



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**Extracción de pigmentos carotenoides en jitomate
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) y su aplicación en sistemas
alimentarios modelo**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M. en B. Rosa María Galicia Cabrera

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

México D.F.

Septiembre, 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”.

México D.F. a 25 de septiembre del 2009

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Extracción de pigmentos carotenoides en jitomate (*Lycopersicon esculentum*
Mill.) y su aplicación en sistemas alimentarios modelo**

que presentó

M. en B. Rosa María Galicia Cabrera

Comité tutorial:

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

Jurado:

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana-I _____

Secretario: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-I _____

Vocal: Dr. Crescenciano Saucedo Veloz
Colegio de Postgraduados _____

Vocal: Dra. Eloísa López Hernández
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco _____

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL
LABORATORIO DEL ÁREA DE BIOQUÍMICA DE
MACROMOLÉCULAS DEL DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA

Los objetivos de esta tesis fueron: a) estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas del jitomate cv Saladette en estado de madurez rojo sometido a escaldado; b) extraer el licopeno del fruto y c) evaluar la estabilidad del pigmento en hexano y en aceite de canola bajo diferentes factores (con y sin adición de antioxidantes, almacenamiento en oscuridad a 4, 20 y 60°C y en luz fluorescente a 20°C durante 30 días), con el propósito de formular una emulsión de licopeno (aceite-en-agua) que pueda incorporarse como ingrediente a un sistema alimentario funcional. Las emulsiones se prepararon con suero de leche y goma arábiga como emulsificantes.

El escaldado tuvo efecto significativo ($p \leq 0.05$) en el pH, concentración de ácido ascórbico y tono de los frutos, siendo los valores medios para muestras escaldadas: pH de 4.29 ± 0.01 ; ácido ascórbico de 30.92 ± 0.34 mg/100g y un valor de tono de 0.651 ± 0.01 . Para muestras no escaldadas los valores medios fueron: pH de 4.24 ± 0.02 ; ácido ascórbico de 36.78 ± 0.29 mg/100g y el tono fue de 0.569 ± 0.04 . La concentración de licopeno en jitomates sin escaldar fue de 79.20 ± 1.94 µg/g mientras que para los frutos escaldados fue de $75.25 \mu\text{g/g} \pm 2.09$, no se presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Cuando las muestras se almacenaron a 20°C durante 30 días, la mayor retención del licopeno fue en oscuridad en muestras escaldadas con una media de 81%, mientras que la mayor degradación fue en las muestras extraídas de jitomates no escaldados en condiciones de luz (4 186 lux) con una media de 59.43%.

La degradación del licopeno en hexano durante los 30 días de almacenamiento siguió un modelo cinético de primer orden:

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

Donde:

C_0 es la concentración inicial del licopeno

C es la concentración del licopeno al tiempo t

k es la constante de velocidad de reacción

Con base a estos criterios, se realizó estadísticamente el ajuste al modelo exponencial del porcentaje de licopeno retenido a través del tiempo para los experimentos de licopeno en hexano en las diferentes condiciones de almacenamiento. La menor constante de velocidad de degradación del licopeno fue en las muestras del carotenoide extraído de jitomates escaldados en oscuridad a 20°C (0.018 d^{-1}) y el 50% de retención de licopeno fue a los 38 días. En condiciones de oscuridad y luz a 20°C, la mayor degradación del pigmento en hexano fue en las muestras sin antioxidantes y luz siendo la media de 55.02%, y su constante de velocidad de degradación de 0.62 d^{-1} y el 50% de retención de licopeno fue a los 11 días.

Cuando el pigmento en hexano con antioxidantes se almacenó a 4, 20 y 60°C en oscuridad, la mayor retención de licopeno fue a 4 °C con un valor medio de 85.58%. En condiciones de luz y 20 °C la degradación del pigmento fue mayor (66.92%) que en oscuridad y 60 °C (68.68%). En condiciones de oscuridad, al incrementar la temperatura la degradación del licopeno fue mayor. La constante de degradación del licopeno a 4°C fue de 0.014 d^{-1} y la vida media del licopeno fue de 48 días. La constante de velocidad de degradación del licopeno se incrementó al elevar la temperatura.

El licopeno en aceite de canola en condiciones de luz presentó la mayor degradación con una media de 43.57%, una constante de velocidad de degradación de 0.435 d^{-1} y una vida media del licopeno de 1.59 días. Cuando el pigmento en aceite de canola con antioxidantes se almacenó a 4, 20 y 60°C en oscuridad, la mayor retención del pigmento fue a 4°C, con una constante de velocidad de degradación de 0.197 d^{-1} y una vida media de 3.5 días mientras, la mayor

degradación fue a 60°C, siendo la media de 38.75%, la constante de velocidad de degradación de 0.530 d⁻¹ y una vida media del licopeno de 1.3 días.

Con respecto al efecto antioxidante del licopeno se evaluó por la formación de hidroperóxidos. En condiciones de oscuridad y luz a 20°C y adición de antioxidantes, el mayor valor de peróxido fue en luz con una media de 12 mEq/kg. Mientras que en oscuridad y temperaturas de 4, 20 y 60°C, el mayor valor de peróxido fue a 60°C con una media de 55.91 mEq/kg. Al incrementar la temperatura aún en condiciones de oscuridad se incrementó la oxidación lipídica y a 60°C el carotenoide disminuyó su efecto antioxidante.

Finalmente, en las emulsiones de licopeno almacenadas en oscuridad, α -tocoferol como antioxidante y 4°C durante 20 días, la retención de licopeno fue mayor en la emulsión con suero de leche como emulsificante y pigmento extraído de jitomates escaldados, siendo la media de 83.74%, mientras que en las emulsiones con goma arábiga fue de 79.10%. Las constantes de velocidad de degradación del pigmento fueron de 0.019 d⁻¹ y 0.021 d⁻¹, respectivamente; y la vida media del licopeno fue de 36.68 y 33.19 días, respectivamente. Con respecto al tamaño de partícula no se presentaron cambios en ambos tipos de emulsiones por lo que no se presentó la coalescencia o agregación bajo las condiciones del estudio.

