



Universidad de Sevilla



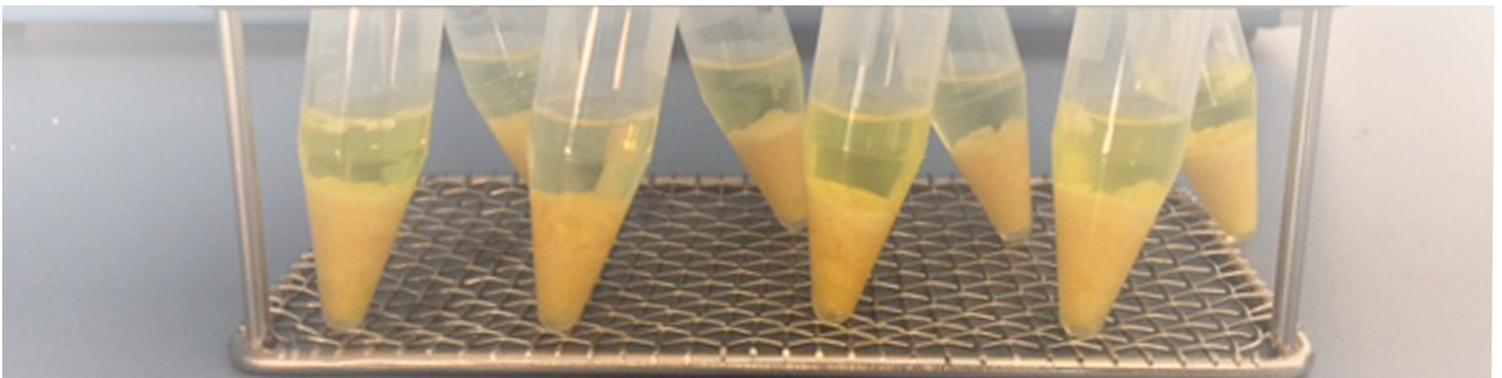
CAROTENOIDES, COLOR Y

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN
DISTINTAS VARIEDADES DE
SANDÍA

Autor: Raúl Córdoba Moreno

Facultad de Farmacia

**Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina
Legal**





Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Carotenoides, color y actividad antioxidante en distintas variedades de sandía

Proyecto experimental

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Raúl Córdoba Moreno

Autor

Carla M. Stinco Scanarotti

Tutora

Isabel M. Vicario Romero

Tutora

En Sevilla, a fecha de 11 de Septiembre de 2017

Resumen

Los carotenoides son pigmentos tetraterpénicos que destacan, desde un punto de vista nutricional y fisiológico, por su actividad antioxidante y por ser precursores de la vitamina A. Los objetivos de este proyecto han sido caracterizar el perfil y contenido de carotenoides, la actividad antioxidante por métodos *in vitro* y el color mediante digitalización de imagen en distintas variedades de sandía. La identificación y posterior cuantificación de los compuestos ha sido realizada por cromatografía líquida de rápida resolución (RPLC) y su actividad antioxidante determinada por el método TEAC. Para el análisis del color, se ha elegido un método no destructivo, el sistema DigiEye® con el software DigiPix, el cual hace uso del espacio colorimétrico CIELAB. En las zonas analizadas de ambas variedades se han encontrado perfiles cuantitativamente como cualitativamente diferentes, siendo en la variedad roja predominante los carotenos –licopeno y β -caroteno- y las xantofilas –luteína y violaxantina- en la amarilla. En la sandía roja, 100 gramos de porción comestible aportan entorno a 1mg de carotenoides y 50 veces menos en la sandía amarilla. Además de carotenoides, se ha identificado α -tocoferol por su carácter antioxidante, y clorofilas y derivados por su aportación al color. La actividad antioxidante fue mayor en la variedad roja, y más concretamente en la zona comestible. El análisis colorimétrico nos confirmó que el color rojo procede de los carotenos (licopeno e isómeros), el amarillo de las xantofilas (luteína y violaxantina) y que el color amarillento del mesocarpio se debe a la luteína. Se ha concluido que es posible estimar el contenido de carotenoides totales y la actividad antioxidante mediante los parámetros colorimétricos a^* b^* y L^* .

Palabras claves

Carotenoides, actividad antioxidante, color, vitamina A.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 4 |
| 1.1. Carotenoides en frutas y verduras: relación con el color | 7 |
| 1.1.1. Sandía: color y carotenoides | 7 |
| 1.2. Biosíntesis de los carotenoides en plantas superiores | 8 |
| 1.3. Capacidad antioxidante de los carotenoides..... | 11 |
| 1.4. El color: definición y medida..... | 12 |
| 1.4.1. Medida del color | 13 |
| 1.4.2. Análisis instrumental..... | 13 |
| 2. Objetivos | 16 |
| 3. Metodología | 16 |
| 3.1. Elección de las muestras..... | 16 |
| 3.2. Toma de muestras | 16 |
| 3.3. Determinación del contenido de carotenoides | 17 |
| 3.3.1. Extracción de carotenoides de Sandía Roja..... | 17 |
| 3.3.2. Extracción de carotenoides de Sandía Amarilla | 17 |
| 3.4. Análisis cromatográfico | 18 |
| 3.5. Actividad antioxidante..... | 21 |
| 3.6. Análisis del color | 23 |
| 3.7. Análisis estadístico..... | 23 |
| 4. Resultados y discusión | 24 |
| 5. Conclusiones | 36 |
| 6. Bibliografía | 37 |

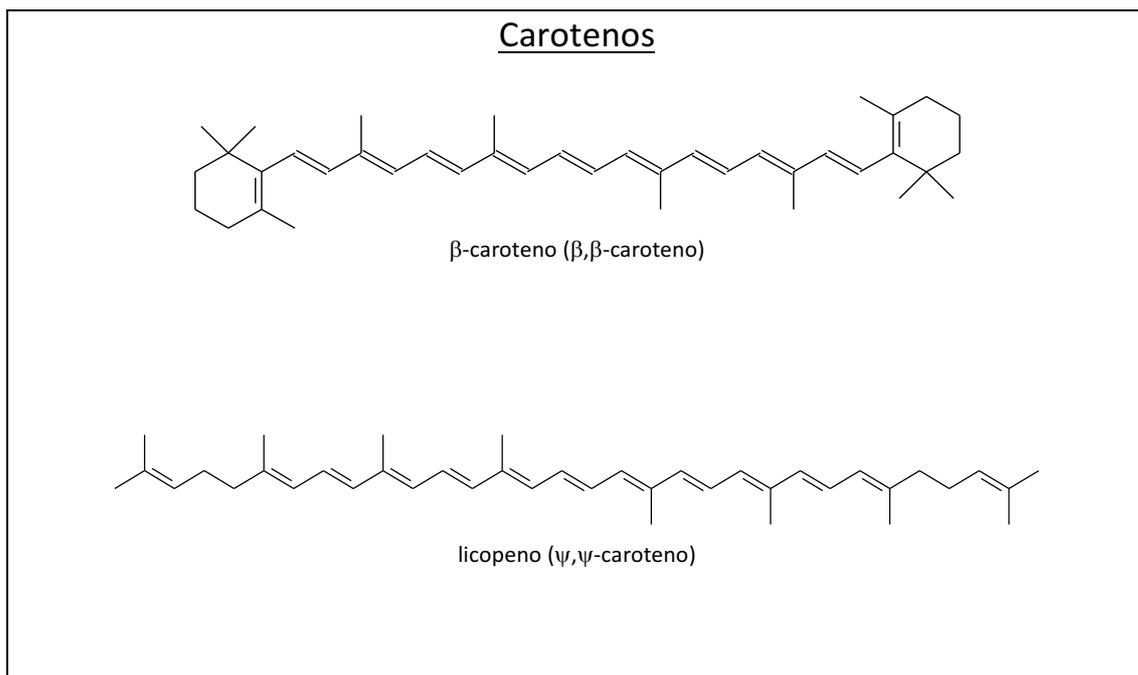
1. Introducción

Las plantas sintetizan una enorme variedad de metabolitos que pueden ser clasificados en dos grupos dependiendo su función: metabolitos primarios, los cuales participan en la nutrición y son esenciales para el metabolismo de las plantas, y metabolitos secundarios, que influyen en las relaciones entre las plantas y el entorno. El grupo de los terpenos (también conocidos como isoprenos) desempeña una gran variedad de roles en las plantas como hormonas (ácido abscísico, giberelina), transportadores de electrones (ubiquinona, plastoquinona), componentes estructurales de las membranas celulares (fitoesteroles) y como pigmentos fotosintéticos (fitol, carotenoides) entre otros.

Muchos compuestos que son metabolitos secundarios de origen terpénico tienen un importante valor comercial como saborizantes (aceites esenciales), pigmentos (carotenoides), principios activos (taxol) o agroquímicos (linalool como atrayente de polinizadores) (Morais *et al.*, 2010).

Los carotenoides son compuestos tetraterpenoides formados a partir de 8 unidades de isoprenos (40 átomos de carbono), de forma tal que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. Considerando su composición química se pueden dividir en dos grandes grupos:

- los carotenos, que son hidrocarburos (formados sólo por C e H),
- las xantófilas, formadas por C, O e H. El oxígeno puede estar presente en distintas formas. En el caso de las xantofilas típicas de la dieta, los grupos más usuales son hidroxilo, epóxido y carbonilo (Figura 1).



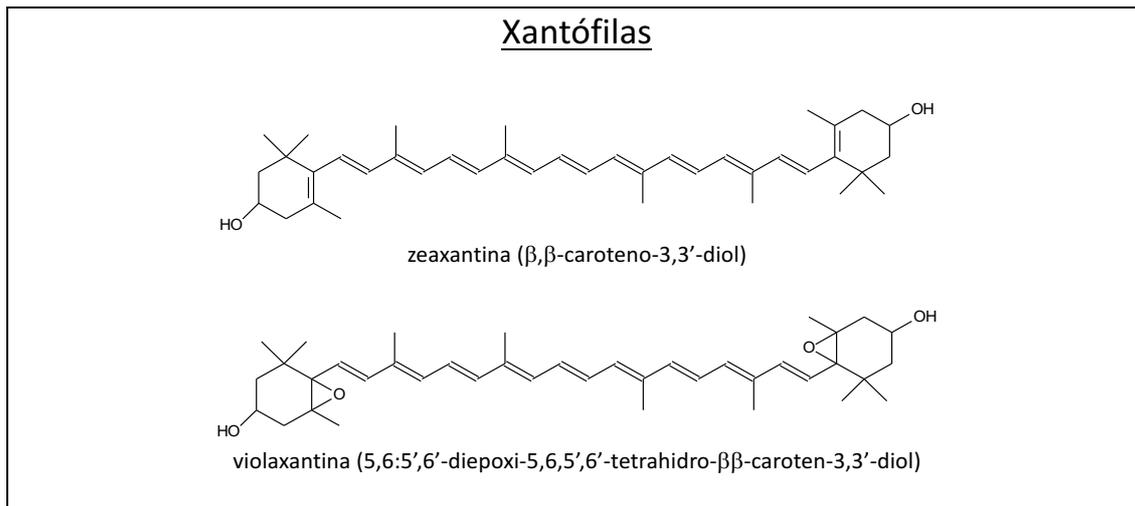


Figura 1. Estructuras químicas de carotenos y xantófilas

Los carotenoides, ya sean carotenos o xantófilas, pueden presentar una estructura acíclica (sin anillos) como el licopeno, o cíclica, (con anillos en uno o ambos extremos) como el β -caroteno.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son destacables por su gran distribución, su diversidad estructural y sus funciones variadas.

Más de 600 carotenoides, sin incluir los isómeros cis y trans, han sido aislados y caracterizados desde fuentes naturales. Solo una fracción de los carotenoides identificados hasta la fecha se ha encontrado en alimentos; lo que no implica que el perfil de carotenoides de los alimentos no sea complejo, aproximadamente 40 están presentes en la dieta humana, de los cuales solo 20 han sido identificados en sangre y tejidos humanos. Entre ellos encontramos β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina (Khachik *et al.*, 1992).

Desde un punto de vista nutricional y fisiológico, la importancia de los carotenoides ha radicado durante décadas en el hecho de que algunos de ellos son precursores de compuestos con actividad vitamínica A. Sin embargo, en los últimos años el interés por estos compuestos ha aumentado considerablemente, debido a que numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación directa entre elevados niveles de carotenoides en la dieta o en sangre y menor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas (Krinsky *et al.*, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; Olson, 1999). Se han descrito numerosas actividades biológicas de los carotenoides destacando la actividad antioxidante, además de reforzar el sistema inmunitario, remisión de lesiones malignas e inhibición de la mutagénesis (Rao y Rao, 2007).

