque, IO).

La identificación se llevó a cabo por comparación de su comportamiento espectroscópico y cromatográfico con los de estándares comerciales. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas y las curvas de calibración construidas a partir de concentraciones conocidas de los estándares.

3.2.4-Determinación del contenido en carotenoides

1-Extracción de carotenoides

La extracción de los carotenoides presentes en las muestras se realizó según la metodología descrita por Stinco *et al.* (2014).

Materiales:

- Tubos Eppendorf de 2 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Ultracentrifuga Microfuge 22-R Centrifuge (Beckman-Coulter, USA).
- Vortex Genius 3, IKA, Germany.
- Baño de ultrasonido (Ultrasons Selecta).
- Concentrador Plus/ Vacufuge Plus (Eppendorf, Alemania).

Reactivos:

- Mezcla de: Hexano: Acetona (1:1)
- Nitrógeno gaseoso

Procedimiento:

Para la extracción se debe partir de una cantidad suficiente de material liofilizado y homogeneizado para que la muestra resultante sea representativa, para ello se pesa en un tubo eppendorf alrededor de 100 mg. Posteriormente se añade 1 mL de la mezcla hexano: acetona (1:1), se vortexa y se coloca en el baño de ultrasonido durante 2 minutos, seguidamente se centrifuga a 14000 x g durante 3 minutos. Por último, se separa la fase coloreada usando pipetas pasteur de vidrio, llevándola a otro Eppendorf

(rotulado convenientemente) que se lleva a evaporar en un concentrador rotatorio a 30°C.

La extracción se repite con 500 µL de mezcla de extracción en iguales condiciones anteriormente descritas, tantas veces como sean necesarias hasta no extraer color y se recogen las fases coloreadas en el mismo tubo eppendorf. Luego de cada extracción se evapora en el concentrador rotatorio, obteniéndose un extracto seco que es almacenado en atmósfera de nitrógeno, a una temperatura de -20 °C y en oscuridad hasta el momento de su análisis.

2-Determinación del contenido de carotenoides por espectrofotometría

El método espectrofotométrico se fundamenta en la medición de la absorbancia a 450 nm de un extracto de carotenoides de una muestra y luego mediante el uso de una curva de calibración se calcula el contenido de carotenoides totales.

Materiales:

- Matraces de 10 mL
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8454
- Cubetas de vidrio óptico de paso de luz de 10 mm

Reactivos:

- Éter de petróleo
- Solución madre de β-caroteno 100 ppm en éter de petróleo

Procedimiento:

Recta de calibrado:

Para la espectrofotometría es necesaria la elaboración de una curva de calibración para calcular el contenido de carotenoides totales. Dicha curva se obtiene a partir de una solución madre de β-caroteno de 103 ppm. Se preparan los diferentes puntos de la curva a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 ppm, en matraces de 10 mL con éter de petróleo. Tras agitarlos se mide la absorbancia de cada disolución a 450 nm (longitud de onda a la que la absorción del β-caroteno es máxima), construyendo la curva de

calibración a partir de los resultados obtenidos. La recta de calibrado obtenida se muestra en el Anexo 2.

Análisis de la muestra:

A partir del extracto obtenido se redisuelve en éter de petróleo en un matraz aforado de 10 mL y se enrasa. Finalmente, se filtra con filtro de jeringa de 0.45 μm y se mide su absorbancia a 450 nm.

Cálculos:

Por último se determina por medio de la curva de calibración la cantidad de carotenoides totales presentes en la muestra. Expresándolos como mg de β -caroteno/100 g de muestra.

3- Determinación del contenido total de carotenoides por RRLC

Los carotenoides fueron analizados por cromatografía líquida de rápida resolución (RRLC) siguiendo la metodología descrita en Stinco *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Para ello se utilizó un sistema Agilent 1260 equipado con detector DAD. Como fase estacionaria se utilizó una columna C30 (150 x 4,6 mm, 3 μm) (YMC, Wilmington, NC) protegida por una pre-columna de C30 correspondiente (3 μm , 10 ´ 4 mm). Como fase móvil se utilizaron: Fase A: Metanol (MeOH), Fase B: Metil-t-butil eter (MTBE) y Fase C: Agua MilliQ.

Materiales:

- Cromatografo liquido Agilent Technologies HP 1260, equipado con:
 - ✓ Bomba cuaternaria.
 - ✓ Desgasificador de vacio.
 - ✓ Compartimento termostatzado para columna.
 - ✓ Inyector automatico.
 - ✓ Detector de diodos.
 - ✓ Columna YMC C30 (3 μm , 150 ´ 4.6 mm) (YMC Wilmington, NC, EEUU).
 - ✓ Pre-columna de YMC 30 (3 μm , 10´ 4 mm) (YMC Wilmington, NC, EEUU).
- Software Openlab.