PALABRAS CLAVE: jitomate, licopeno, escaldado, estabilidad en almacenamiento, cinéticas, emulsiones.

The objectives of this thesis were: a) to study the changes in physicochemical properties of fully ripened –red– tomato cv Saladette; b) to extract lycopene from this material; and, c) to study the stability of this pigment in hexane and in canola oil, under various conditions (with/without antioxidants addition; stored in the dark at 4, 20 and 60°C for 30 days; stored under fluorescent light at 20°C for 30 days). Oil-in-water lycopene emulsions (whey and with arabic gum) were formulated, in order to study the possible pigment addition of add the pigment to food systems, for functional foods formulations.

Scalding had a significant effect ($p \leq 0.05$) on pH, ascorbic acid concentration and hue; mean values for scalded samples were: pH 4.29 ± 0.01 ; ascorbic acid concentration 30.92 ± 0.34 mg/100 g; hue 0.651 ± 0.01 . For non-scalded samples, mean values were: pH 4.24 ± 0.02 , ascorbic acid concentration 36.78 ± 0.29 mg/100 g; hue 0.569 ± 0.04 . Lycopene concentration in non-scalded samples was 79.20 ± 1.94 $\mu\text{g/g}$, whereas scalded fruits contain 75.25 ± 2.09 μg lycopene/g.

When stored at 20°C for 30 days in the dark, the extracted pigment retains 81% of the initial lycopene concentration; conversely, the highest lycopene degradation was observed in samples extracted from non-scalded fruits stored under light (4186 lux), final concentration was 59% of the original lycopene content.

Lycopene in hexane degradation, stored for 30 days, followed a first-order kinetic model, as follows:

$$C = C_0 \exp^{-kt}$$

Where:

C_0 – initial lycopene concentration

C – lycopene concentration at t

k – reaction rate constant

An exponential model was adjusted following these criteria to express percentage of retained lycopene in hexane throughout time under the various storage conditions. The minimum lycopene degradation rate was observed for carotenoid extracted from scalded tomatoes, stored in the dark at 20°C (0.018d⁻¹); 50% lycopene retention occurred at day 38. The most severe pigment-in-hexane degradation occurred in samples stored under light at 20°C where no antioxidant was added; in this case, the degradation rate constant was 0.62 d⁻¹; 50% lycopene retention was observed at day 11.

In antioxidant-added pigment samples stored in the dark, the highest retention occurred when at 4°C (mean value=85.58%). Pigment degradation was higher for samples stored under light, at 20°C (66.92%) as compared to those stored in the dark at 60°C (68.68%). Lycopene degradation increased with temperature in samples stored in the dark. The lycopene degradation constant at 4°C was 0.014 d⁻¹, 48 days mean life. Lycopene degradation constant also increased with temperature.

Lycopene in canola oil showed the most severe degradation (43.57% mean value) at 20°C, degradation rate constant = 0.435 d⁻¹ and mean life = 1.59 days. Lycopene in canola oil samples, added with antioxidants and stored in the dark, showed the highest retention at 4°C, degradation rate constant = 0.197 d⁻¹, mean life=3.5 days. In these samples the most severe degradation occurred at 60°C, (mean value 38.75%), degradation rate constant = 0.530 d⁻¹, mean life=1.3 days.

Lycopene antioxidant effect was studied by hydroperoxides formation. The highest peroxide value in antioxidant-added samples stored at 20°C was observed in samples stored under light (mean value = 12 mEq/kg). The highest peroxide value in samples stored in the dark occurred at 60°C (mean value= 55.91 mEq/kg). Lipid

oxidation increased with temperature, even in samples stored in the dark; at high temperatures, the carotenoid antioxidant effect considerably decreased.

Finally, lycopene retention was higher in emulsions added with α -tocopherol as antioxidant stored in the dark at 4°C for 20 days, as compared to lycopene whey emulsions, extracting the pigment from scalded tomatoes (83.74% mean value); lycopene degradation in arabic gum emulsions presented 79.10% retention (mean value). The pigment degradation rate constant for whey and arabic gum emulsions was 0.019 d⁻¹ and 0.021 d⁻¹, respectively. There were no changes in average particle size in both emulsions; therefore coalescence or aggregation was not observed.

KEY WORDS: tomato, lycopene, blanching, storage stability, kinetics, emulsions.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DEL CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xx
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xxiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.).....	5
2.1.1 Producción nacional e importancia comercial.....	6
2.1.2 Biología.....	7
2.1.3 Valor nutricional.....	8
2.2 Pigmentos carotenoides.....	9
2.2.1 Estructura y clasificación.....	9
2.2.2 Biosíntesis de carotenoides.....	11
2.2.3 Isómeros de carotenoides.....	12
2.2.4 Distribución.....	13
2.2.4.1 Tejidos fotosintéticos.....	13
2.2.4.2 Tejidos no fotosintéticos.....	13
2.2.5 Funciones en plantas.....	14
2.2.5.1 Pigmentos accesorios para coleccionar luz.....	14