En la dieta humana los carotenoides son ingeridos mayormente formando parte de frutas y hortalizas, y en menor medida de fuentes animales y en forma de aditivos alimentarios (colorantes). Los carotenoides además de su papel en el color de frutas y verduras destacan por su importancia dietética y fisiología ya que algunos poseen actividad provitamina A. La vitamina

A es esencial tanto para la visión nocturna como para mantener en buen estado de salud la piel y tejidos superficiales. La vitamina A puede ser ingerida como tal, como retinol, o en forma de precursores menos activos, como son los carotenoides. Podemos distinguir los carotenoides en dos grupos: provitamínicos (β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina) y no provitamínicos (licopeno, luteína, zeaxantina). Con el fin de expresar el contenido total de vitamina A de los alimentos, este se puede expresar como equivalentes de retinol (ER) o como equivalentes de actividad de retinol (EAR) (Beltrán *et al.*, 2012; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004):

- $ER (\mu\text{g}/\text{día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/6) + (\alpha\text{-caroteno}/12) + (\beta\text{-criptoxantina}/12)$.
- $EAR (\mu\text{g}/\text{día}) = \text{retinol} + (\beta\text{-caroteno}/12) + (\alpha\text{-caroteno}/24) + (\beta\text{-criptoxantina}/24)$.

La capacidad de absorber luz de los carotenoides ha sido explotada por los organismos fotosintéticos para ampliar el rango de absorción de luz utilizado por el sistema de clorofilas. Después de la absorción de luz por parte de los carotenoides, estos se excitan y transfieren la energía de excitación a las clorofilas. Además de su papel como pigmento, los carotenoides protegen del exceso de luz impidiendo los estados excitados de las clorofilas. En las plantas, las xantofilas (procedentes de la oxigenación de los carotenoides) proporcionan una fotoprotección adicional (Moise *et al.*, 2014).

Los carotenoides no solo desempeñan su función como pigmentos esenciales en la fotosíntesis y fotoprotección de los organismos fotosintéticos, sino que 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).

El análisis del color adquiere gran valor ya que es un método no destructivo que permite obtener gran cantidad de información de una forma rápida y que conserva la muestra. A partir de la medida del color de las frutas y verduras se puede estimar su contenido en pigmentos.

Estudios realizados en tomate han arrojado una buena correlación entre ciertos parámetros colorimétricos y el contenido en licopeno. De igual manera, otros estudios revelaron una buena correlación entre el contenido de carotenoides y el parámetro colorimétrico a^* (Arias *et al.*, 2000; Patras *et al.* 2009; D'Souza *et al.*, 1992).

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar el perfil de carotenoides de distintas variedades de sandía y relacionarlos con su color y con la actividad antioxidante que presentan en relación a su perfil de pigmentos.

1.1. Carotenoides en frutas y verduras: relación con el color

En las frutas y verduras el color está determinado por los pigmentos y la cantidad de estos. Los pigmentos naturales se clasifican en: antocianos, betalaínas, flavonoides, carotenoides.

Una característica importante es el sistema de dobles enlaces conjugado que se encuentra en el centro de la molécula, el cual constituye el cromóforo que absorbe luz y que otorga a los carotenoides su atractivo color y el espectro de absorción visible que sirve de base para su identificación y cuantificación. El esqueleto básico puede ser modificado de diferentes maneras, mediante ciclación, hidrogenación, deshidrogenación, introducción de grupos oxigenados, reordenamiento, acortamiento de la cadena o combinación de varias, resultando una multitud de estructuras (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

A pesar de tener una estructura variada, todos ellos presentan una propiedad común; son capaces de emitir y absorber radiación en el rango visible (380-750 nm). Para esto en su estructura molecular deben de tener un sistema conjugado de dobles enlaces C=C, es decir, un grupo cromóforo.

El color depende también de otros factores, como del grado de maduración. En frutos carotenogénicos como la sandía, a medida que el fruto madura, el contenido en clorofilas disminuye y se estimula la carotenogénesis dando lugar a un incremento del contenido de carotenoides (licopeno y β -caroteno), responsables de la coloración roja intensa de la sandía (Meléndez-Martínez *et al.*, 2010).

Otros aspectos que influyen en el desarrollo y contenido de los pigmentos son el clima, la región geográfica, la variedad y las condiciones de cosecha. La manipulación de estos productos vegetales influye en gran medida dando lugar a cambio en los procesos aún activos. Los procesos fisicoquímicos, enzimáticos y microbiológicos que pueden sufrir estos productos desde su recolección hasta el consumo pueden alterar el color en función del tiempo y condiciones de almacenamiento, transporte, etc. Los tratamientos industriales tanto durante la recolección como posterior a ella influyen en el desarrollo del color (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Rodríguez-Amaya, 1997; Thane y Reddy, 1997).

1.1.1. Sandía: color y carotenoides

La sandía, *Citrillus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai, es una planta herbácea de la familia de las cucurbitáceas de carácter cosmopolita. La evidencia indica que la sandía es nativa del trópico africano. Su cultivo comenzó por parte de los antiguos egipcios llegándose a extender vía mediterránea hasta Asia. Como resultado de su cultivo prolongado y selección, hoy en día contamos con diferentes variedades las cuales pueden tener la pulpa de color rojo, amarillo, naranja, blanco e incluso rosa. La parte comestible, y por tanto la que posee interés nutricional,

es la pulpa del fruto, y la composición de este varía en función del color de la pulpa, el cual depende del contenido en carotenoides (T. Féher, 1993).

El contenido total de carotenoides se encuentra entre <1 ppm (sandía de pulpa amarilla) y 15 ppm (sandía de pulpa roja). El porcentaje de carotenos también varía del 31% (pulpa amarilla) al 99% (pulpa roja), siendo contrarrestado por xantofilas. En las sandías de pulpa roja el principal pigmento es el licopeno, tal es la cantidad de dicho carotenoide que es el segundo alimento que más lo contiene, siendo el tomate el primero. También encontramos principalmente α - y β -carotenos. El porcentaje de xantofilas en sandías de pulpa roja es muy pequeño (aproximadamente un 3%), intermedio en sandías con pulpa naranja (7%) y mayoritario en las de pulpa amarilla. En la totalidad de la parte comestible de las sandías de pulpa amarilla además de xantofilas también se ha identificado β -caroteno, aunque en cantidades menores a las encontradas en las de pulpa roja, 0,5 ppm frente a 15 ppm (Fonseca *et al.*, 2009).

1.2. Biosíntesis de los carotenoides en plantas superiores

Debido a la variabilidad en la composición específica de los carotenoides y a la gran diversidad de especies que los sintetizan; la ruta, intermediarios y enzimas que intervienen en la síntesis varían dependiendo de la taxonomía.

Los carotenoides son tetraterpenos derivados de la condensación del precursor universal de terpenos, el isopentenil difosfato (IPP) con el dimetilalil difosfato (DMAPP). Existen dos vías de síntesis de ambos precursores, la vía del acetato malonato (MVA) y la vía no mevalónica (MEP) (Figura 2). Mientras la mayoría de los organismos carotenogénicos usan o la vía MVA o la MEP para sintetizar los precursores IPP y DMAPP, las plantas usan ambas vías. Los terpenos originados por cada ruta tienen diferentes destinos, siendo los carotenoides sintetizados predominantemente por precursores terpénicos generados por la vía MEP.

Tres moléculas de IPP y una de DMAPP se unen mediante condensación cabeza-cola para formar el terpeno de 20 carbonos, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), catalizada por la GGPP sintetasa (Figura 2).

La síntesis de fitoeno está considerada como el primer paso y el punto de control de la ruta de los carotenoides. El fitoeno es un terpeno de 40 átomos de carbono generado por la condensación simétrica de dos moléculas de GGPP, siendo esta reacción catalizada por la fitoeno sintetasa (PSY) (Moise *et al.*, 2014).

Se puede asumir que el fitoeno es clave de la actividad de los carotenos y xantofilas, ya que su desaturación conlleva la formación del cromatóforo (Ladygin, 2000).

La síntesis del licopeno a partir del fitoeno difiere dependiendo del organismo que la lleve a cabo, en plantas es generado por la ruta poly-cis. La ruta poly-cis involucra desaturaciones e

isomeraciones sucesivas llevadas a cabo por dos desaturasas, la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), y dos isomerasas, la 15-cis- ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y la caroteno trans-iso isomerasa (CRTISO). Las enzimas PDS, ZDS y CRTISO reconocen solo una mitad de la molécula, por lo que la secuencia de desaturaciones e isomerizaciones ocurre de manera independiente en cada mitad. La secuencia de enzimas es tal que así; Fitoeno \rightarrow PDS \rightarrow Fitoflueno \rightarrow PDS \rightarrow tri-cis- ζ -Caroteno \rightarrow Z-ISO \rightarrow di-cis- ζ -Caroteno \rightarrow ZDS \rightarrow Neurosporeno \rightarrow ZDS \rightarrow tetra-cis-Lycopeno \rightarrow CRTISO \rightarrow di-cis-Lycopeno \rightarrow CRTISO \rightarrow all-trans-Lycopeno (Moise *et al.*, 2014).

La elongación del sistema de dobles enlaces conjugados resulta en la transformación de precursores de carotenoides sin color en compuestos coloreados, empezando por el ζ -caroteno. (Solovchenko y Neverov, 2017).

La ciclación del licopeno representa una bifurcación en la ruta de la carotenogénesis para sintetizar por un lado carotenoides con anillos β y por otro con anillos ϵ . Cada extremo de la molécula de licopeno se puede ciclar dando lugar tanto a anillos β como a anillos ϵ . Del tipo de anillo y de sus sustituciones de este dependerá la función y destino del carotenoide.

Los carotenoides que contienen al menos un anillo β sin sustituir se consideran provitamina A y pueden ser fuentes de retinol, el cuál puede ser usado para generar moléculas señalizadoras como el ácido retinoico.

La familia de enzimas encargada de transformar el licopeno en los diferentes carotenos es la licopeno ciclasa (LCY). Los diferentes subtipos de LCY se categorizan en base al tipo de anillo que producen. Hay enzimas LCY que general anillos β (LCYB) o anillos ϵ (LCYE), y enzimas bifuncionales que pueden generar ambos anillos (LCYB/E). Las enzimas del tipo LCYB catalizan la ciclación de un extremo del licopeno para formar el γ -caroteno y posteriormente el otro extremo para sintetizar el β -caroteno. Las enzimas del tipo LCYE catalizan la ciclación de un anillo del licopeno para formar el δ -caroteno. Una posterior ciclación del extremo acíclico del δ -caroteno por la LCYB da lugar al α -caroteno.

La introducción de un de un grupo hidroxilo al anillo es una de las sustituciones más comunes en los carotenoides. La hidroxilación de los anillos en el C-3 es llevado a cabo por dos clases de enzimas, las no-hemo hidroxilasas (HYD) y por enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP97), y dan lugar a las xantofilas. La hidroxilación del α y del β -caroteno produce la luteína y la zeaxantina respectivamente. La doble hidroxilación del β -caroteno puede ser llevada a cabo tanto por la HYD como por la CYP47A sintetizando en primer lugar la β -criptoxantina y posteriormente la zeaxantina. Por el otro lado, las hidroxilaciones del α -caroteno es llevada a

cabo en primer lugar por la CYP97A para formar la zeinoxantina, la cual es transformada por la CYP47C para generar la luteína.

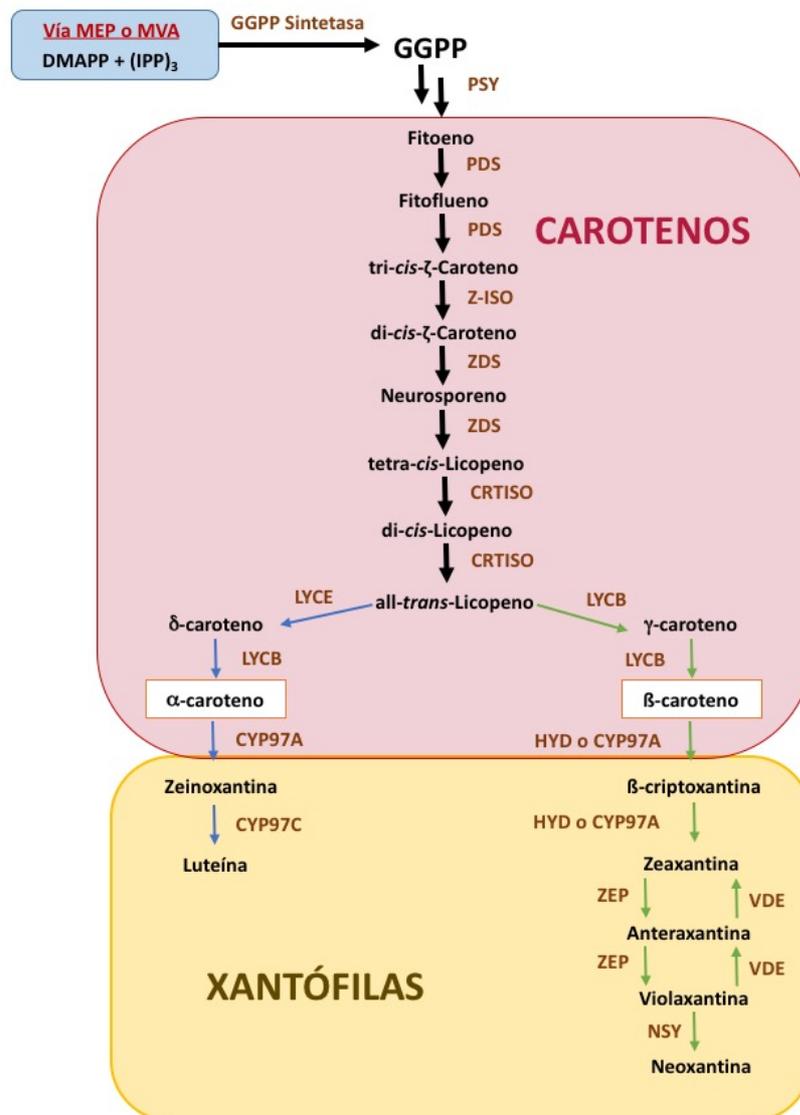


Figura 2. Esquema general de la síntesis de carotenoides.