- Microviales 2 mL color ámbar e insertos (Agilent Technologies).

Reactivos:

- Acetato de etilo (Panreac; Barcelona, España), Ref.351318
- Metanol calidad HPLC (MeOH) (Merck, Ref 1.06018)
- Metil-t-butil eter (MTBE) calidad HPLC (Merck, Ref. 1.01845)
- Agua MilliQ obtenida de un equipo de filtración NANOpure Diamond (Barnsted Inc. Dubuque, IO).

Procedimiento:

Los extractos se redisuelven en acetato de etilo y se centrifugan a 14.000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Se toman 30 µL del sobrenadante y se introduce en el vial, para su posterior inyección en el RRLC.

La identificación de los carotenoides presentes en la muestra se llevó a cabo por comparación de su comportamiento espectroscópico y cromatográfico con los de estándares aislados de acuerdo a protocolos recomendados (Rodríguez-Amaya, 2001). La cuantificación se realizó por calibración externa a partir de curvas de calibrado de fitoeno, α -caroteno y β -caroteno.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-Pérdida de peso

En primer lugar, tras pesar la muestra después del almacenamiento, se determina el porcentaje de pérdida de peso. Como puede observarse (Tabla 2) esta pérdida de peso es mayor a medida que avanza el tiempo de almacenamiento, también se observa una mayor pérdida de peso cuando aumenta el área superficial, es decir, en las zanahorias cortadas en triángulos. Probablemente se deba a que este aumento de área superficial aumente la transpiración del vegetal, y en consecuencia la pérdida de agua sea mayor.

Tabla 2. Porcentaje de pérdida de peso tras el almacenamiento.

	Entera	Rodajas	Cuartos
t=2	0,74	0,60	0,97
t=4	0,71	0,76	2,42

4.2.-Contenido en compuestos fenólicos

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó por dos metodologías: contenido total por Folin-Ciocalteu y contenido individual y total por UHPLC. En la figura 9 se muestra la comparativa de ambos métodos en el tiempo 0, para los tres tipos de cortes realizados a las muestra.

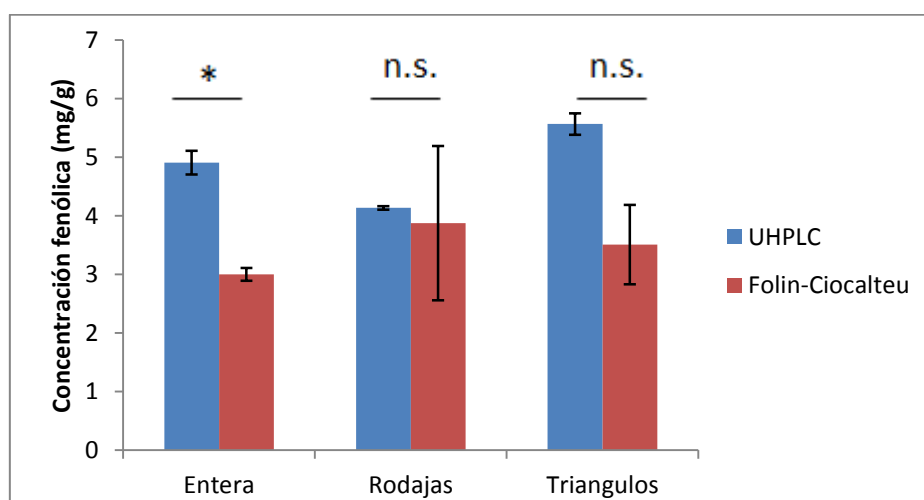


Figura 9. Comparativa de métodos para determinar compuestos fenólicos.

El asterisco denota una diferencia significativa entre las muestras usando un test t-Student de dos colas con un p-value < 0,1. n.s. denota una diferencia no significativa según el resultado del test t-Student.

Como se aprecia, la determinación por UHPLC proporciona mejores resultados, pues el método Folin-Ciocalteu puede subestimar o sobrestimar el contenido en fenoles totales, debido a la heterogeneidad de los compuestos fenólicos y a la presencia de sustancias fácilmente oxidables que pueden interferir en el resultado cuando se emplea dicha técnica (Chandra y González de Mejía, 2004).