	Página
2.2.5.2 Prevención de daño fotooxidativo.....	15
2.2.5.3 Pigmentación para atraer animales para efectuar la polinización y dispersión de semillas.....	15
2.2.6 Propiedades antioxidantes de los carotenoides.....	16
2.2.6.1 Neutralización del oxígeno singlete.....	16
2.2.6.2 Eliminación de peróxidos y otros radicales.....	18
2.2.6.3 Productos de oxidación de los carotenoides.....	19
2.2.6.4 Actividad antioxidante de los carotenoides <i>in vitro</i>	19
2.2.6.4.1 Reactividad al oxígeno singlete.....	19
2.2.6.4.2 Reactividad a diferentes especies de radicales.....	19
2.2.6.4.3 Interacción con otros carotenoides o antioxidantes.....	23
2.3 Licopeno.....	24
2.3.1 Propiedades físicas y químicas.....	25
2.3.2 Propiedades bioquímicas.....	26
2.3.3 Licopeno en jitomate, productos procesados del jitomate y en otras frutas.....	27
2.3.4 Biosíntesis del licopeno en células vegetales.....	28
2.3.5 Degradación oxidativa del licopeno.....	30
2.4 Escaldado de frutas y hortalizas.....	32
2.5 Los pigmentos como colorantes naturales	33
2.5.1 Importancia de los colorantes naturales.....	34
2.5.2 Clasificación de colorantes para alimentos.....	36
2.6 Oxidación lipídica en alimentos.....	38
2.6.1 Oxidación lipídica.....	40
2.6.2 Mecanismos de la oxidación lipídica.....	40
2.6.3 Productos de la descomposición de la oxidación lipídica.....	41
2.6.4 Prooxidantes.....	42
2.6.5 Antioxidantes.....	42

	Página
2.6.6 Agentes quelantes o secuestrantes.....	43
2.6.7 Neutralizadores del oxígeno singulete.....	43
2.7 Emulsiones aceite-en-agua.....	44
2.7.1 Conceptos básicos en emulsiones.....	44
2.7.1.1 Emulsiones aceite en agua.....	44
2.7.1.2 Clasificación de las emulsiones.....	44
2.7.1.3 Cremado.....	45
2.7.1.4 Sedimentación.....	45
2.7.1.5 Floculación.....	45
2.7.1.6 Coalescencia.....	45
2.7.1.7 Emulsificantes.....	46
2.7.1.7.1 Espesantes (modificadores de textura).....	46
2.7.1.7.2 Surfactantes.....	47
2.7.1.8 Barrera química.....	47
2.7.2 Características de la emulsión.....	48
2.7.3 Características de la gota.....	49
2.7.3.1 Concentración de la gota.....	49
2.7.3.2 Distribución del tamaño de partícula.....	49
2.7.3.3 Carga de la gota.....	50
2.7.3.3.1 Proteínas del suero.....	50
2.7.3.3.2 Goma arábica.....	51
2.7.3.4 Características de la región interfacial.....	52
2.7.4 Emulsiones basadas en sistemas de distribución para componentes lipofílicos bioactivos.....	52
2.7.4.1 Características de sistemas de distribución.....	54
3. JUSTIFICACIÓN.....	57
4. OBJETIVOS.....	60

	Página
4.1 Objetivo general.....	61
4.2 Objetivos específicos.....	61
5. HIPÓTESIS.....	62
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
6.1 Material biológico.....	65
6.2 Métodos.....	65
6.2.1 Efecto de la etapa de madurez, almacenamiento a 4°C y tratamiento térmico en el jitomate Saladette.....	65
6.2.1.1 Escaldado.....	65
6.2.1.2 Determinación de pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST), azúcares reductores, ácido ascórbico y color.....	65
6.2.2 Extracción del licopeno en jitomates con maduración en etapa rojo....	68
6.2.2.1 Extracción de pigmentos carotenoides.....	68
6.2.2.2 Análisis de licopeno en cromatografía líquida de alta resolución....	70
6.2.2.3 Espectrofotometría.....	70
6.2.3 Estabilidad del licopeno.....	70
6.2.3.1 Preparación de las muestras en almacenamiento.....	70
6.2.3.2 Barrido espectral.....	73
6.2.4 Estabilidad y actividad antioxidante del licopeno en aceite de canola..	73
6.2.4.1 Estabilidad del licopeno en aceite de canola.....	73
6.2.4.1.1 Preparación de las muestras en un sistema licopeno/aceite de canola.....	73
6.2.4.1.2 Preparación de las muestras en almacenamiento.....	74
6.2.4.1.3 Análisis de licopeno en cromatografía líquida de alta resolución fase normal.....	76
6.2.4.2 Efecto antioxidante del licopeno.....	77
6.2.4.2.1 Determinación del valor de peróxido en aceite de canola.....	77

	Página
6.2.5 Estabilidad de emulsiones de licopeno (Aceite/Agua).....	78
6.2.5.1 Preparación del licopeno para las emulsiones Aceite/Agua.....	78
6.2.5.2 Emulsiones de licopeno (aceite/agua).....	78
6.2.5.2.1 Emulsión de licopeno con suero de leche como estabilizante.....	78
6.2.5.2.2 Emulsiones de licopeno con goma arábica como estabilizante.....	78
6.2.5.3 Preparación de las muestras en almacenamiento.....	78
6.2.5.4 Determinación del pH.....	79
6.2.5.5 Determinación del licopeno retenido.....	79
6.2.5.6 Determinación del tamaño de partícula.....	80
6.2.6 Análisis estadístico.....	81
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
7.1 Efecto del escaldado en las propiedades fisicoquímicas del jitomate cv. Saladette después del almacenamiento a 4°C.....	83
7.1.1 pH.....	83
7.1.2 Sólidos solubles totales.....	84
7.1.3 Acidez titulable.....	85
7.1.4 Ácido ascórbico.....	86
7.1.5 Azúcares reductores.....	87
7.1.6 Color (tono o matiz).....	88
7.2 Efecto del tratamiento térmico en el color y concentración de licopeno en el jitomate entero en etapa rojo.....	89
7.2.1 Efecto del escaldado en el color y concentración del licopeno.....	89
7.2.2 Efecto del escaldado en el espectro de absorción del licopeno en hexano.....	90
7.2.3 Identificación del licopeno en los cromatogramas (HPLC).....	91
7.2.4 Efecto del escaldado en la concentración de licopeno de jitomates enteros en etapa rojo.....	94