Posteriormente la zeaxantina puede ser modificada por epoxidación en su anillo β en la posición 5-6 para producir anteraxantina y posteriormente violaxantina, mediante reacciones catalizadas por la zeaxantina epoxidasa (ZEP). Las reacciones contrarias son catalizadas por la enzima violaxantina desepoxidasa (VDE). La interconversión de la zeaxantina y violaxantina por las ZEP y VDE crea un ciclo xantofílico que tiene un importante papel en la regulación de la conversión de la energía fotosintética. La violaxantina es transformada a neoxantina por una reacción catalizada por la neoxantina sintetasa (NSY) (Moise *et al.*, 2014).

1.3. Actividad antioxidante de los carotenoides

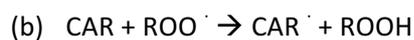
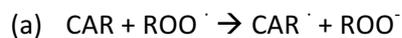
Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) son producidas durante el metabolismo aerobio, procesos patológicos y están involucradas en la etiología bioquímica de las enfermedades degenerativas (Stahl y Sies, 2005).

Una gran cantidad de factores como son el estrés psicológico, las toxinas, drogas, medicamentos, el tabaco y la obesidad pueden incrementar los valores de estrés oxidativo.

Es ampliamente reconocido que el exceso de ERO como las ERN y de radicales libres (RL) induce estrés oxidativo, el cuál no solo causa daños significativos a nivel de las estructuras y funciones celulares, si no que llegan más allá, causando disfunciones a nivel de órganos propiciando el desarrollo de diferentes patologías. La sobreproducción de ERO y ERN se regulan por medio de antioxidantes, ya sean enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) o no enzimáticos (flavonoides, polifenoles, carotenoides) (Wang *et al.*, 2016).

Es conocido que el estrés oxidativo juega un papel importante en parte de los desórdenes neurodegenerativos tales como el Alzheimer y el Parkinson.

El efecto beneficioso de los carotenoides procede fundamentalmente de su actividad antioxidante, es decir, de su capacidad de escindir EROS, oxígeno molecular (O₂) y radicales peroxilo (Stahl y Sies, 2005; Rao y Rao, 2007). Los carotenoides pueden escindir radicales de tres formas distintas; (a) formando parte de las reacciones redox, (b) interviniendo como atractor de hidrógenos y (c) mediante adicción:



La capacidad de los carotenoides de aceptar electrones de las especies reactivas y neutralizar los radicales libres procede del sistema de enlaces dobles conjugados. Además, se ha observado que los carotenoides pueden actuar también como prooxidantes bajo ciertas circunstancias. Esta propiedad ha sido determinada de manera *in vitro* y se observó este comportamiento con la suplementación excesiva de β -caroteno (Eichler *et al.*, 2002; Palozza, 1998).

El sistema de defensa antioxidante del ser humano es una red compleja que implica una gran cantidad de antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Según sugiere Böhm *et al.*, (1998), la interacción entre compuestos estructuralmente diferentes y con actividades antioxidantes variables proporciona una protección adicional frente al estrés oxidativo. Un ejemplo de esta actividad sinérgica es la que se observa entre el α -tocoferol y el β -caroteno, los cuales ven aumentada su ratio de inhibición de peroxidación lipídica en comparación con la suma de sus efectos cuando actúan de manera independiente (Stahl *et al.*, 1998).

1.4. El color: definición y medida

El color está definido como la respuesta neurológica producida al estimular la retina por una radiación lumínica visible. No se concibe como un concepto aislado, sino como un concepto psicofísico que se relaciona tanto con la psicología del observador, como con la fisiología propia de la visión y con la energía radiante espectral procedente de una fuente luminosa (Wyszecki y Stiles, 1982).

La sensación de color se produce por una serie de procesos tanto eléctricos como químicos que se traducen en impulsos nerviosos que son transmitidos a través del nervio óptico hasta donde se traduce la señal, el cerebro. Este proceso está mediado por la luz que alcanza la retina, es decir, por un estímulo cromático. Esto implica que el color no es una propiedad propia de los objetos que refleja o transmiten la radiación lumínica, sino que es una propiedad intrínseca de la luz.

A la hora de elegir el sistema de especificación de color, nos basamos en la recomendación de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) del año 1976, que avala el sistema internacional de especificaciones del color CIE 1976 ($L^* a^* b^*$) (CIELAB) debido a su uniformidad, exactitud y precisión, como el más conveniente para la determinación específica del color en la industria alimentaria.

El valor de L^* está definida como la coordenada que defina la claridad, la cuál toma valores entre 0 – que coincide con el negro – y 100 – que coincide con el blanco–. El resto de las coordenadas, a^* y b^* , definen un plano perpendicular a L^* . La primera de ellas, la coordenada a^* corresponde a la desviación del punto cero o acromático hacia el rojo si $a^* > 0$, y hacia el verde si $a^* < 0$. De igual manera, la coordenada b^* corresponde a la desviación en el eje perpendicular al formado por la coordenada a^* , hacia el amarillo si $b^* > 0$ y hacia el azul si $b^* < 0$ (Figura 3).

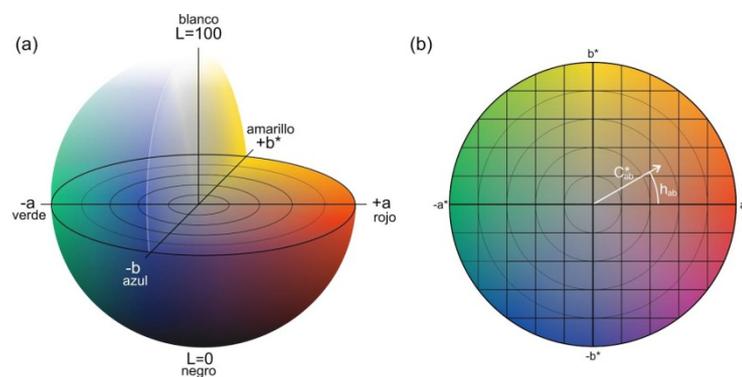


Figura 3. (a) Espacio de Color CIE 1976- $(L^*a^*b^*)$. **(b)** Vista del plano (a^*,b^*) mostrando las coordenadas polares C^*_{ab} y h_{ab} (Rodríguez-Pulido, F. J., 2013)

A partir de las coordenadas anteriores se definen dos magnitudes secundarias colorimétricas, el croma y el tono. El croma, C^*_{ab} , determina el grado de saturación respecto a un determinado color o tono. El valor 0 corresponde a los estímulos acromáticos y, por regla general, no suele tomar valores más allá de 150, aunque puede superar ese valor para algunas zonas del espacio. El tono, h_{ab} , es la propiedad cualitativa del color de un objeto (verde, rojo, etc.) y está definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Sus valores oscilan entre 0° y 360° , y para estímulos acromáticos, donde $a^*=0$ y $b^*=0$, se considera una magnitud no definida. Matemáticamente se determinan a partir de a^* y b^* según las siguientes fórmulas:

$$(1) C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$(2) h_{ab} = \arctg(b^*/a^*)$$

1.4.1. Medida del color

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. Dependen de numerosos factores como el observador y las condiciones de observación, la iluminación, el material de cata, etc. (Hita y Romero, 1981). El entrenamiento de jueces debe realizarse según las normas UNE establecidas (UNE 87 024-1:1995 y UNE 87 024-2:1996). La evaluación visual está relacionada principalmente con las preferencias de los consumidores, por lo que este tipo de metodología suele utilizarse para el desarrollo de nuevos productos, análisis de aceptabilidad, comparación con otros productos, estudios de vida útil, estudios de aceptabilidad y preferencia y estudios discriminativos y descriptivos (Carbonell *et al.*, 2007; Fernández-Vázquez *et al.*, 2012).

1.4.2. Análisis instrumental

La determinación objetiva del color por medio de la definición tricromática de esta propiedad física, se basa en la consideración de los estímulos coloreados como elementos diferentes dentro de un espacio pseudovectorial de tres dimensiones. Mediante la integración del espectro, y de acuerdo con las condiciones de referencia elegidas del iluminante y del

observador (CIE, 1991a; 1991b), se obtienen los componentes del vector o valores triestímulos, a partir de los cuales la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, 1986) define diferentes sistemas colorimétricos: espacios de color y diagramas cromáticos asociados. En ellos es posible la caracterización de los puntos de color y su interpretación mediante el cálculo de parámetros psicofísicos relacionados (tono, claridad y croma).

Las medidas instrumentales son sencillas, precisas y versátiles y además eliminan la subjetividad asociada a las medidas visuales. De igual forma que las medidas visuales, es necesario estandarizar las condiciones de la medida como la presentación de la muestra (igual volumen de muestra, recipiente que permita la agitación), el fondo y entorno circundantes en el que se presenta la muestra, el blanco de referencia con el que se calibra el equipo, etc. (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005; Meléndez-Martínez *et al.*, 2006)

Los instrumentos utilizados para las medidas instrumentales del color son 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. La utilización de una cámara digital calibrada bajo condiciones de iluminación determinadas permite al usuario el control de la medida del color y la captura de imágenes con gran precisión, incluso en 3 dimensiones. Un sistema de medida digital registra el color en miles, incluso millones, de puntos en la muestra: cada píxel se registra como una medida independiente de color. Esto proporciona una información mucho más detallada sobre el color de la muestra. Así, la imagen digital puede ser usada para medir no sólo el color medio, sino también la distribución de color dentro de la muestra. Con la digitalización se consiguen imágenes tan fiables que se corresponden perfectamente con el objeto original. Esta imagen puede, posteriormente, ser fácilmente procesada, duplicada o transmitida por vía electrónica.

Las ventajas que presenta esta metodología son:

- permite realizar medidas fiables y precisas de manera rápida, casi instantánea,
- obtención de imágenes de gran calidad, que reflejan la apariencia total del objeto, además del color.

Uno de los sistemas más utilizados es el sistema DigiEye (Luo *et al.*, 2001) que consta de una cámara digital Nikon D-80 conectada a una cámara de iluminación controlada (VeriVide DigiEye®, Leicester, Reino Unido) y a un ordenador con el software DigiPix (Figura 4). De igual manera que los otros métodos, las condiciones de medida deben estandarizarse, para lo cual se utiliza una cabina de iluminación controlada donde se simula iluminación difusa D65. Además, la cámara debe ser calibrada a partir de una carta de color estándar (Gretag Macbeth Colour

Checker DC Chart) con el fin de caracterizar la respuesta relacionando sus señales RGB con las especificaciones CIE bajo las condiciones de iluminación fijadas (Figura 4). De cada imagen se obtienen los valores RGB para cada píxel, a partir de los cuales se debe realizar una transformación desde el espacio de color RGB a los espacios recomendados por la CIE (CIELAB).



Figura 4. Sistema DigiEye y carta de color estándar para calibración.

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido caracterizar en muestras de distintas variedades de sandía con diferente coloración:

- El perfil y el contenido de carotenoides
- La actividad antioxidante por métodos *in vitro*
- El color mediante digitalización de imagen

3. Metodología

3.1. Elección de las muestras

Se eligieron dos variedades de sandía - *Citrillus lanatus* (Tunb.) Matsum. & Nakai -, una variedad con la pulpa roja, y otra variedad con la pulpa amarilla, de las que se desconocen su procedencia y subespecie. Un total de 6 muestras fueron adquiridas en supermercados locales, 3 de cada variedad.

3.2. Toma de muestras

De cada muestra se seleccionaron distintas zonas para su análisis. Las zonas elegidas para extraer el perfil de carotenoides han sido el corazón (H), lóculo (L), mesocarpio (B) y epicarpio (C) (Figura 5). Para las zonas B, C y L se usaron triplicados procedentes de una misma sandía, tanto de la roja como de la amarilla. Para la zona H, debido a su importancia nutricional se muestrearon 3 sandías diferentes (3 rojas y 3 amarillas) de las cuales se tomaron triplicados.