Los principales fenoles identificados por UHPLC fueron el ácido clorogénico y distintos derivados del ácido cafeico (CAF D1, D2) como se observa en la tabla 3, donde se muestran los contenidos medios y desviación estándar de los compuesto fenólicos identificados en el tiempo 0. Estos compuestos coinciden con los reportados por Zhang y Hamazu (2004) y por Sujardinata y Cisneros-Cevallos (2012). En ambos trabajos los principales compuestos en la zanahoria fueron el ácido clorogénico y el 3,5-ácido dicafeoilquinico.

Tabla 3. *Contenidos medios de compuestos fenólicos identificados por UHPLC expresados en mg/g de muestra.*

	Entera	Rodajas	Triángulos
Ác. P-hidroxibenzoico	0,160±0,019	0,106±0,006	0,135±0,052
Ác. Clorogénico	1,964±0,048	1,526±0,004	1,982±0,047
Ác. Cafeico	0,362±0,071	0,204±0,005	0,283±0,006
Ác. Siríngico	0,140±0,004	0,160±0,015	0,128±0,001
Ác. P-cumarínico	0,230±0,004	0,151±0,032	0,119±0,002
CAF D1	0,279±0,051	0,379±0,001	0,344±0,049
CAF D2	1,465±0,109	1,147±0,027	2,172±0,041
Ác. Protocatequico	0,310±0,005	0,461±0,006	0,405±0,014
TOTAL	4,910±0,202	4,135±0,030	5,567±0,182
Folin-Ciocalteu	3,001±0,107	3,877±1,316	3,508±0,676

La figura 10 muestra la evolución del contenido de compuestos fenólicos totales determinados como la sumatoria de los compuestos individuales por UHPLC durante el almacenamiento, para los tres tipos de cortes realizados.

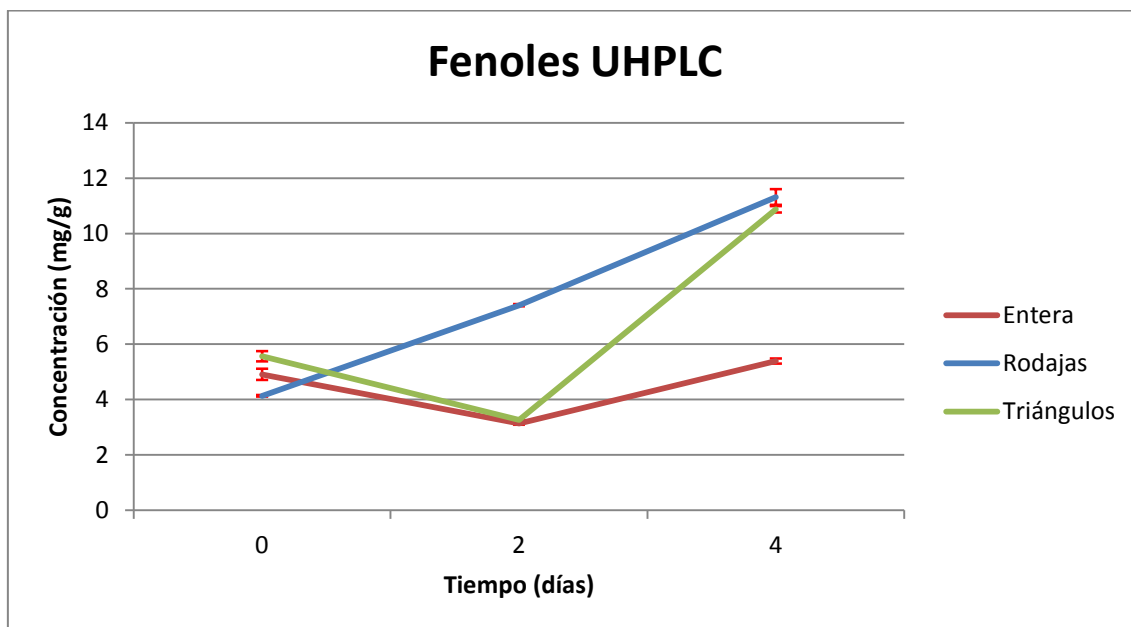


Figura 10. Evolución del contenido fenólico en el tiempo

Tras el almacenamiento de las muestras durante cuatro días se obtienen los niveles totales de fenoles presentes, observando que en los tres tipos de cortes realizados, se produce un aumento del contenido fenólico en el tiempo. Si bien, para la muestra de zanahoria entera el aumento de este contenido es muy inferior (9,7%) que para las muestras cortadas en rodajas y triángulos, en las que se produce un aumento del 173,7 y 95,2% respectivamente, entre el inicio y el final del almacenamiento.