	Página
7.3 Cinéticas de degradación del licopeno en hexano (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) almacenado en diferentes condiciones de iluminación y temperatura.....	96
7.3.1 Experimentos 1a y 1b (Cuadro 9) Cinéticas de degradación del licopeno en hexano (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C...	96
7.3.2 Experimentos IIa y IIb (Cuadro 9): Cinéticas de degradación del licopeno en hexano con y sin adición de antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	99
7.3.3 Experimentos IIIa y IIIb (Cuadro 9): Cinéticas de degradación del licopeno en hexano con y sin adición de antioxidantes en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.....	103
7.4 Estabilidad y actividad antioxidante del licopeno (extraído de jitomates escaldados) en aceite de canola.....	107
7.4.1 Inhibición de la peroxidación lipídica (efecto antioxidante del caroteno).....	108
7.4.1.1 Inhibición de la formación de hidroperóxidos (valor de peróxido) en muestras de aceite de canola con licopeno con y sin adición de antioxidantes almacenadas en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	108
7.4.1.2 Inhibición de la formación de hidroperóxidos (valor de peróxido) en muestras de aceite de canola con licopeno con y sin adición de antioxidantes almacenadas en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.(Va y Vb).....	111
7.4.2 Experimentos IVa y IVb (Cuadro 11): Cinéticas de degradación del licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola almacenados en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	114
7.4.3 Experimentos Va y Vb (Cuadro 11): Cinéticas de degradación del licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.....	118
7.5 Estabilidad de licopeno en emulsiones de aceite/agua en condiciones de oscuridad a 4°C.....	123

	Página
7.5.1 Estabilidad química: cinéticas de degradación del licopeno en emulsión.....	124
7.5.2 Estabilidad física.....	130
8. CONCLUSIONES.....	132
9. RECOMENDACIONES.....	136
10. BIBLIOGRAFÍA.....	138
11. ANEXOS.....	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anatomía del jitomate (sección longitudinal).....	7
2	Molécula de isopreno y estructura de algunos carotenoides cíclicos y acíclicos.....	10
3	Reacciones de transformación durante la biosíntesis de carotenoides.....	11
4	Tres posibles reacciones de carotenoides con especies de radicales (R*).....	20
5	Oxidación del β -caroteno por radical peróxido a través del radical caroteno.....	21
6	Estructuras de <i>trans</i> y <i>cis</i> isómeros de licopeno.....	26
7	Biosíntesis del licopeno a partir de la formación del fitoeno y reacciones de desaturación.....	29
8	Biosíntesis de carotenoides cíclicos a partir del licopeno. Licopeno ϵ -ciclaza (LCY-E) y Licopeno β -ciclaza (LCY-B).....	30
9	Vía propuesta para la oxidación del licopeno en humanos.....	31
10	Vía de degradación del licopeno.....	32
11	Mecanismo de la oxidación lipídica.....	41
12	Emulsión aceite-en-agua formada por tres fases: interior de la gota, región interfacial y la fase acuosa.....	48
13	Diagrama de flujo para el análisis fisicoquímico en jitomate escaldado y no escaldado.....	66
14	Diagrama de flujo para la extracción, separación y purificación del licopeno de jitomates escaldados y no escaldados.....	69

Figura		Página
15	Diagrama de flujo para la estabilidad del licopeno a diferentes condiciones de almacenamiento durante 30 días.....	72
16	Diagrama de flujo para las pruebas de estabilidad del licopeno en aceite de canola a diferentes condiciones de almacenamiento durante 30 días.....	75
17	Diagrama de flujo para las pruebas de estabilidad de las emulsiones Aceite (licopeno)/Agua almacenadas a 4°C durante 20 días.....	79
18	Comportamiento del pH con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico...	84
19	Comportamiento de los sólidos solubles totales con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico.....	84
20	Comportamiento de la acidez titulable con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico.....	85
21	Comportamiento de la concentración de ácido ascórbico con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico.....	85
22	Comportamiento de la concentración de azúcares reductores y tono con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico.....	87
23	Comportamiento de la concentración de azúcares reductores y tono con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico.....	87
24	Espectros de absorción uv/visible de licopeno de jitomate no escaldado y escaldado en etapa de madurez rojo.....	91
25	Cromatograma del licopeno natural en jitomate escaldado, sus isómeros <i>cis</i> , xantófilas y β -caroteno después de la extracción con hexano:acetona:etanol utilizando una columna de fase reversa C ₁₈ de 250X4.6 mm.....	92

Figura		Página
26	Cromatograma del licopeno natural en jitomate no escaldado con antioxidante almacenado en oscuridad a 4°C durante 30 días.....	93
27	Cinéticas de degradación de soluciones de licopeno extraído de jitomates escaldados y no escaldados, almacenadas en oscuridad y luz a 20°C, (o) modelo observado y (a) modelo ajustado.....	99
28	Cinéticas de degradación del licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C (o) modelos observados y (a) modelos ajustados.....	103
29	Cinéticas de degradación del licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C (modelos ajustados).	106
30	Formación de hidroperóxidos en muestras de aceite de canola con licopeno con antioxidantes, en muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes y en aceite de canola (control), en condiciones de oscuridad y luz (4 186 lux) a 20°C.....	109
31	Formación de hidroperóxidos en muestras de aceite de canola con licopeno con antioxidantes, en muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes y en aceite de canola (control) en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C...	111
32	Cinéticas de degradación del licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	115
33	Cinéticas de degradación del licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C.....	119
34	Cinéticas de degradación del licopeno (provenientes de tomates escaldados y no escaldados) en emulsiones de aceite/agua en condiciones de oscuridad a 4°C.....	125