Las muestras fueron liofilizadas, micronizadas y almacenadas a -20 °C, en atmósfera de nitrógeno y en ausencia de luz para su posterior extracción.

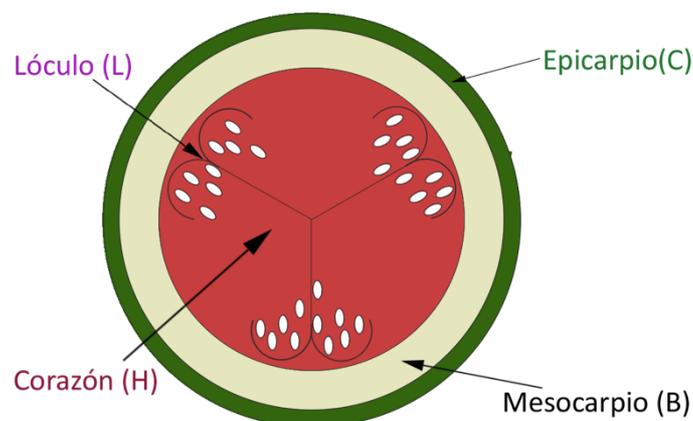


Figura 5. Ilustración de corte de sandía y de las zonas muestreadas.

3.3. Determinación del contenido de carotenoides

Material

Instrumentación

- Centrifuga
- Vortex
- Baño de Ultrasonido
- Concentrador

Reactivos

- Triclorometano
- Metanol
- Agua destilada
- Hexano: Acetona 1:1
- Diclorometano
- Éter dietílico
- Solución de Cloruro de Sodio al 5% p/v

3.3.1. Extracción de carotenoides de Sandía Roja

Para la determinación del perfil de carotenoides se siguió la metodología descrita por Fraser y Bramley (2004) con modificaciones (Stinco *et al.*, 2013).

Procedimiento analítico

- Microextracción

Se pesan 200 mg de sandía liofilizada a los cuales se le adiciona 250 μ L de metanol y se agita en el vortex, posteriormente se añade 600 μ L de triclorometano y 300 μ L de agua. La mezcla se agita en el vortex y se sumerge en un baño de ultrasonidos durante varios minutos con el objetivo de mejorar la extracción. Las fases se separan por centrifugación a 14.000 rpm, durante 5 min a 4 °C. Las siguientes extracciones se realizan por adicción de 500 μ L de triclorometano. Se realizan extracciones hasta agotamiento del color. Las fases coloreadas se juntan y se evaporan hasta sequedad en el concentrado bajo vacío a una temperatura de 30°C. Los extractos secos se conservan a -20°C en atmosfera de nitrógeno y en ausencia de luz.

En el caso de las muestras de la cáscara y de la zona blanca el proceso de extracción varía debido a la baja densidad de la muestra por lo que flota en los disolventes, para solventar este problema la primera extracción se realiza con la mezcla de metanol, triclorometano y agua, y la segunda con 2 ml de agua y 2 ml de éter dietílico y las sucesivas con 1 ml de éter dietílico.

3.3.2. Extracción de carotenoides de Sandía Amarilla

Para la determinación del perfil de carotenoides se siguió la metodología descrita por Stinco *et al.* (2014).

Procedimiento analítico

- Microextracción

Se pesan 500 mg de sandía liofilizada a los que se le adiciona 2 ml de una mezcla de Hexano: Acetona 1:1. La mezcla se agita en el vortex y se sumerge en un baño de ultrasonidos durante varios minutos con el objetivo de mejorar la extracción. Las fases se separan por centrifugación a 14.000 rpm, durante 5 min a 4 °C. Las siguientes extracciones se realizan por adición de 1 ml de una mezcla de Hexano: Acetona 1:1. Se realizan extracciones hasta agotamiento del color. Las fases coloreadas se juntan y se evaporan hasta sequedad en el concentrado bajo vacío a una temperatura de 30°C. Los extractos secos se conservan a -20°C en atmosfera de nitrógeno y en ausencia de luz.

- Saponificación

El proceso de saponificación es necesario por la presencia de xantofilas esterificadas y de sustancias que podrían interferir en el análisis. La saponificación se realiza directamente en el eppendorf. Se le añade 650 µL de diclorometano y 650 µL de potasa metanólica al 20 % y se mantiene en agitación durante una hora en ausencia de luz. El primer lavado se realiza con 500 µL de Cloruro sódico al 5 %, se agita suavemente y se centrifuga a 14000 rpm, durante 4 min a 4°C. Los sucesivos lavados se realizan con 500 µL de agua. Se continúa lavando hasta alcanzar un pH neutro. Las fases coloreadas se evaporan hasta sequedad en el concentrador bajo vacío a una temperatura de 30°C. Los extractos secos se conservan a -20°C en atmosfera de nitrógeno y en ausencia de luz.

3.4. Análisis cromatográfico

Los extractos de carotenoides fueron analizados por cromatografía líquida de rápida resolución (RPLC) en 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 x 4 mm). Esta columna es muy eficiente para la separación de isómeros geométricos de carotenoides, debido a que la separación depende tanto de la planaridad como de la forma de los mismos (Breitenbach *et al.*, 2001; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007; Sander *et al.*, 2000). Los disolventes utilizados en la fase móvil fueron: Fase A: Metanol (MeOH), Fase B: Metil-t-butil éter (MTBE) y Fase C: Agua MilliQ

El gradiente de elución utilizado fue el siguiente:

Tabla 1. Gradiente de elución

| Tiempo (min) | Mezcla de eluyentes |
|--------------|---------------------------------------|
| 0 | 90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua |
| 5 | 95% de MeOH + 5% de MTBE |
| 10 | 89% de MeOH + 11% de MTBE |
| 16 | 75% de MeOH + 25% de MTBE |
| 20 | 40% de MeOH + 60% de MTBE |
| 22,5 | 15% de MeOH + 85% de MTBE |
| 25 | 90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua |
| 28 | 90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua |

El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el volumen de inyección según la Tabla 1. Las longitudes de onda seleccionadas fueron 285, 350, 410, 450 y 472 nm usando el software Openlab. La temperatura de columna se mantuvo a 20 °C. Cada día, al finalizar los análisis, la columna se limpió con MTBE: MeOH (50:50) durante 20 minutos.

Material

Aparatos e instrumentación:

- Cromatógrafo líquido Agilent Technologies HP 1260, equipado con:
 - Bomba cuaternaria.
 - Desgasificador de vacío.
 - Compartimento termostatzado para columna.
 - Inyector automático.
 - 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.

Reactivos

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

Procedimiento analítico

Inyección

Los extractos se redisuelven en los µL de acetato de etilo indicados (Tabla 2) 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 RPLC.

Tabla 2. Relación del peso de muestra, volumen de disolución y volumen de inyección

| Nombre | Peso muestra (g) | Vol. Disol (μL) | Vol. Inyect (μL) | Nombre | Peso muestra (g) | Vol. Disol (μL) | Vol. Inyect (μL) |
|--------|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------|------------------|------------------------------|-------------------------------|
| RHA-1 | 0,2166 | 50 | 5 | AHA-1 | 0,5054 | 100 | 5 |
| RHA-2 | 0,2017 | 50 | 5 | AHA-2 | 0,5092 | 100 | 5 |
| RHA-3 | 0,2112 | 50 | 5 | AHA-3 | 0,5106 | 100 | 5 |
| RHB-1 | 0,2036 | 50 | 5 | AHB-1 | 0,5069 | 100 | 5 |
| RHB-2 | 0,2043 | 50 | 5 | AHB-2 | 0,5001 | 100 | 5 |
| RHB-3 | 0,2070 | 50 | 5 | AHB-3 | 0,5107 | 100 | 5 |
| RHC-1 | 0,2070 | 100 | 2 | AHC-1 | 0,5132 | 100 | 5 |
| RHC-2 | 0,2039 | 100 | 2 | AHC-2 | 0,5129 | 100 | 5 |
| RHC-3 | 0,2081 | 100 | 2 | AHC-3 | 0,5054 | 100 | 5 |
| RL-1 | 0,2088 | 100 | 5 | AB-1 | 0,5023 | 100 | 5 |
| RL-2 | 0,2096 | 100 | 5 | AB-2 | 0,5014 | 100 | 5 |
| RL-3 | 0,2006 | 100 | 5 | AB-3 | 0,5012 | 100 | 5 |
| RB-1 | 0,2100 | 100 | 5 | AL-1 | 0,5148 | 100 | 5 |
| RB-2 | 0,2076 | 100 | 5 | AL-2 | 0,5054 | 100 | 5 |
| RB-3 | 0,2011 | 100 | 5 | AL-3 | 0,5000 | 100 | 5 |
| RC-1 | 0,2021 | 100 | 2 | AC-1 | 0,4999 | 100 | 2 |
| RC-2 | 0,2059 | 100 | 2 | AC-2 | 0,5072 | 100 | 2 |
| RC-3 | 0,2055 | 100 | 2 | AC-3 | 0,5055 | 100 | 2 |

Identificación de los carotenoides.

La identificación de los carotenoides presentes en las muestras analizadas 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). Además, se utilizaron diversos índices como:

- $\%III/II$: que se define como la relación entre la altura de la tercera banda de absorción (III) y la de la segunda (II), considerando como línea base el mínimo entre ambas bandas, multiplicado por 100 (Britton *et al.*, 1995) (Figura 6).

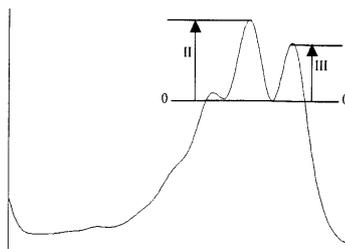


Figura 6. Representación esquemática del cálculo de $\%III/II$.

- Q ratio: cociente entre la banda del "pico *cis*" del espectro y la banda II (normalmente $\lambda_{\text{máx}}$). Se ha utilizado para identificar tentativamente los diferentes isómeros *cis*.

Cuantificación de los carotenoides

Las concentraciones de los carotenoides en las muestras analizadas se determinaron mediante una calibración externa con curvas de calibrado construidas con sus correspondientes

patrones (estándares comercialmente disponibles o estándares aislados a partir de diversas fuentes en nuestro laboratorio (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.5. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la fracción lipofílica de las muestras de sandía estudiadas se determinó en los extractos obtenidos para la determinación de carotenoides. El método utilizado fue el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay) que se basa en la captación del radical catión ABTS^{•+} generado en el medio de reacción frente a un antioxidante, lo que produce la caída de absorbancia medida a 734 nm (Re *et al.*, 1999). La diferencia entre las medidas de absorbancia inicial y final debida a la reducción experimentada por el compuesto, proporciona de manera indirecta, la actividad antioxidante *in vitro* de la sustancia reductora.

Material

Aparatos e instrumentación:

- Espectrofotómetro de diodos UV-Visible
- Cubetas de plástico de volumen reducido y de 1 cm de paso de luz.

Reactivos

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- Persulfato de Potasio
- Acetato de etilo
- Etanol

Soluciones

- Solución stock de ABTS 7 mM en agua: se disuelven 0.0384 g de ABTS y se lleva a 10 ml con agua.
- Solución de stock del radical ABTS (ABTS^{•+}): se produce al reaccionar la solución ABTS stock con persulfato de potasio de concentración 2.45 mM (0.662 mg/ml solución). Esta solución se almacena a temperatura ambiente y al abrigo de la luz durante 10-16 horas para conseguir la formación completa del radical. Es estable en oscuridad por dos días.
- Soluciones de trabajo ABTS. Se preparan por dilución de la solución stock del radical con etanol, tal que la absorbancia a 734 nm sea 0.70±0.02 a 30°C.
- Solución madre de Trolox en etanol (2.5mM) (0.626 mg trolox/ ml solución)
- Soluciones de trabajo: se preparan diariamente 5 soluciones (1.25, 1, 0.75, 0.5, 0.25 mM) a partir de la solución madre de Trolox en etanol.
- Solución de muestra: se resuspenden los extractos de carotenoides dependiendo la zona y variedad (Tabla 3)

Tabla 3. Volúmenes de diluyente en función de la variedad y zona de la muestra

| Variedad | Volúmenes de acetato de etilo (μ L) | | | |
|-----------------|--|---------|---------|---------|
| | Blanco | Cáscara | Corazon | Lateral |
| Sandía Roja | 90 | 90 | 180 | 180 |
| Sandía Amarilla | 90 | 90 | 90 | 90 |

Procedimiento analítico

Recta de calibrado

La recta de calibrado se realiza con las disoluciones de trabajo de Trolox. Se adiciona 1 mL de la solución del radical ABTS en cubetas de plástico y se mide la absorbancia a tiempo 0. Posteriormente se adiciona 10 μ L de cada disolución patrón de Trolox, se agita y se incuba a 30°C. Después de 6 minutos, se mide la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro. Se determina el porcentaje de inhibición según la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta \text{Inhibición} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=t})}{\text{Abs}_{t=0}}$$

Donde:

$\text{Abs}_{t=0}$ es la absorbancia a tiempo inicial (previa adición del patrón)

$\text{Abs}_{t=t}$ es la absorbancia obtenida al tiempo fijado de lectura.