Esto se debe al estrés originado al vegetal por el corte, que induce un aumento en la actividad de la fenilalanina amonio liasa, y por tanto un aumento en la producción de fenoles (Surjadinata y Cisneros-Zevallos 2012). Pero a diferencia de lo expuesto en dicho estudio, no se observa un pico máximo de la actividad enzimática en el día 2 de almacenamiento, al contrario, en el día 2 se observan niveles más bajos de contenido fenólico en algunas muestras (Figura 10), produciéndose un descenso del 36,2 y 41,6% para las zanahorias entera y triángulos respectivamente. Es a partir de entonces cuando se observa una acumulación de estos, probablemente por el aumento de la actividad enzimática a partir del día 2. Sin embargo en la zanahoria cortada a rodajas si

se observa actividad de la enzima desde el primer momento, produciéndose un aumento del contenido fenólico del 79,2% entre los días 0 y 2 de almacenamiento.

La figura 11 muestra la relación entre el incremento del área superficial y el contenido de fenoles totales por UHPLC al inicio y al final del experimento.

Sujardinata y Cisneros-Zevallos (2012) reportaron un aumento en la intensidad de las lesiones ocasionadas a la zanahoria, es decir, un aumento de su área superficial produce un aumento en el contenido fenólico. Como puede observarse el aumento fenólico es mayor en las zanahorias más lesionadas, como son la cortada en rodajas y en triángulos (Figura 10).

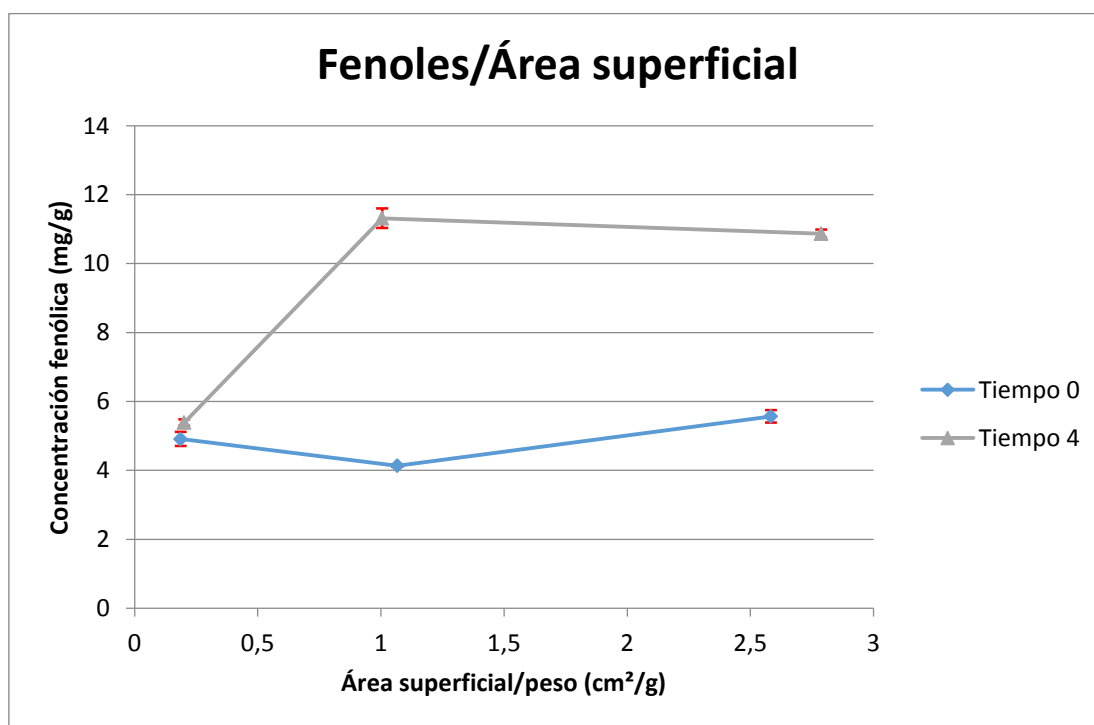


Figura 11. Evolución del contenido fenólico con el área superficial.

En el tiempo 0 no se muestra un aumento en el contenido fenólico al incrementar el área superficial, probablemente porque la activación enzimática de la fenilalanina amonio liasa aún no es efectiva y por lo tanto la producción de compuestos fenólicos frente al daño ocasionado es inexistente. Tras 4 días de almacenamiento la acumulación de fenoles ya se observa, pues la enzima comienza la producción de dichos compuestos. Esta acumulación es menor cuando el área superficial es muy

pequeña (zanahoria entera), pero a medida que el área superficial aumenta, la producción de compuestos fenólicos también aumenta (Figura 11).