Figura		Página
35	Curva de calibración de la variación de la absorbencia con respecto a la concentración de azúcares reductores solubles (glucosa).....	152
36	Curva de calibración de la variación de la absorbencia con respecto a la concentración de ácido ascórbico.....	156

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción nacional de jitomate en 2007.....	6
2	Composición del jitomate basado en 100 g de material comestible.....	9
3	Concentración de licopeno en frutas y hortalizas.....	27
4	Concentración del licopeno en productos del jitomate.....	28
5	Sistemas de clasificación de los colorantes.....	37
6	Principales componentes nutraceuticos lipofílicos que necesitan ser distribuidos en alimentos.....	53
7	Principales componentes estructurales grado alimento que pueden ser utilizados para construir sistemas de distribución para componentes bioactivos.....	55
8	Fuentes de variación y variables de respuesta para los jitomates almacenados a 4°C y aplicación del escaldado.....	68
9	Diseño de experimentos con licopeno y hexano.....	71
10	Fuentes de variación y variables de respuesta para las disoluciones de licopeno almacenadas en condiciones de oscuridad (autooxidación) y luz (fotooxidación).....	73
11	Diseño de experimentos con licopeno en aceite de canola.....	76
12	Fuentes de variación y variables de respuesta para las disoluciones de licopeno en aceite de canola almacenados en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C (autooxidación) y luz a 20°C (fotooxidación).....	77
13	Diseño de experimentos con licopeno en emulsión.....	80
14	Fuentes de variación y variables respuesta para las emulsiones Agua/Aceite con licopeno en la fase dispersa almacenadas a 4°C.....	80
15	Efecto del escaldado en las propiedades fisicoquímicas del jitomate cv. Saladette después del almacenamiento a 4°C.....	83

Cuadro		Página
16	Longitud de onda de los picos, hombros y tono de jitomates cv Saladette no escaldados y escaldados.....	90
17	Identificación probable de los picos en cromatografía líquida de alta resolución del extracto de jitomate escaldado considerando sus tiempos de retención y λ máxima absorción.....	93
18	Modelos ajustados para la retención de licopeno en soluciones (de jitomates escaldados y no escaldados) en condiciones de oscuridad y luz a 20 °C.....	98
19	Modelos ajustados para la retención de licopeno en soluciones con y sin adición de antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	102
20	Modelos ajustados para la retención de licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad a 4 °C, 20 °C y 60 °C.....	105
21	Modelos para la retención de licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.....	117
22	Modelos para la retención de licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad a 4 °C, 20 °C y 60 °C.....	121
23	Modelos para la retención de licopeno (escaldado y no escaldado) en emulsiones Aceite/Agua estabilizadas con suero de leche y goma arábica en condiciones de oscuridad a 4°C.....	128
24	Propiedades físicas de las emulsiones de licopeno (pH y tamaño de gota).....	130
25	Valores de la concentración de azúcares reductores solubles y absorbencia (curva de calibración).....	152
26	Valores de la concentración de ácido ascórbico y absorbencia (curva de calibración).....	156

Cuadro		Página
27	Análisis de varianza para las variables respuesta en los jitomates sometidos a tratamiento térmico.....	161
28	Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en hexano con antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.....	161
29	Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en hexano con antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.....	162
30	Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.....	162
31	Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.....	163
32	Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.....	163
33	Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.....	164
34	Medias estimadas del valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.....	164
35	Análisis de varianza para el valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.....	165
36	Medias estimadas del valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.....	165

Cuadro		Página
37	Análisis de varianza para el valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.....	166
38	Medias estimadas de la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20 °C durante 30 días.....	166
39	Análisis de varianza para la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.....	167
40	Medias estimadas de la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C durante 30 días.....	167
41	Análisis de varianza para la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.....	168
42	Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en las emulsiones aceite/agua con suero de leche y goma arábica almacenadas en condiciones de oscuridad y 4°C durante 20 días.....	168
43	Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en las emulsiones aceite/agua con suero de leche y goma arábica (emulsificantes) almacenadas en condiciones de oscuridad y 4°C durante 20 días.....	169

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Determinación de pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST).....	149
2	Determinación de la concentración de azúcares reductores solubles (método de Nelson-Somogyi).....	150
3	Determinación de la concentración de ácido ascórbico (Robinson y Stotz, 1954 y AOAC, 1980).....	154
4	Determinación del valor de peróxido en aceites y grasas (ISO 3960 e IUPAC 2.501).....	158
5	Formulación de emulsiones de licopeno.....	160
6	Análisis estadístico.....	161
7	Productividad.....	170
8	Copia del artículo científico resultado de la tesis de doctorado.....	171

México es el principal país exportador de jitomate a Estados Unidos y en el ciclo otoño-invierno es cuando exporta aproximadamente el 50 % de la producción nacional. Sin embargo, cuando la producción interna de Estados Unidos es suficiente, la demanda del jitomate mexicano de exportación disminuye, ocasionando una sobreoferta y baja de precio de la hortaliza en zonas de producción y centrales de abasto de nuestro país. Estos excedentes de jitomate cv Saladette se pueden aprovechar en la obtención de los pigmentos carotenoides presentes, principalmente del licopeno para su uso como antioxidante, colorante natural y como complemento nutricional o para la preparación de un alimento funcional mediante la incorporación de licopeno en una emulsión aceite-en-agua.

Estudios epidemiológicos, reportan al licopeno como un micronutriente con importantes beneficios a la salud, debido a que parece proveer protección contra un amplio tipo de cánceres epiteliales (próstata, pulmón, estómago y enfermedades del corazón). El licopeno es considerado como un indicador nutricional de buenos hábitos dietéticos y estilos de vida saludables, por lo que es identificado como un ingrediente nutracéutico, ya que proporciona beneficios a la salud del consumidor más allá de los que ofrecen los alimentos convencionales.