Con los valores del Δ Inhibición y las concentraciones de Trolox obtenidos se realiza la recta de calibrado.

Determinación de la actividad antioxidante de las muestras

Se adiciona 1 mL de la solución del radical ABTS y se mide la absorbancia a tiempo 0. Posteriormente se adicionaron 5 μ L y 15 μ L del extracto obtenido para la determinación de carotenoides y se agita, este proceso se realiza por triplicado para ambos volúmenes. Después de 6 minutos, se mide la absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro. Con los valores del Δ Inhibición obtenidos y los volúmenes de muestra utilizados se realiza la recta de cada muestra.

Cálculos

La actividad antioxidante en equivalente de Trolox (TEAC) fue calculada dividiendo la pendiente de la curva de muestra y la pendiente de la curva de Trolox estándar, teniendo en cuenta la el volumen de extracto y el peso de muestra utilizado en la extracción de carotenoides. La actividad antioxidante se expresa en milimoles de Trolox equivalentes por gramo de sandía.

3.6. Análisis del color

La adquisición de las imágenes se realizó 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. Para este tipo de mediciones, las muestras fueron iluminadas por un simulador de iluminación difusa D65. La cámara fue calibrada 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 bajo las condiciones de iluminación fijadas. Para la obtención de los parámetros de color es necesario realizar la transformación desde el espacio de color RGB a los espacios recomendados por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE). Esta transformación no es directa y se necesita una calibración que depende entre otros factores, de la iluminación al capturar las imágenes (León *et al.*, 2006). A partir de cada imagen se obtienen los parámetros CIELAB usando el software DigiFood® (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005)

Material

Aparatos e instrumentación:

Sistema Digieye:

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

Procedimiento analítico

Para las mediciones de color, las diferentes sandías fueron cortadas en dos mitades y los epicarpios en diferentes trozos representativos del color. A continuación, se colocan 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 DigiFood® a partir del cual se obtienen los parámetros colorimétricos.

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico básico se llevó a cabo con el software InfoStat. Los resultados se procesaron para obtener la media y la desviación estándar, así como el análisis de la varianza junto con la prueba de Tukey para obtener las diferencias significativas. Además, se han explorado correlaciones, tanto lineales como múltiples, entre los parámetros químicos y colorimétricos de los corazones de ambas variedades.

4. Resultados y discusión

Perfil de carotenoides en las distintas partes de la sandía

La identificación de los distintos carotenoides se realizó a partir de los cromatogramas (Figura 7) de las diferentes muestras, por comparación con patrones. Para ello, se consideraron el tiempo de retención, el espectro de absorción y la longitud de onda máxima de absorción de cada compuesto (Tabla 4). Una vez identificados los compuestos, se integró cada pico, obteniéndose el área (AUC), a partir de la cual se calcula la concentración mediante interpolación en rectas obtenidas de patrones.

Tabla 4. Longitud de onda de los compuestos identificados que corresponde con su máximo de absorción

| Compuestos | λ (nm) |
|---------------------|----------------|
| β -caroteno | 450 |
| Lycopeno | 472 |
| Luteína | 450 |
| Fitoeno | 285 |
| Fitoflueno | 350 |
| Neoxantina | 450 |
| Violaxantina | 450 |
| Zeaxantina | 450 |
| ζ -caroteno | 450 |
| α -tocoferol | 410 |
| Clorofila A | 285 |
| Clorofila B | 450 |
| Feofitina B | 250 |
| Feofitina A | 450 |
| Feofitina A | 410 |

Para calcular el contenido expresado como μg de compuesto por cada gramo de muestra liofilizada se tuvo en cuenta el volumen de inyección, el volumen de disolución del extracto orgánico y el peso de muestra (Tabla 2).

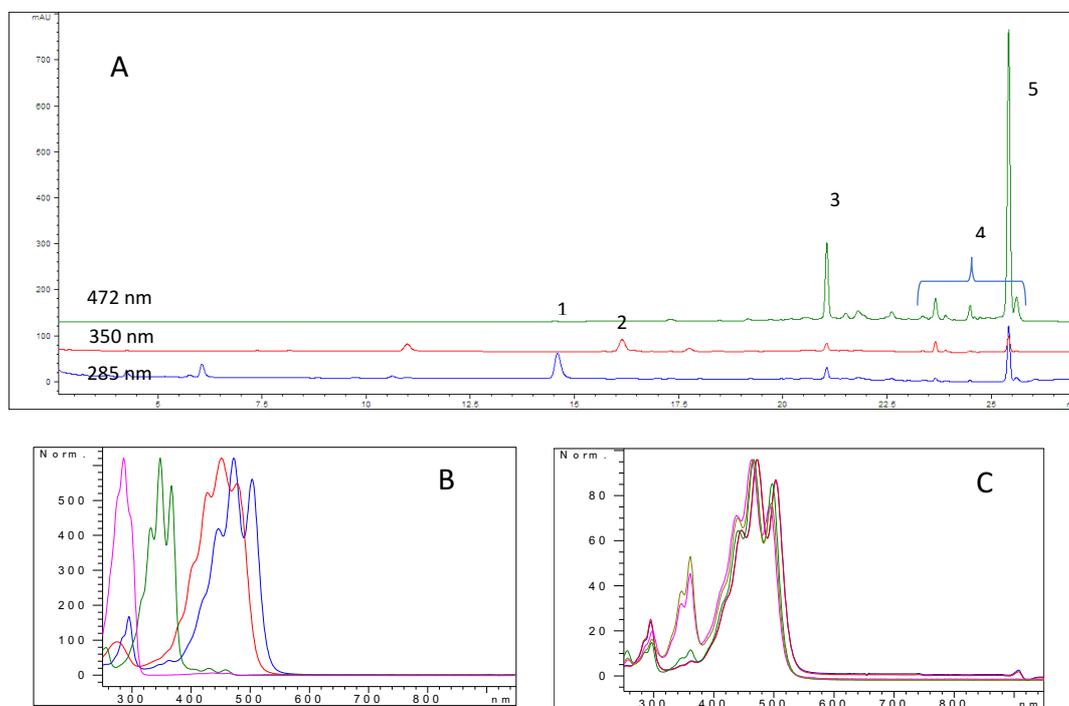


Figura 7. A- Cromatograma de una muestra de corazón de sandía roja a 285, 350, 472 nm. B- Espectros de absorción de los compuestos identificados. C- Espectros de absorción de los isómeros del licopeno. 1

Fitoeno (fucsia), 2 Fitoflueno (verde), 3 β -caroteno (rojo), 4 Isómeros de licopeno, 5 *trans*-licopeno (azul).

La figura 7 muestra un cromatograma del corazón de la sandía roja. Los carotenoides identificados fueron fitoeno, fitoflueno, β -caroteno, varios isómeros del *cis*-licopeno, *trans*-licopeno y ζ -caroteno. En el caso de la sandía amarilla los principales carotenoides identificados fueron luteína, fitoeno, violaxantina, β -caroteno y un isómero de este, además se identificó y cuantificó el α -tocoferol por su relación con la actividad antioxidante (Figura 8).

En los epicarpios el único carotenoide presente en ambas variedades fue la luteína, siendo este el único identificado en la sandía roja, y el α -tocoferol. En la sandía amarilla encontramos, además, dos isómeros del β -caroteno, violaxantina y neoxantina. Además del α -tocoferol, se identificaron y cuantificaron clorofilas en la sandía amarilla, y sus derivados (feofitinas) en la sandía roja, ya que son los pigmentos responsables del color verde del epicarpio.

En el mesocarpio se identificaron luteína y feofitina A en la sandía roja, y en la amarilla además se identificaron feofitina B-1, clorofila A y α -tocoferol.

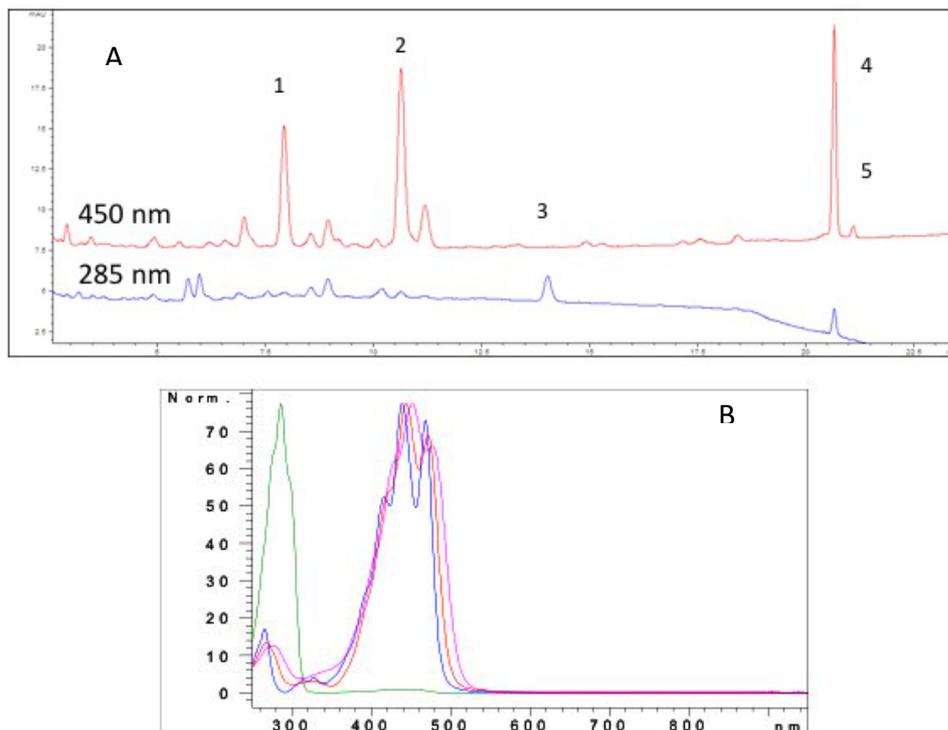


Figura .8 A- Cromatograma de una muestra de corazón de sandía amarilla a 285 y 450 nm. B- Máximos de absorción de los diferentes compuestos. 1- Violaxantina 2- Luteína 3- Fitoeno 4- β -caroteno 5- Isómero β -caroteno.

En los lóculos de ambas variedades encontramos β -caroteno y varios isómeros de fitoeno, de fitoflueno y ζ -caroteno. Por parte de la sandía amarilla identificamos además luteína,

violaxantina y α -tocoferol, y en su homóloga roja encontramos distintos isómeros, tanto *cis* como *trans*- del licopeno.

Como puede observarse los perfiles son distintos en términos cualitativos y cuantitativos, como podremos comprobar más adelante.

Contenido de carotenoides y actividad antioxidante en el epicarpio (cáscara)

La tabla 5 muestra los contenidos medios de carotenoides y actividad antioxidante en las muestras de epicarpios de las dos variedades analizadas y los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($p < 0.05$). Además, se identificó y cuantificó el α -tocoferol y clorofila A y B y derivados de estas (feofitinas).

Tabla 5. Cantidad de compuestos aislados en las zonas del epicarpio expresados en μg por gramo de muestra liofilizada.

| Epicarpio | | | |
|------------------------|-------------------|--------------------|---------|
| Composición | Roja | Amarilla | Dif SIG |
| β -caroteno | - | 11,98 \pm 2,40 | - |
| Iso- β -caroteno | - | 1,66 \pm 0,32 | - |
| Luteína | 44,60 \pm 0,62 | 31,97 \pm 4,44 | - |
| Violaxantina | - | 2,63 \pm 0,30 | - |
| Neoxantina | - | 5,35 \pm 0,48 | - |
| Feofitina A | 231,82 \pm 1,42 | - | - |
| Feofitina B-1 | 7,50 \pm 0,11 | - | - |
| Feofitina B-2 | 7,85 \pm 0,80 | - | - |
| Feofitina B-3 | 36,82 \pm 4,73 | - | - |
| Clorofila A | - | 391,95 \pm 25,48 | - |
| Clorofila B | - | 198,76 \pm 14,68 | - |
| α -tocoferol | 81,63 \pm 7,93 | 50,91 \pm 21,37 | - |
| Σ Carotenoides | 44,60 \pm 0,62 | 53,59 \pm 7,93 | - |
| Σ Clorofilas | 284,02 \pm 6,81 | 673,59 \pm 65,96 | * |
| TEAC | 0,16 \pm 0,16 | - | - |

*diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos mostraron que los principales compuestos encontrados en el epicarpio de sandía roja fueron feofitina A y en menor medida feofitina B, α -tocoferol y luteína, siendo este el único carotenoide (xantofila) identificado en el epicarpio de sandía roja.

Por otro lado, en la sandía amarilla encontramos principalmente clorofilas y en menor cantidad α -tocoferol y carotenoides como el β -caroteno e isómero, violaxantina, neoxantina y luteína, siendo este último el que se ha cuantificado en mayor cantidad.