4.3.- Contenido en carotenoides

La determinación de carotenoides totales se lleva a cabo mediante dos métodos: espectrofotometría y por cromatografía de rápida resolución (RRLC). El contenido total se calculó como la suma de los compuestos individuales obtenidos por RRLC. En la figura 12 se muestra la comparativa de los resultados obtenidos por ambos métodos en el tiempo 0.

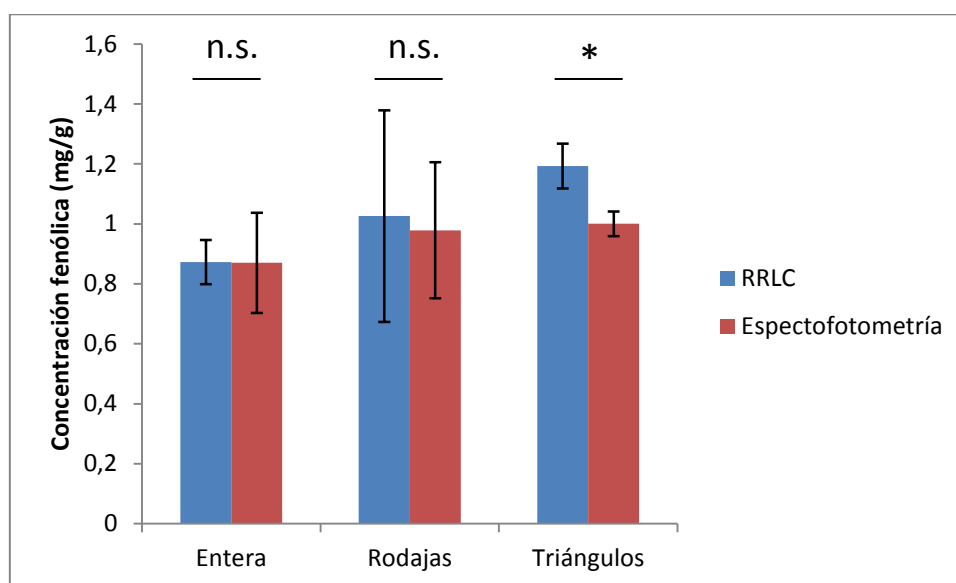


Figura 12. Comparativa de métodos para determinar carotenoides

El asterisco denota una diferencia significativa entre las muestras usando un test t-Student de dos colas con un p-value < 0,1. n.s. denota una diferencia no significativa según el resultado del test t-Student.

Comparando ambas metodologías se puede observar que no hay diferencias entre las muestras entera y la de rodajas, este resultado era de esperar ya que en el método espectrofotométrico la cuantificación se realiza a partir una curva patrón de β -caroteno, siendo este el mayoritario.

En la tabla 4 se muestran los valores medios y desviación estándar de los principales carotenoides obtenidos por RRLC para las muestras en el tiempo 0, siendo los mayoritarios el β -caroteno y el α -caroteno

Tabla 4. Contenidos medios de carotenoides obtenidos por RRLC expresados en mg/g de muestra seca.

	Metodología	Entera	Rodajas	Triángulos
Fitoeno	RRLC	0,016±0,001	0,039±0,003	0,081±0,008
α-Caroteno	RRLC	0,347±0,023	0,511±0,179	0,534±0,039
β-Caroteno	RRLC	0,484±0,037	0,433±0,195	0,518±0,085
β-Caroteno(isómero)	RRLC	0,025±0,015	0,043±0,026	0,061±0,057
β-Caroteno totales	RRLC	0,509±0,052	0,476±0,170	0,577±0,028
Carotenoides totales	RRLC	0,873±0,073	1,026±0,353	1,192±0,075
Carotenoides totales	Espectrofotometría	0,870±0,167	0,979±0,227	1,000±0,041

La figura 13 muestra el efecto del aumento del área superficial en el contenido de carotenoides obtenido con la sumatoria de los componentes individuales por RRLC durante el almacenamiento.