El procesado térmico como el escaldado, esterilización y deshidratación causan pérdidas de este pigmento y aumentan los isómeros *cis*. El escaldado es necesario para inactivar las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasa, las cuales afectan la calidad de los productos procesados del jitomate y extracción del licopeno. Sin embargo, elevadas temperaturas y tiempo de exposición al calor, luz y oxígeno afectan la estabilidad del carotenoide.

Por otra parte, los industriales han adquirido gran interés por los colorantes naturales entre ellos el licopeno, debido al rechazo de los colorantes sintéticos por parte de los consumidores. También en la industria se puede utilizar como antioxidante en lípidos, considerando que la oxidación de los lípidos es una de las

principales causas del deterioro de la calidad de alimentos. Esta oxidación afecta características de calidad como sabor, color, textura y valor nutritivo de los alimentos.

Este pigmento lipofílico se puede disolver en una fase dispersa de aceite en una emulsión aceite-en-agua (O/W) para mejorar su biodisponibilidad. Además estas emulsiones enriquecidas con el carotenoide pueden ser potenciales para aplicarse en sistemas alimenticios. También es importante considerar el tipo de emulsificante a utilizar en las emulsiones para prolongar su vida útil. El propósito de utilizar emulsiones es la necesidad de depositar componentes lipofílicos funcionales (licopeno) en una forma comestible y que se pueda aprovechar en el sector alimentario, farmacéutico y de salud. Este tipo de emulsiones es posible que incrementen la biodisponibilidad y bioactividad del carotenoide.

Para evaluar el efecto antioxidante del licopeno en una fase lipídica se puede utilizar un aceite vegetal (aceite de canola) y determinar la formación de hidroperóxidos mediante el valor de peróxidos. Con respecto a la estabilidad del pigmento en hexano como en la fase lipídica se puede determinar mediante cinéticas de degradación de primer orden. Así como, determinar la vida media del licopeno a factores como iluminación, temperatura, adición de antioxidantes y escaldado.

En las emulsiones aceite-en-agua, el licopeno en la fase dispersa (aceite de canola) puede mejorar su biodisponibilidad. La estabilidad del licopeno dependerá del tipo de emulsificante utilizado. El suero de leche (proteínas) y la goma arábiga (polisacárido) son emulsificantes naturales que permiten una adecuada estabilización de las emulsiones de licopeno. Estas emulsiones pueden disolverse en sistemas alimentarios y así obtener alimentos funcionales. La estabilidad del carotenoide en las emulsiones con los dos tipos de emulsificantes, se puede evaluar por cinéticas de degradación de una ecuación de primer orden. La estabilidad de la emulsión es mediante ausencia de coalescencia o agregación (no hay incremento del tamaño de partícula).

2.1 Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

El jitomate o tomate rojo es una planta nativa de América tropical que ha alcanzado su mayor importancia y desarrollo fuera de su área de origen y de los trópicos. En los últimos años Estados Unidos y Europa han introducido cultivares mejorados, en particular los tipo híbridos que han ido eliminando los cultivares nativos de inferior calidad. El origen del jitomate se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú) y donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres. Sin embargo, México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación del jitomate. La palabra tomate proviene del náhuatl "tomatl". Esta hortaliza en 1554 fue llevada a Europa por los españoles y se empezó a comercializar en Estados Unidos de América en 1835 (Galicia, 2007).

En México, como en otras partes del mundo la preferencia es por el consumo de jitomate en fresco más que procesado; aunque en los últimos años debido a los avances tecnológicos y gustos y costumbres de las nuevas generaciones, la demanda de los productos del jitomate como jugos, purés, pastas y salsas ha ido en aumento. Sobre todo que recientes estudios epidemiológicos indican que el consumo de estos productos ricos en licopeno son de gran beneficio para la salud, ya que este carotenoide se considera un micronutriente con propiedades nutraceuticas relacionadas con la prevención del cáncer en diferentes órganos tal como próstata, tracto digestivo y pulmón, así como disminución del riesgo a enfermedades cardiovasculares (Heber y Lu, 2002; Boileau y col., 2002). Estas propiedades benéficas del caroteno son debidas a su estructura poliénica acíclica (once dobles enlaces conjugados), la cual le proporciona la habilidad para proteger contra el daño oxidativo y neutralizar los radicales libres. El licopeno comprende entre el 80 al 90% de los carotenoides presentes en el jitomate y puede ser utilizado como complemento nutricional o como colorante natural (Shi y Le Maguer, 2000). Por otra parte, debido a los problemas toxicológicos que se tienen con los colorantes artificiales, ha aumentado el interés por los colorantes naturales en la industria

alimentaria, farmacéutica y de cosméticos. Algunos colorantes naturales que se utilizan en la industria son antocianinas, betalainas, clorofila, curcumina y carotenoides como bixina y crocetina (Bouvier y col., 2003; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003; Humphrey, 2004; Wrolstad, 2004).

2.1.1 Producción nacional e importancia comercial

En México en el 2007, el cultivo del jitomate fue considerado como la segunda hortaliza más importante de acuerdo a su valor de producción de 11, 527, 680.04 miles de pesos y ocupó el tercer lugar con respecto a su superficie sembrada de 66, 635.31 Ha (SIAP, 2009). Los principales estados productores y que aportaron el 67.75% de la producción nacional en 2007 fueron Sinaloa, Michoacán, Baja California, Jalisco, Baja California Sur y San Luis Potosí (Cuadro 1). Para este mismo año, en el ciclo otoño-invierno se obtuvo el 53.03% de la producción nacional de jitomate y es en este período cuando Sinaloa, Baja California, Nayarit y Sonora exportan la mayor parte de su producción a Estados Unidos de América (SIAP, 2009).

Cuadro 1. Producción nacional de jitomate en 2007.