Cabe destacar que no existieron diferencias significativas entre los valores individuales de los compuestos que comparten ambas variedades, pero si existe entre las cantidades totales de clorofilas y entre los perfiles. Unos datos a tener en cuenta es la diferencia de clorofilas, así, en la sandía amarilla solo encontramos clorofilas A y B, mientras que en la sandía roja todo el

computo de clorofilas procede de la feofitina A y B. Este hecho se puede deber a que en la sandía roja las clorofilas como tal se han degradado a feofitina, ya sea por la idiosincrasia de la variedad o por la madurez de la sandía muestreada.

Los resultados obtenidos mediante la técnica TEAC para evaluar la actividad antioxidante de algunas muestras de sandía amarilla no se han presentado en la tabla 5, ya que la presencia de clorofilas interfirió en las medidas de absorción en las que se basa el método y los resultados obtenidos no fueron coherentes. Tras detectar el problema y centrifugar las muestras restantes, fue posible obtener dos medidas procedentes de la sandía roja, las cuales no son representativas, pero se han incluido en la tabla para dejar constancia de que el epicarpio si tiene actividad antioxidante, aunque no se pueda cuantificar por este método.

Contenido de carotenoides y actividad antioxidante en el mesocarpio (blanco)

La siguiente zona analizada fue el mesocarpio, fácilmente reconocible por ser una zona blanquecina comprendida entre la cáscara y la zona comestible.

La tabla 6 muestra los contenidos medios y desviación estándar de los compuestos identificados en las dos variedades analizadas y los resultados del análisis estadístico de la variación (ANOVA).

Tabla 6. Cantidad de compuestos aislados en las zonas del mesocarpio (blanco) expresados en μg por gramo de muestra liofilizada.

| Compuesto | Mesocarpio | | Dif SIG |
|-----------------------|------------------|------------------|---------|
| | Roja | Amarilla | |
| α -tocoferol | - | 5,06 \pm 0,84 | - |
| Luteína | 4,39 \pm 1,22 | 1,93 \pm 0,20 | * |
| Feofitina A | 27,04 \pm 1,40 | 9,96 \pm 1,46 | * |
| Feofitina B-1 | - | 1,16 \pm 0,18 | - |
| Clorofila A | - | 8,29 \pm 1,97 | - |
| Σ Carotenoides | 4,39 \pm 1,22 | 1,93 \pm 0,20 | * |
| Σ Clorofilas | 27,04 \pm 1,39 | 19,41 \pm 3,51 | * |
| TEAC | 0,12 \pm 0,06 | 0,02 \pm 0,01 | - |

*diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la sandía roja solo encontramos feofitina A como representante de las clorofilas, y a la luteína por parte de los carotenoides, mientras que en la amarilla además de clorofilas (clorofila A y sus derivados, feofitinas A y B) y de carotenoides (luteína) encontramos α -tocoferol, aunque en cantidades mucho más bajas que las encontradas en la cáscara.

En este caso, en los compuestos comunes a las dos variedades (feofitina A y luteína) si se presentan diferencias cuantitativas significativas, al igual que ocurre con el contenido total de carotenoides y clorofilas.

En cuanto a la actividad antioxidante observamos que las dos variedades presentan actividad antioxidante, en el caso de la sandía roja el valor medio es mayor que el observado en la sandía amarilla, pero debido a la desviación de los datos estos no son significativamente diferentes.

Contenido de carotenoides y actividad antioxidante en el Lóculo

El lóculo hace referencia a la zona placentaria que se comprende entre los carpelos. Es una zona de gran interés por formar parte de la denominada zona comestible, que al fin y al cabo es la que más importancia tiene.

La tabla 7 muestra los contenidos medios y desviación estándar de compuestos identificados y actividad antioxidante en las muestras de lóculo de las dos variedades analizadas y los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($p < 0.05$).

Los resultados mostraron que en esta zona de la sandía encontramos más diversidad tanto de carotenos como de xantofilas.

Tabla 7. Cantidad de compuestos aislados en las zonas del lóculo expresados en μg por gramo de muestra liofilizada

| Compuesto | Lóculo | | |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|---------|
| | Roja | Amarilla | Dif SIG |
| Σ Fitoeno | 6,08 \pm 2,49 | 0,21 | - |
| Σ Fitoflueno | 4,80 \pm 2,19 | 0,32 | - |
| Σ ζ -caroteno | 2,29 \pm 0,70 | 0,092 | - |
| β -caroteno | 1,58 \pm 0,60 | 0,09 \pm 0,03 | * |
| Σ <i>cis</i> -licopeno | 6,82 \pm 3,11 | - | - |
| <i>trans</i> -licopeno | 33,66 \pm 9,19 | - | - |
| 5- <i>cis</i> -licopeno | 7,96 \pm 0,76 | - | - |
| Luteína | - | 0,85 \pm 0,10 | - |
| Violaxantina | - | 0,06 \pm 0,02 | - |
| α -tocoferol | - | 2,03 \pm 1,30 | - |
| Σ Carotenoides | 63,18 \pm 14,54 | 1,20 \pm 0,48 | * |
| TEAC | 0,50 \pm 0,14 | 0,05 \pm 0,03 | * |

*diferencias significativas ($p < 0.05$)

En ambas variedades se identificaron numerosos isómeros *cis* de: fitoeno (2 isómeros), fitoflueno (3 isómeros), ζ -caroteno (3 isómeros) y licopeno (5 isómeros), este último solo se ha identificado en la variedad roja. Para simplificar las tablas se han expresado como sumatorio de todos sus isómeros identificados.

El contenido total de carotenoides fue 60 veces mayor en la sandía roja. Entre ellos aparecen carotenoides incoloros como el fitoeno y fitoflueno, ζ -caroteno, β -caroteno, *cis*-licopeno, 5-*cis*-licopeno y mayoritariamente *trans*-licopeno, el cual supone el 53% del total de carotenoides.

Por otro lado, en la sandía amarilla encontramos precursores de la vía de los carotenoides (solo fueron identificados en una de las tres muestras), ζ -caroteno y β -caroteno en cantidades menores en las encontradas en las sandía roja y xantofilas como la violaxantina y la luteína, siendo esta última el principal carotenoide suponiendo el 50% del total. Además, encontramos α -tocoferol, aunque en cantidades más bajas que las encontradas en la cáscara.

Destacar que solo aparecen diferencias significativas entre las cantidades individuales en el caso del β -caroteno. También existe en el sumatorio de carotenoides y en la actividad antioxidante.

En lo referente a la actividad antioxidante, la sandía roja tiene un valor de TEAC 10 veces mayor al obtenido en la sandía amarilla, lo que concuerda con su mayor contenido en carotenoides.

Contenido de carotenoides y actividad antioxidante en el corazón

El corazón al igual que el lóculo forma parte de la zona comestible y es donde probablemente la concentración de carotenoides es mayor, por su mayor coloración, y es la que presenta mayor interés desde el punto de vista nutricional, por lo que se eligieron 3 sandías y se muestrearon por triplicado. La tabla 8 muestra los niveles medios y desviación estándar de los compuestos identificados en la variedad roja y el resultado del análisis de la varianza (ANOVA).

Tabla 8. Cantidad de compuestos aislados el corazón de sandía roja expresados en μg por gramo de muestra liofilizada

| Corazón Sandía Roja | | | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Compuesto | RHA | RHB | RHC |
| Σ Fitoeno | 3,09 \pm 3,98 a | 7,39 \pm 4,41 a | 21,94 \pm 4,08 b |
| Σ Fitoflueno | 5,38 \pm 0,80 a | 5,79 \pm 3,33 a | 15,84 \pm 6,06 a |
| Σ ζ -caroteno | 1,15 \pm 0,07 a | 2,06 \pm 1,26 a | 6,73 \pm 6,55 a |
| β -caroteno | 5,56 \pm 0,55 a | 4,48 \pm 2,66 a | 6,36 \pm 1,67 a |
| Σ <i>cis</i> -licopeno | 12,48 \pm 0,41 a | 11,68 \pm 0,51 a | 25,50 \pm 12,93 a |
| <i>trans</i> -licopeno | 23,88 \pm 3,30 a | 35,32 \pm 27,57 a | 63,32 \pm 12,27 a |
| 5- <i>cis</i> -licopeno | 4,78 \pm 0,05 a | 4,50 \pm 1,20 a | 17,56 \pm 0,54 b |
| Σ Carotenoides | 56,31 \pm 1,18 a | 71,23 \pm 32,57 a | 157,26 \pm 33,59 b |
| TEAC | 0,33 \pm 0,13 a | 0,86 \pm 0,09 b | 0,46 \pm 0,18 a b |

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los resultados mostraron que en el caso de las sandías rojas solo se encontraron diferencias significativas entre muestras en el 5-*cis*-licopeno, el sumatorio de fitoeno, y el contenido total

de carotenoides de las sandías A y B con respecto a la C, y en el valor del TEAC entre las sandías A con respecto a B y C. Estas diferencias se pueden deber al diferente grado de madurez de las sandías analizadas.

En el caso de las variedad amarilla, la tabla 9 muestra los contenidos medios y desviación estándar de los compuestos identificados y de la actividad antioxidante y los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($p < 0.005$).

Tabla 9. Cantidad de compuestos aislados en el corazón de sandía amarilla expresados en μg por gramo de muestra liofilizada.

| Corazón Sandía Amarilla | | | |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Compuesto | AHA | AHB | AHC |
| Σ Fitoeno | - | 0,08 \pm 0,07 a | 0,21 \pm 0,25 a |
| β -caroteno | 0,10 \pm 0,04 a | 0,38 \pm 0,02 b | 0,19 \pm 0,06 a |
| Luteína | 1,57 \pm 0,49 a | 1,27 \pm 0,09 a | 0,93 \pm 0,13 a |
| Violaxantina | 1,44 \pm 0,45 a | 0,08 \pm 0,08 b | - |
| Σ Carotenoides | 3,11 \pm 0,97 a | 1,78 \pm 0,11 a | 1,26 \pm 0,39 b |
| TEAC | 0,06 \pm 0,04 a | 0,04 \pm 0,02 a | 0,02 \pm 0,00 a |

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Según los resultados obtenidos, podemos apreciar que existen diferencias significativas en la cantidad de β -caroteno entre las sandías A y C con respecto a B, de violaxantina entre las sandías A y B, y del contenido de carotenoides totales entre las sandías A y B frente a C. Se observa una tendencia en los resultados de la cantidad de carotenoides totales y la actividad antioxidante, de manera que a más cantidad de carotenoides mayor es la actividad antioxidante de la muestra.

Con el fin de establecer diferencias significativas entre variedades rojas y amarilla se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Cantidad de compuestos aislados en las zonas del corazón expresados en μg por gramo de muestra liofilizada

| Corazón | | | |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|---------|
| Compuesto | Roja | Amarilla | Dif SIG |
| Σ Fitoeno | 13,42 \pm 8,71 | 0,13 \pm 0,15 | * |
| Σ Fitoflueno | 10,49 \pm 6,23 | - | - |
| Σ ζ -caroteno | 3,58 \pm 4,43 | - | - |
| β -caroteno | 5,45 \pm 1,90 | 0,22 \pm 0,13 | * |
| Σ <i>cis</i> -licopeno | 17,06 \pm 9,84 | - | - |
| <i>trans</i> -licopeno | 42,96 \pm 23,85 | - | - |
| 5- <i>cis</i> -licopeno | 9,50 \pm 6,74 | - | - |
| Luteína | - | 1,26 \pm 0,38 | - |
| Violaxantina | - | 0,90 \pm 0,81 | - |
| Σ Carotenoides | 99,76 \pm 54,14 | 2,05 \pm 0,98 | * |
| TEAC | 0,51 \pm 0,25 | 0,04 \pm 0,03 | * |

*diferencias significativas ($p < 0.05$)

En el corazón de la sandía roja es donde mayor cantidad de carotenoides encontramos, tanto incoloros como el fitoeno y el fitoflueno como de carotenos (β y ζ) y de licopeno (*cis*, *trans* y 5-*cis*). La cantidad total de carotenoides es un 37 % mayor que la encontrada en la zona lóculo, sin embargo la actividad antioxidante (TEAC) permanece constante.

En la sandía amarilla encontramos una baja variedad de compuestos, 4, frente a los 7 aislados en la misma zona de la sandía roja. Los carotenoides identificados fueron el fitoeno, el β -caroteno, ambos en cantidades significativamente inferiores a las encontradas en la variedad roja, luteína y violaxantina. A diferencia de lo que ocurre en la sandía roja, en la sandía amarilla los carotenoides característicos de la variedad (en este caso la luteína y la violaxantina) aparecen en mayor concentración en la cáscara, que en la parte comestible del corazón.