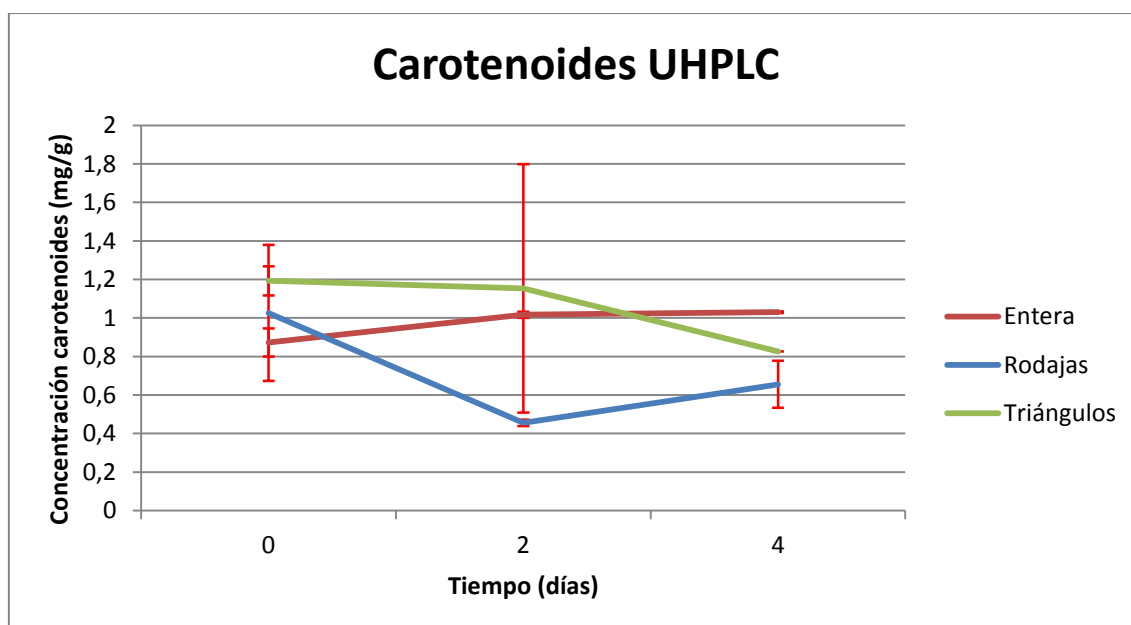


Figura 13. Evolución del contenido de carotenoides en el tiempo

En cuanto al contenido de carotenoides, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos fenólicos, no se observa un aumento en función del tiempo de

almacenamiento. Por el contrario el contenido de carotenoides disminuye en el almacenamiento, en las muestras que sufrieron cortes, mientras que las zanahorias enteras, no mostraron este comportamiento. Como se expone en Meléndez-Martínez *et al.* (2004), el efecto del almacenamiento sobre los carotenoides va a depender de las condiciones en las que este se lleve a cabo, aumentando la degradación de estos compuestos a medida que la temperatura aumenta o produciendo la rotura de los carotenoides en compuestos incoloros de bajo peso molecular si aumentamos la intensidad lumínica. La disminución no se produce en todas las muestras, solo en las zanahorias cortadas a rodajas o triángulos (Figura 13). Esta reducción fue del 36,1% y del 30,8% para las cortadas a rodajas y las cortadas a triángulos, respectivamente, durante el almacenamiento. Esta pérdida puede deberse a que los carotenoides son compuestos sensibles a procesos de oxidación que son estimulados por la pérdida de la integridad celular, de manera que los vegetales cortados y/o triturados ponen a sus células en contacto con sustancias como enzimas que pueden modificar e incluso destruir estos pigmentos (Arguedas-Gamboa *et al.*, 2015). El paso inicial de la oxidación implica reacciones de epoxidación, formación de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) e hidroxilación, obteniéndose finalmente como resultado de fragmentaciones posteriores, compuestos de bajo peso molecular similares a los originados en la oxidación de ácidos grasos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

4.4-Color

La tabla 5 muestra los parámetros de color L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab} . El color de la zanahoria se debe a la presencia de los carotenoides como anteriormente se ha comentado. Los resultados mostraron que durante el almacenamiento, en las tres muestras, la claridad disminuyó, lo cual indica que las muestras se hacían más oscuras a mayor tiempo de almacenamiento. Este comportamiento fue similar para los parámetros a^* , b^* y C^*_{ab} , mientras que el tono h_{ab} no mostró variación alguna.