Estado	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Participación (%)
Sinaloa	19,548.25	18,820.25	827,010.94	34.10
Michoacán	6,489.00	6,463.00	224,897.00	9.27
Baja California	3,370.80	3,317.80	196,388.03	8.10
Jalisco	2,683.54	2,674.54	141,796.28	5.84
Baja California Sur	3,457.50	3,261.25	132,873.29	5.48
San Luis Potosí	3,725.00	3,593.50	120,289.40	4.96
Los demás	2,7361.22	26,649.07	782,146.95	32.25
Nacional	66,635.31	64,779.41	2,425,402.77	100.00

Adaptado del Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, 2007. SIAP, 2009.

Las exportaciones de jitomate fueron de 683 y 668 mil ton para 2004 y 2005 respectivamente (SNIIM, 2007), mientras que la producción aumento 5.2 y 16.7% para los mismos años considerando la producción de 2003 (SIAP, 2007); lo anterior ocasionó una sobreoferta de producto y baja de precio. Una alternativa para el aprovechamiento del excedente de jitomate es la obtención de los pigmentos carotenoides presentes, principalmente del licopeno para su uso como colorante natural y complemento nutricional.

2.1.2 Biología

El jitomate pertenece a la familia de las Solanáceas del género *Lycopersicon* y especie *esculentum*, la parte comestible de la planta es el fruto o baya climatérica, la cual está constituida por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Figura 1). La epidermis es una capa de células de paredes externas engrosadas por la cutícula, ésta contiene ácidos cuticulares y ceras que permiten al fruto ser resistente a enfermedades y ataques de insectos. Justo debajo de la piel o epicarpio se encuentra la pulpa roja carnososa (mesocarpio y endocarpio) rica en licopeno. En la parte central de la pulpa se encuentran las haces vasculares de color amarillo; las cavidades locales contienen las semillas embebidas en el parénquima gelatinoso (Galicia, 2007).

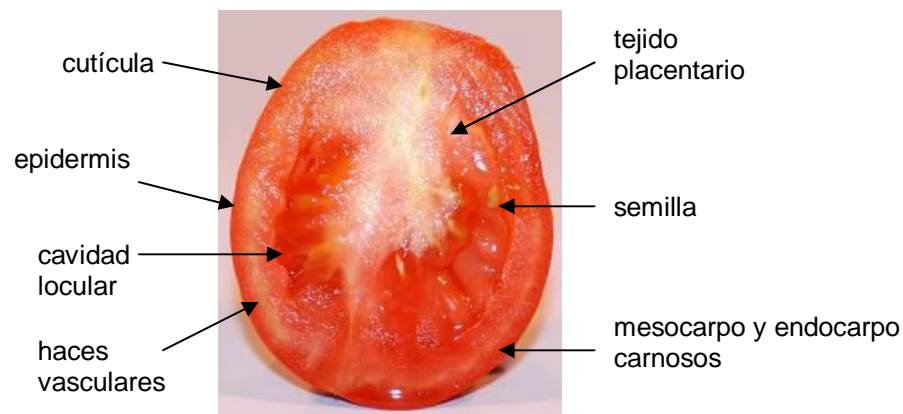


Figura 1. Anatomía del jitomate (sección longitudinal).

La maduración del fruto está caracterizada por bastantes cambios fisiológicos, incluyendo la suavidad del fruto, acumulación de azúcares y la producción de químicos asociados con el aroma, color y sabor (Bruno y Wetzal, 2004). El licopeno es el carotenoide más abundante en el jitomate maduro, comprende del 80 al 90% de los pigmentos presentes en el fruto y depende de la variedad, grado de madurez y prácticas de cultivo (Shi y Le Maguer, 2000). Estos mismos investigadores así como Kaur y col. (2004) reportaron que el jitomate en promedio contiene vitamina C (160-240 mg/kg), licopeno (60-90 mg/kg) y ácidos fenólicos (ácidos ferúlico, clorogénico y cafeíco, 10-50 mg/kg). También están presentes en pequeñas cantidades: vitamina E (5-20 mg/kg), flavonoides (quercetina, 5-50 mg/kg) y trazas de elementos como cobre (0.01-0.09 mg/kg), magnesio (0.1-0.17 mg/kg) y zinc (0.1-0.17 mg/kg), los cuales se han encontrado por ser constituyentes de varias enzimas antioxidantes. Los compuestos antioxidantes tienen una distribución heterogénea en el fruto. La concentración del licopeno es dos veces mayor en el pericarpio que en la cavidad locular y el β -caroteno es cuatro veces más elevado en la cavidad locular que en el pericarpio. Los flavonoides y ácidos fenólicos parece que están más concentrados en la piel que en la pulpa, y la vitamina E parece estar localizada en las semillas.

2.1.3 Valor nutricional

La composición química del jitomate es afectada por la variedad, estado de madurez, condiciones climáticas, temperatura, luz y condiciones de cultivo. Los sólidos totales del fruto varían de 5 a 10%, con un valor promedio de 6%. Aproximadamente la mitad de los sólidos son azúcares reductores. La concentración de sacarosa no es importante en el jitomate y raramente excede de 0.1%. Una cuarta parte de los sólidos totales son ácidos (cítrico, málico y amino dicarboxílico), lípidos y minerales. El restante cuarto de los sólidos totales puede ser separado como sólidos insolubles en alcohol y son proteínas, sustancias pécticas, celulosa y hemicelulosa (Barringer, 2004).

El jitomate se considera alimento sano debido a que es bajo en calorías y grasas, libre de colesterol, fuente de fibra, provitamina A (0.38 mg/100g), vitamina C

(15 mg/100g), potasio (280 mg/100g), fósforo (24 mg/100g), sodio (1.2 mg/100g), calcio (10 mg/100 g), magnesio (10 mg/100g), rico en licopeno y trazas de β -caroteno (Cano y col., 2005. Cuadro 2). Esta hortaliza en México es muy popular y se utiliza en la mayoría de los alimentos como ensaladas, carnes, sopas y salsas.