Contenido de carotenoides y actividad antioxidante en la parte comestible

La zona comestible es la zona central cuyo color es característico de la variedad de la sandía y la forman el corazón y el lóculo. Con el objetivo de presentar los datos de una forma más fácil de interpretar, los datos de la siguiente tabla (Tabla 11) se presentan como μg por 100 gramos de producto fresco. Para lo cual se determinó el contenido de agua de cada fracción analizada, teniendo en cuenta el peso de la muestra fresca y el peso de la muestra liofilizada. Los contenidos medios de humedad fue del 89% para ambas las variedades.

Tabla 11. Cantidad de compuestos por porción de parte comestible expresado μg por 100 gramos de parte comestible

| Parte comestible | | | |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| Compuesto | Roja | Amarilla | Dif SIG |
| Σ Fitoeno | 106,51 \pm 84,47 | 1,61 \pm 1,56 | - |
| Σ Fitoflueno | 86,2 \pm 59,71 | 3,17 | - |
| Σ ζ -caroteno | 33,43 \pm 37,98 | 0,90 | - |
| β -caroteno | 48,42 \pm 28,20 | 2,08 \pm 1,47 | * |
| Σ <i>cis</i> -licopeno | 152,89 \pm 97,54 | - | - |
| <i>trans</i> -licopeno | 425,25 \pm 225,20 | - | - |
| 5- <i>cis</i> -licopeno | 92,87 \pm 55,18 | - | - |
| Luteína | - | 12,27 \pm 3,78 | - |
| Violaxantina | - | 5,80 \pm 7,45 | - |
| α -tocoferol | - | 19,79 \pm 12,71 | - |
| Σ Carotenoides | 945,56 \pm 495,96 | 19,36 \pm 9,16 | * |

*diferencias significativas ($p < 0.05$)

Debido a los altos valores de la desviación estándar, no se aprecian diferencias significativas entre variedades, excepto para los valores de carotenoides totales y β -caroteno. Aunque observamos en concordancia con Fehér (1993), que en la sandía amarilla la cantidad total de

carotenoides es $< 1\text{ppm}$ y que las xantofilas son mayoritarias, suponiendo el 70% de los carotenoides. En la sandía roja todos los carotenoides son carotenos y el licopeno es el caroteno mayoritario, ascendiendo al 70% del total. Por otro lado, la cantidad total de carotenoides en la sandía es un 37% menor a lo referido en la bibliografía y así como el contenido de β -caroteno (Fehér, 1993). Por otro lado, en la sandía roja, el contenido total de licopeno (sumatorio de los tres isómeros cuantificados), de los cuales el 60% corresponde a *trans*-licopeno, es inferior al descrito por otros autores (Beltrán *et al.*, 2012). Estas diferencias se pueden deber al pequeño tamaño del muestreo, al grado de madurez de las muestras analizadas, al almacenamiento, al clima o factores agronómicos que influyen en la cantidad de los carotenoides y su conservación.

Color

La figura 9 muestra las imágenes obtenidas a partir del sistema DigiEye® a partir de las cuales se obtuvieron los parámetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab}).

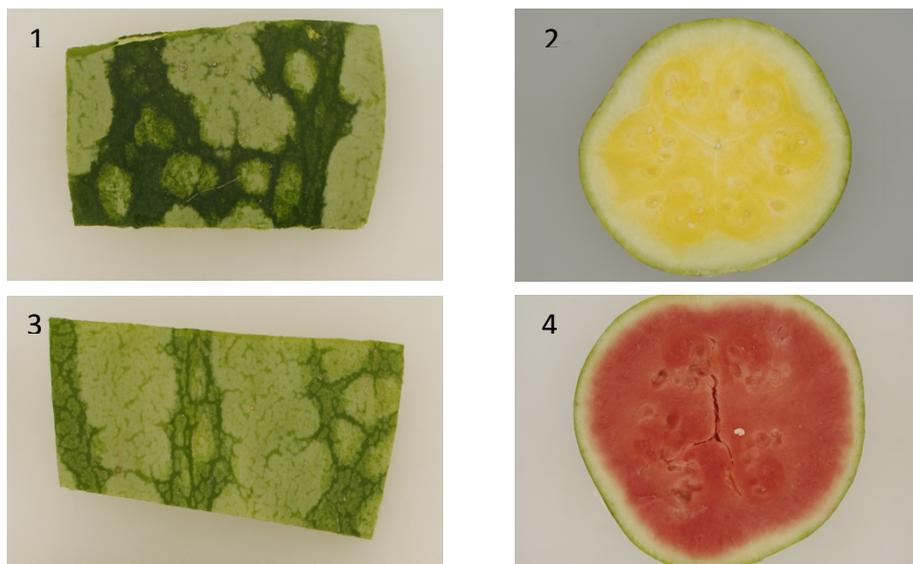


Figura 9. Imágenes tomadas por el sistema DigiEye®. **1-** Cáscara de sandía amarilla. **2-** Corte de sandía amarilla. **3-** Cáscara de sandía roja. **4-** Corte de sandía roja.

La Tabla 12 muestra las coordenadas de color y su desviación estándar obtenidas con el sistema DigiEye® correspondientes a la zona del corazón analizadas de las dos variedades de sandía.

Tabla 12. Datos de color de los corazones de ambas variedades

| Zona | Corazón | | | | | |
|------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Roja | | | Amarilla | | |
| | RHA | RHB | RHC | AHA | AHB | AHC |
| L* | 47,57 ± 3,87 a | 50,99 ± 0,32 a | 45,61 ± 1,18 a | 85,72 ± 0,77 b | 81,27 ± 1,15 a | 80,60 ± 1,51 a |
| a* | 40,08 ± 0,91 a | 43,70 ± 0,39 a | 42,15 ± 2,69 a | 5,40 ± 0,42 a | 8,04 ± 0,55 b | 11,59 ± 1,13 c |
| b* | 30,69 ± 0,84 a | 35,03 ± 0,75 b | 32,11 ± 1,08 a | 56,22 ± 3,13 a | 57,06 ± 4,54 a | 71,00 ± 0,23 b |
| C*ab | 50,48 ± 1,18 a | 56,01 ± 0,61 b | 52,99 ± 2,79 a b | 56,48 ± 3,16 a | 57,62 ± 4,57 a | 71,95 ± 0,21 b |
| h ab | 37,44 ± 0,43 a | 38,71 ± 0,60 a | 37,33 ± 0,86 a | 84,51 ± 0,13 b | 81,97 ± 0,14 a | 80,73 ± 0,90 a |

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05)

A partir de los datos obtenidos con el sistema DigiEye® se han realizado los diagramas de color. La figura 10 muestra la disposición de las muestras de corazón de las dos variedades en el diagrama a*b y de claridad (L*). Todas las muestras se localizaron en el primer cuadrante, tomando tanto a* como b* valores positivos. Puede observarse una diferenciación clara entre las dos variedades.

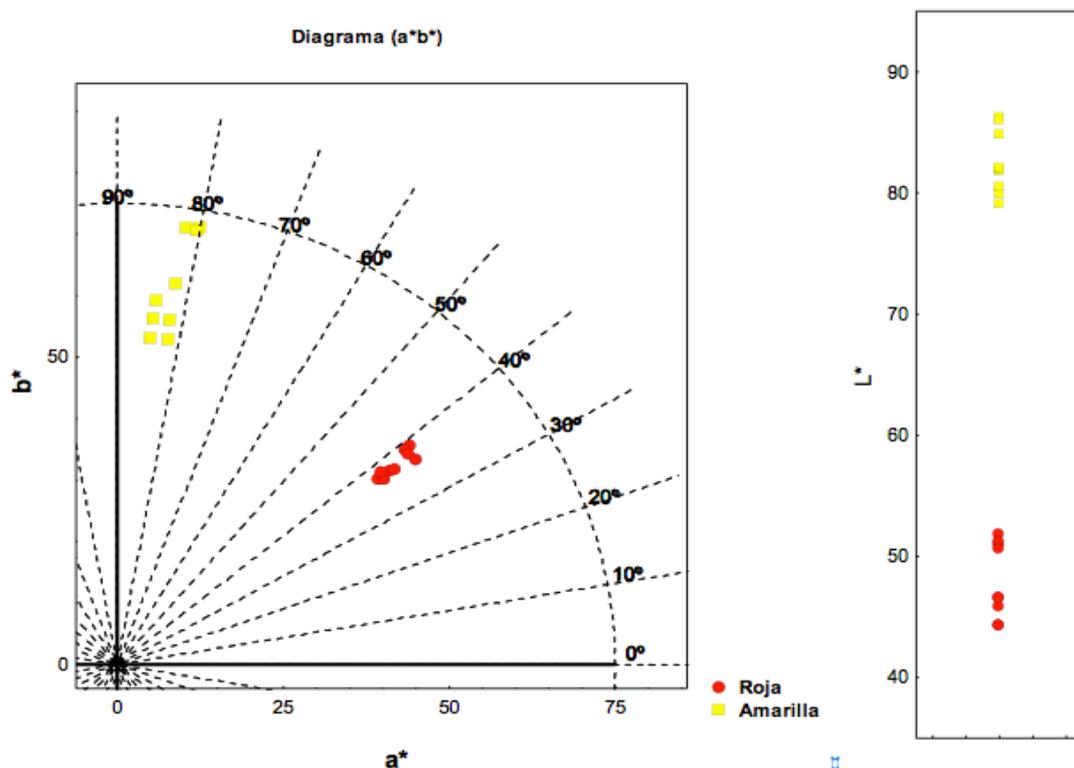


Figura 10. Diagrama a*b* y de claridad de las muestras de corazón de ambas variedades.

Se observó que los valores de L* para las variedad roja son menores que para la amarilla, lo que significa que la sandía roja es más oscura ya que sus valores de claridad (L*) oscilaron entre 79 y 86, mientras que la sandía amarilla fue más clara con valores entre 44 y 51. En lo que respecta al tono (h_{ab}) se observó que la sandía roja mostro valores que se sitúan entre los 30 –

40°, lo que indica un color rojo-rosado mientras que sandía amarilla se encuentran en la zona más cercana a los amarillos con tonos medios de 82°. Estos resultados se pueden relacionar con la composición de carotenoides, ya que en la variedad roja el licopeno fue el carotenoide presente en mayor cantidad (70% del total) y, es el responsable del color, de acuerdo con estudios previos de Meléndez-Martínez *et al.*, (2010). De igual manera en la variedad amarilla, los carotenoides mayoritarios son luteína y violaxantina, ambos de color amarillo.

Los valores de croma (C^*_{ab}) fueron mayores para las variedades amarillas, por lo que presentan colores más cromáticos es decir más vivos.

La tabla 13 muestra los parámetros colorimétricos medios de las distintas partes de sandía analizadas

Tabla 13. Datos de color de las distintas partes de la sandía analizadas

| Zona | Cáscara | | Blanco | | Lóculo | | Corazón | |
|------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Roja | Amarilla | Roja | Amarilla | Roja | Amarilla | Roja | Amarilla |
| L* | 61,1 ± 10,42 a | 44,63 ± 2,94 a | 75,6 ± 2,76 a | 84,04 ± 2,73 b | 44,51 ± 4,55 a | 85,22 ± 0,73 b | 82,53 ± 2,36 a | 48,05 ± 2,96 b |
| a* | -9,46 ± 1,77 a | -11,42 ± 1,55 a | -1,43 ± 0,32 a | -5,47 ± 0,59 b | 39,53 ± 1,66 a | 4,97 ± 0,39 b | 8,34 ± 2,64 a | 42,00 ± 1,97 b |
| b* | 25,59 ± 1,90 a | 21,43 ± 1,74 b | 33,69 ± 1,05 a | 34,18 ± 3,60 a | 30,12 ± 2,38 a | 51,35 ± 0,98 b | 61,43 ± 7,52 a | 32,61 ± 2,00 b |
| C* _{ab} | 43,45 ± 26,26 a | 24,29 ± 2,24 a | 33,72 ± 1,06 a | 34,62 ± 3,52 a | 49,72 ± 2,48 a | 51,59 ± 1,01 a | 62,02 ± 7,77 a | 53,16 ± 2,66 b |
| h _{ab} | 110,35 ± 4,10 a | 117,98 ± 1,48 b | 92,42 ± 0,51 a | 99,20 ± 1,69 b | 37,27 ± 1,71 a | 84,48 ± 0,34 b | 37,83 ± 0,87 a | 82,41 ± 1,73 b |