Tabla 5. Parámetros colorimétricos

	Tiempo (días)	L*	a*	b*	C* _{ab}	h _{ab}
Entera	0	65,79±0,34	48,21±0,57	52,49±0,73	71,28±0,83	47,43±0,33
	2	62,93±0,36	37,05±1,43	38,47±0,79	53,41±1,40	46,08±0,91
	4	61,05±0,87	37,62±0,18	40,40±0,59	55,20±0,55	47,04±0,28
Rodajas	0	63,81±0,27	47,91±0,81	56,78±0,44	74,30±0,78	49,85±0,37
	2	62,44±0,35	36,22±0,42	40,38±0,12	54,25±0,35	48,11±0,27
	4	61,73±0,66	35,71±1,22	39,88±0,76	53,53±1,38	48,16±0,42
Triángulos	0	64,41±0,54	48,53±0,30	56,86±0,50	74,76±0,33	49,52±0,37
	2	63,51±0,26	40,39±0,45	43,46±0,42	59,33±0,50	47,09±0,35
	4	62,46±0,29	35,59±0,58	39,50±0,49	53,17±0,72	47,98±0,26

Para evaluar los cambios de color debido al almacenamiento se calculó la diferencia de color ΔE^*_{ab} entre el día 0 y el día 4. Esta diferencia se determina según la siguiente ecuación:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

donde, $\Delta L^* = (L^*1 - L^*2)$, y Δa^* y Δb^* se definen similarmente.

Los resultados se muestran en la tabla 6. Como era de esperar las mayores diferencias de color se encontraron tras el almacenamiento en las zanahorias cortadas en rodajas 20.95 unidades Cielab y 21.74 unidades Cielab para la zanahoria en triángulos. Esto coincide con los resultados anteriormente expuestos donde los mayores cambios en el contenido de carotenoides durante el almacenamiento se encontraron en las zanahorias con mayor superficie expuesta.

Tabla 6. Diferencias de color entre las distintas muestras debidas al almacenamiento expresadas en unidades Cielab.

	Entera	Rodajas	Triángulos
ΔE^*_{ab}	16.76	20.95	21.74

5.-CONCLUSIONES

Las conclusiones que derivan del estudio realizado son las siguientes:

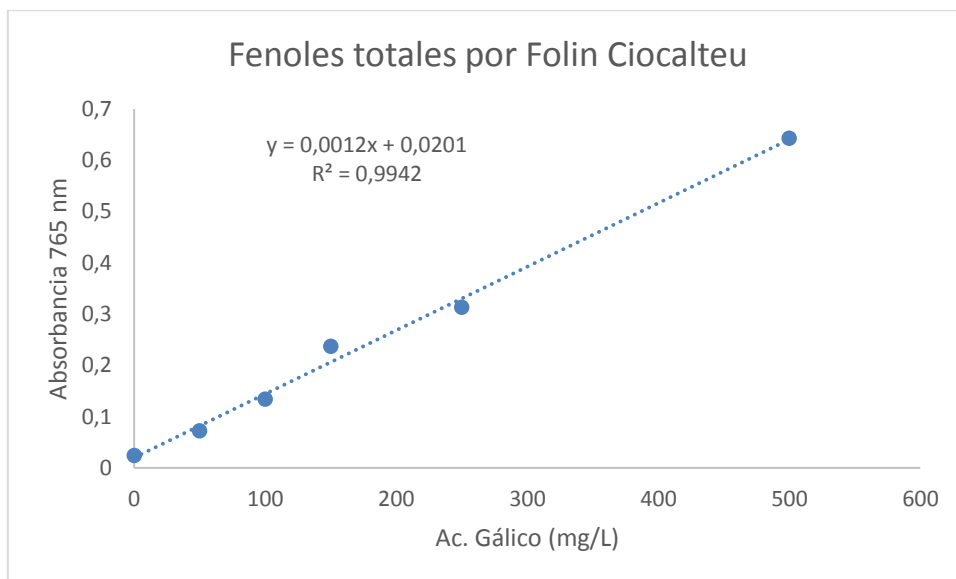
1.-Los compuestos fenólicos mayoritarios en la zanahoria son el ácido clorogénico y diferentes derivados del ácido cafeico. En cuanto al contenido fenólico total, se ha observado como un incremento del área superficial produce un aumento de dichos compuestos durante el almacenamiento, siendo mayor en las zanahorias con un área superficial más elevada.

2.-Los carotenoides mayoritarios en la zanahoria son el β -caroteno y el α -caroteno. El contenido de carotenoides totales disminuye en el almacenamiento, y es más apreciable a medida que se aumenta el área superficial de las zanahorias.