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

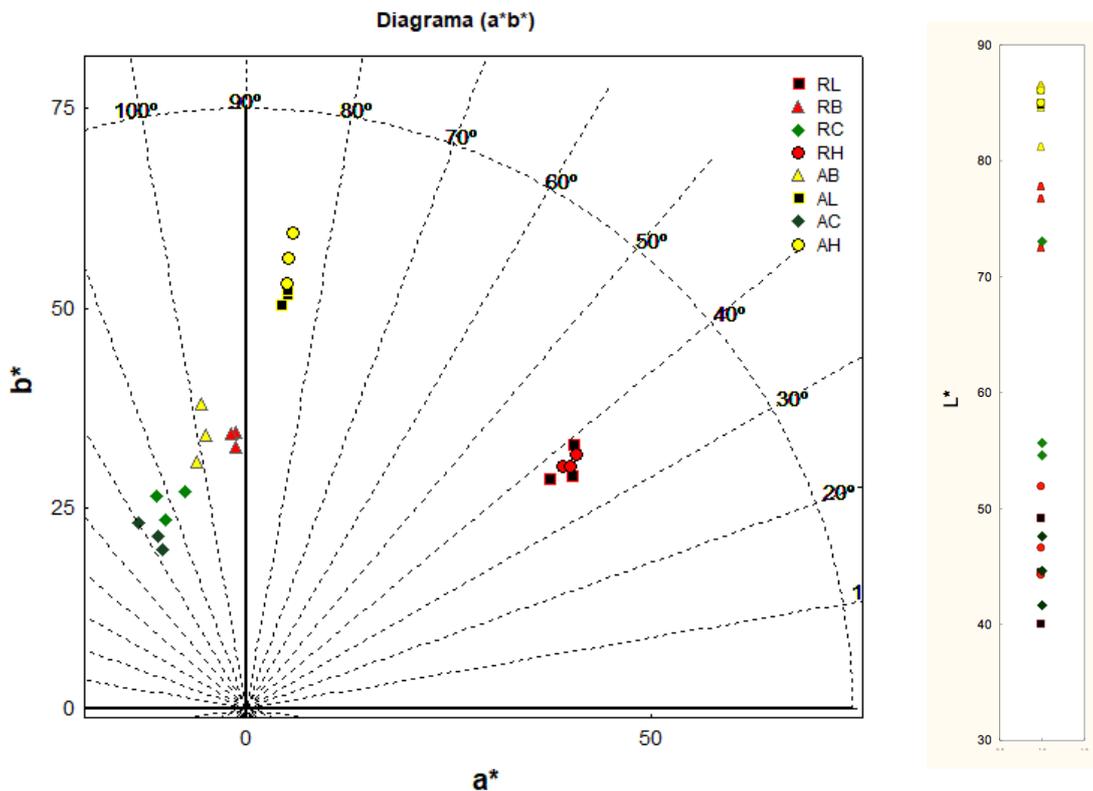


Figura 11. Diagrama a*b* y claridad (L*) de las diferentes partes analizadas

La Figura 11 muestra la distribución de las distintas partes analizadas (corazón, lóbulo, mesocarpio y epicarpio) de las dos variedades de sandía en el diagrama ab y L^* .

Del diagrama a^*b^* , observamos que el color de los lóbulos, tanto de la sandía roja como de la amarilla, tiene valores muy parecidos a los de la zona de sus respectivos corazones, lo cual coincide con los perfiles cualitativos de carotenoides, en los cuales predominan el licopeno y la luteína respectivamente.

Con respecto a las otras zonas, el mesocarpio mostro valores positivos de b^* y negativos de a^* , por lo que se localizaron en el segundo cuadrante.

En la zona del epicarpio destacamos las vetas de diferente color, por lo que a la hora de elegir la zona a medir se seleccionaron ambas zonas en cada medida. Estas dos zonas se deben a la presencia de feofitinas y luteína en el epicarpio de la variedad roja (Figura 9-3) y la presencia de clorofilas y luteína en la variedad amarilla (Figura 9-1).

Con objeto de cumplir uno de los objetivos propuestos, se han explorado correlaciones lineales y múltiples entre parámetros químicos y de color de la zona del corazón de ambas sandías.

Se incluyeron los datos de ambas variedades en conjunto, obteniendo un tamaño de muestra mayor ($n=17$) en el caso de los carotenoides totales y en el caso del TEAC ($n=16$). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14, donde se incluyen las correlaciones entre la cantidad total de carotenoides y el TEAC respecto a los datos del color. Se aprecia que son significativas todas las correlaciones, excepto las correspondientes al croma.

Tabla 14. Correlaciones lineales de la cantidad total de carotenoides y del TEAC con respecto a las coordenadas de color

| | L^* | a^* | b^* | C^*ab | h_{ab} |
|--------------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| Carotenoides | -0,84329 * | 0,81919 * | -0,75988 * | -0,45974 | -0,81701 * |
| TEAC | -0,79437* | 0,85225 * | -0,77639 * | -0,47471 | -0,83838 * |

* diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los elevados valores de coeficiente de correlación obtenidos ($R^2 > 0.7$) en la regresión múltiple, permiten plantear ecuaciones basadas en las coordenadas colorimétricas L^* , a^* y b^* para estimar lo valores de TEAC y cantidad total de carotenoides de forma rápida y precisa

$$(1) \text{ TEAC} = 0,04513L^* + 0,05370a^* + 0,004655b^* - 3,56845 \quad R^2 = 0,87$$

$$(2) \text{ Cantidad de carotenoides} = - 4,8107L^* - 1,8264a^* + 0,1581b^* + 403,99 \quad R^2 = 0,72$$

5. Conclusiones

1. El perfil de carotenoides determinado en ambas variedades varía tanto cualitativamente como cuantitativamente en las distintas partes analizadas. En la sandía roja la mayor cantidad y diversidad de carotenoides se encontró en el corazón mientras que en la sandía amarilla esto ocurre en la cáscara.
2. En la sandía roja predominan los carotenos (licopeno y β -caroteno) y en su homóloga amarilla predominan las xantofilas (luteína mayormente)
3. Además de los carotenoides, se identificaron clorofilas encontrándose estas sobretodo en la cáscara con la peculiaridad de cuantificarse en forma de clorofilas en la sandía amarilla y en forma de sus derivados (feofitinas) en la sandía roja.
4. En lo referente a la porción comestible destacar que por cada 100g de sandía roja se ingieren casi 1mg de carotenoides, de los cuales el 70% es licopeno. En cambio, en la sandía amarilla la cantidad de carotenoides ingerida es 50 veces menor.
5. La actividad antioxidante (TEAC) fue mayor en la parte comestible (corazón y lóculo) de la sandía roja que de la amarilla.
6. Los parámetros colorimétricos obtenidos por el sistema DigiEye® permiten confirmar que el color rojo de la sandía procede de los carotenos (licopeno y sus isómeros), el color amarillo canario procede de las xantofilas (luteína, violaxantina) y el color amarillento de la zona blanca se lo otorga principalmente la luteína.
7. Es posible estimar el contenido de carotenoides totales y la actividad antioxidante, mediante los parámetros colorimétricos medidos por el sistema DigiEye®.

6. Bibliografía

Arias, R.; Lee, T.C.; Logendra, L.; Janes, H. Correlation of Lycopene Measured by HPLC with the L*, a*, b* Color Readings of a Hydroponic Tomato and the Relationship of Maturity with Color and Lycopene Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(5); 1697-1702.

Beltrán B, Estévez R, Cuadrado C, Jiménez S, Alonso BO. Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina a; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina a de adultos jóvenes. *Nutr Hosp*. 2012;27(4):1334-43.

Breitenbach, J., Braun, G., Steiger, S., Sandmann, G. Chromatographic performance on a C30-bonded stationary phase of monohydroxycarotenoids with variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by various carotene desaturases. *Journal of Chromatography A*. 2001; 936 (1-2), 59-69.

Britton, G. UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander., *Carotenoids*. Volume 1B: Spectroscopy. 1ª Ed Basel, Switzerland: Birkhäuser; 1995; 13-62

Carbonell, L.; Izquierdo, L.; Carbonell, I. Sensory analysis of Spanish mandarin juices. Selection of attributes and panel performance. *Food Quality and Preference*. 2007; 18(2); 329-341.

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

D'Souza, M.C.; Singha, S.; Ingle, M. Lycopene Concentration of Tomato Fruit can be Estimated from Chromaticity Values. *HortScience*. 1992; 27(5); 465-466.

Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000; 40; 173-289.

Eichler, O.; Sies, H.; Stahl, W. Divergent optimum levels of lycopene, β -carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblasts. *Photochemistry and Photobiology*. 2002; 75(5); 503-506.

F. Böhm, R. Edge, L. Lange, T.G. Truscott. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids, *J. Photochem. Photobiol., B Biol*. 1998; 44: 211–215.

Fernández-Vázquez, R.; Stinco, C.M.; Meléndez-Martínez, A.J.; Heredia, F.J.; Vicario, I.M. Orange Juice Color. Visual Evaluation and Consumer Preference; en *Color in Food*. Technological

and Psychophysical Aspects (Caivano, J.; Buera, M., ed.). CRC Press. Taylor & Francis Group, New York. 2012; 435-441.

Fraser, P.D.; Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 2004; 43; 228-265.

H. Morais, A. Abram, F. Ferreira. Carotenoids Biosynthesis – a review. *Revista Lusófona de Humanidades e Tecnologias*. 2010; 1 (10); 22-42. Disponible en: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/rhumanidades/article/view/1270b>

Hita. E y J. Romero. Análisis de la influencia de las condiciones de observación en los procesos de discriminación en color. *Óptica Pura y Aplicada*. 1981; 14: 11-17

Khachik, F.; Beecher, G.R.; Goli, M.B.; Lusby, W.R.; Daitch, C.E. (1992). Separation and quantification of carotenoids in human plasma. *Methods Enzymology*. 1992; 213; 205-219.

Krinsky, N.I.; Johnson, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; 26(6); 459-516.

Krinsky, Norman I., Susan T. Mayne, and H Sies. *Carotenoids in health and disease*. 1ª ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

Ladygin VG. Biosynthesis of Carotenoids in the Chloroplasts of Algae and Higher Plants. *Russ J Plant Physiol*. 2000;47(6):796-814.

León, K., Mery, D., Pedreschi, F., León, J. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*. 2006; 39 (10); 1084-1091.

Luo, M.R.; Cui, C.G.; Li, C. Entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System). British Patent. 2001.

M. E. N. Fonseca, J. P. Navazio, P.W. Simon. Classical breeding to improve vegetable vitamin and provitamin content. En: I. Cakmak y R. M. Welch. *Impacts of Agriculture on Human Health and Nutrition - Volume I*. 1ª ed. Reino Unido: Eolss Publishers Co. Ltd.; 2009. p 263-283.

Meléndez-Martínez, A. J., Escudero-Gilete, M. L., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. Study of the influence of carotenoid structure and individual carotenoids in the qualitative and quantitative attributes of orange juice colour. *Food Research International*. 2010; 43, 1289-1296.

Meléndez-Martínez Antonio J., Vicario Isabel M., Francisco J. Heredia. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *ALAN*. 2004; 54(2): 149-155.

Meléndez-Martínez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia, F.J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*. 2006; 101 (3); 1145-1150.

Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. Geometrical isomers of violaxanthin in orange juice. *Food Chemistry*. 2007; 104 (1), pp. 169-175.

Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. Instrumental measurement of orange juice colour: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005; 85(6): 894-901.

Moise, A.R.; Al-Babili, S. Wurtzel, E.T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chem. Rev.* 2014, 114, 164–193.

Olson, J.A. Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1999; 49(1); 7-11.

Palozza, P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*. 1998; 56(9); 257-265.

Patras, A.; Brunton, N.; Da Pieve, S.; Butler, F.; Downey, G. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009; 10(1); 16-22.

Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *PHARMACOL RES.* 2007; 55: 207–216

Re R, Pellegrini N, Proteggente a., Pannala a., Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9):1231-7.

Rodriguez-Amaya D., Kimura M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. En: *HarvestPlus Technical Monographs*. 1ª ed. Washington, DC: HarvestPlus; 2004.

Rodriguez-Amaya, D.B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC. 2001

Rodríguez-Amaya, D.B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. OMNI/USAID, Washington, D.C. 1997.

Rodríguez-Pulido, F.J. *Aplicación de técnicas de imagen para la evaluación de la madurez fenólica de semillas de uva (Tesis doctoral)*. Sevilla, Universidad de Sevilla; 2013. Disponible en <https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1059201>

Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M. C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000; 880 (1-2), pp. 189-202.

Solovchenko A, Neverov K. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynth Res. Springer Netherlands*; 2017;0(0):1-17.

Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1740: 101-107

Stinco, C. M., Benítez-González, A. M., Hernanz, D., Vicario, I. M., & Meléndez-Martínez, A. J. Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1370, 162-170.

Stinco, C. M., Rodríguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, M. L., Gordillo, B., Vicario, I. M., & Meléndez-Martínez, A. J. (2013). Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. *Food Research International*. 2013; 50, 111-120.

T. Féher. Watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. En: G. Kalloo y B. O. Bergh. *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. 1ª ed. Oxford: Pergamon Press Ltd; 1993. P 295-311.

Thane, C.; Reddy, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition Food Science*. 1997; 97; 58-65.

W. Stahl, A. Junghans, B. de Boer, E. Driomina, K. Briviba, H. Sies. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein, *FEBS Lett*. 1998; 427: 305–308.

Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1-13. Recuperado a partir de: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5692852/>

Wyszecki, G.; Stiles, W.S. *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*. John Wiley & Sons, Inc, New York.1982