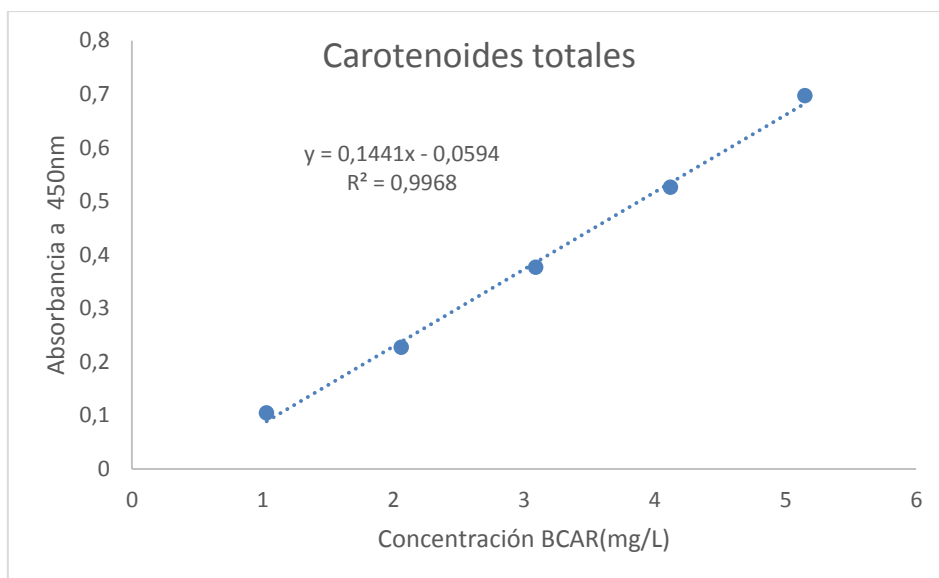
3.-La disminución de carotenoides durante el almacenamiento provoca una variación en el color de la zanahoria: se produce una disminución de la claridad, en cambio, el tono permanece estable.

Anexos

Anexo 1. Recta de calibrado para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu.



Anexo 2. Recta de calibrado para la determinación de carotenoides totales por espectrofotometría.



6.-BIBLIOGRAFÍA

Arguedas-Gamboa P, Mora-Molina J, Sanabria-Mora J. Comparación del contenido de carotenoides en productos nutracéuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca. *Tecnol. Marcha*. 2015; 28(4): 42-35.

Cazzonelli, C.I. Carotenoids in nature: Insights from plants and beyond. *Funct Plant Biol*. 2011; 38: 833–847.

Chandra S, González de Mejía E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Sci Food Agr*. 2004; 52: 3583-3589.

Cobb DT. Polyphenols: Food Sources, Bioactive Propieties and Antioxidant Effects. Edición 2016. New York: Nova Science Publishers; 2017.

Gimeno Creus, E. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm: Farmacia y sociedad*. 2004; 23: 80-84.

Jara-Palacios MJ, Gonçalves S, Hernanz D, Heredia FJ, Romano A. Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Res Int*. 2018; 109: 433–439.

Jara-Palacios MJ, Hernanz D, Cifuentes-Gomez T, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ, Spencer JPE. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem*. 2015; 183: 78–82.

Luo MR, Cui CG, Li C. British Patent (Application Nº 0124683.4). Apparatus and method for measuring colour (DigiEye System). Derby University Enterprises Limited. 2001.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 727-747.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Arch Latinoam Nutr*. 2004; 54(2): 65-74.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch Latinoam Nutr. 2004; 54(2): 149-155.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. Arch Latinoam Nutr. 2007; 57(2): 109-117.

Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. 2012; 27(1): 76-89.

Rodríguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press; 2001.

Singleton VL, Ross JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. 1965; 16(3): 144-158.

Sommer A. Vitamin A Deficiency. Maryland, USA: John Wiley & Sons; 2001.

Stinco CM, Benítez-González AM, Hernanz D, Vicario IM, Meléndez-Martínez AJ. Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. J Chromatogr A. 2014; 1370: 162-170.

Stinco CM, Fernández-Vázquez R, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM. Effect of Orange Juice's Processing on the Color, Particle Size, and Bioaccessibility of Carotenoids. J Agric Food Chem. 2012; 60(6): 1447-1455.

Surjadinata BB, Cisneros-Zevallos L. Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. Food Chem. 2012; 134: 615-624.

Tomás-Barberán FA. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, nutrición y salud. 2003; 10(2): 41-55.

Valencia-Avilés E, Ignacio-Figueroa I, Sosa-Martínez E, Bartolomé-Camacho MC, Martínez-Flores HE, García-Pérez ME. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas. 2017; 16: 15-29.

Wyszecki G, Styles, WS. Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae. New York: Wiley; 1982.

Zhang D, Hamazu Y. Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.) Food Agric Environ. 2004; 2: 95–100.