Cuadro 2. Composición del jitomate basada en 100g de material comestible.

Hortaliza	Agua (g)	Kilocalorías	Grasa (g)	Proteína (g)	Hidratos de carbono (g)	Fibra Dietética (g)
Jitomate	94	18	0.2	0.9	3.9	1.2

Adaptado de Cano y col., 2005.

2.2 Pigmentos carotenoides

Los carotenoides comprenden pigmentos naturales solubles en grasa y se encuentran en numerosas frutas y hortalizas. El color amarillo, anaranjado y rojo en diversas frutas y flores es debido a los cromoplastos que contienen carotenoides, los cuales están generalmente libres de clorofila. Considerables cantidades de estos pigmentos se encuentran en las partes verdes de las plantas incluyendo en las hojas en donde la clorofila los enmascara. Los carotenoides también se encuentran en animales como pájaros, insectos, peces y crustáceos. Sin embargo, los humanos y animales no pueden sintetizar carotenoides y dependen de una dieta complementaria (Stahl y Sies, 2005). Estudios epidemiológicos reportan que el consumo de una dieta rica en carotenoides ocasiona un riesgo menor a diversas enfermedades y tipos de cáncer (Burns y col., 2003).

2.2.1 Estructura y clasificación

Los carotenoides son pigmentos naturales que se sintetizan en plantas, organismos fotosintéticos y en algunos no fotosintéticos como bacterias, levaduras y

hongos. A la fecha, más de 600 carotenoides han sido aislados e identificados y son tetraterpenoides C₄₀ liposolubles formados de 8 unidades de isopreno (Figura 2).

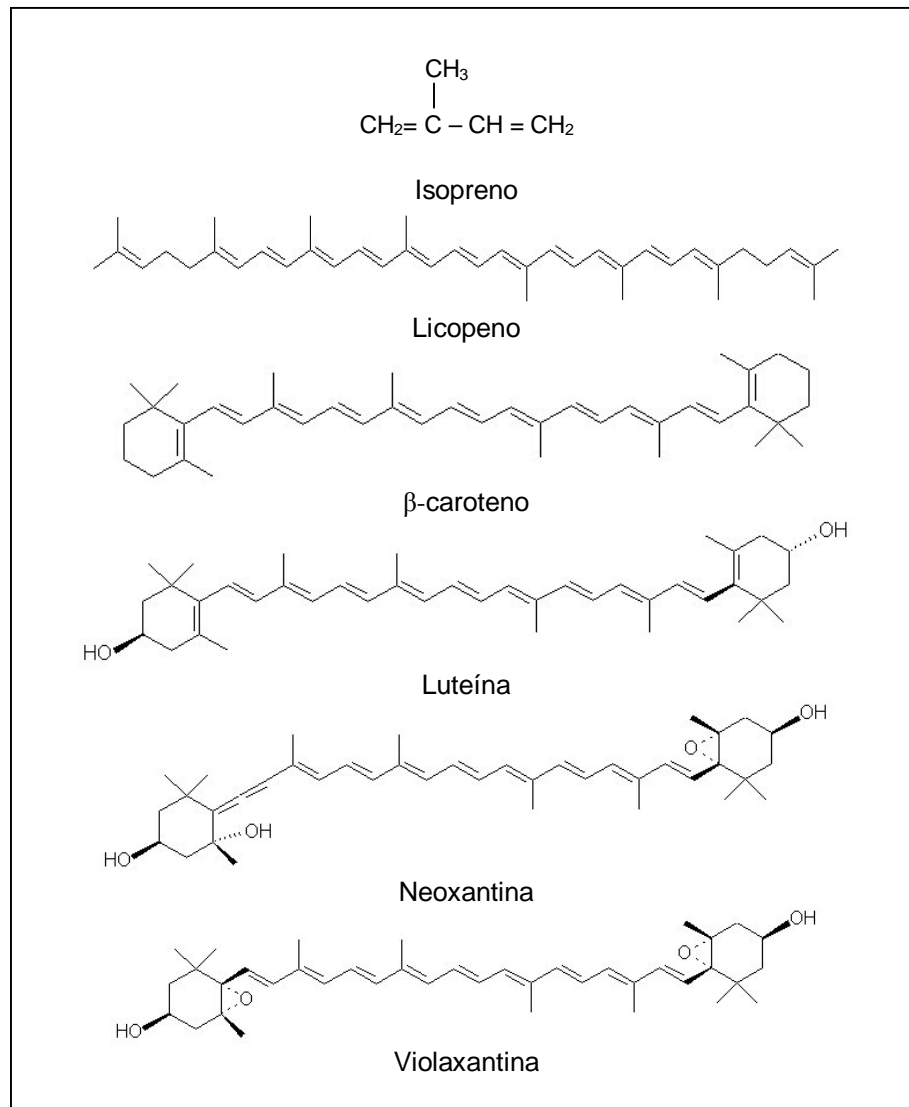


Figura 2. Molécula de isopreno y estructura de algunos carotenoides cíclicos y acíclicos.

De acuerdo a su composición química los carotenoides se clasifican en carotenos y xantofilas. El β -caroteno, α -caroteno y licopeno son miembros

importantes del grupo de los carotenos, el cual incluye carotenoides compuestos sólo de átomos de carbono e hidrógeno, mientras que el grupo de las xantofilas, tienen al menos un átomo de oxígeno, lo que los hace más polares que los primeros. Zeaxantina, luteína, α y β -criptoxantina, cantaxantina y astaxantina son importantes xantofilas con grupos hidroxilo y ceto como elementos estructurales. Pueden ser acíclicos como el licopeno o con anillos de cinco o seis miembros (ionona) en uno o ambos extremos de la molécula como es el caso del β -caroteno o luteína (Figura 2) (Dey y Harborne, 1997; Stahl y Sies, 2005).

2.2.2 Biosíntesis de carotenoides

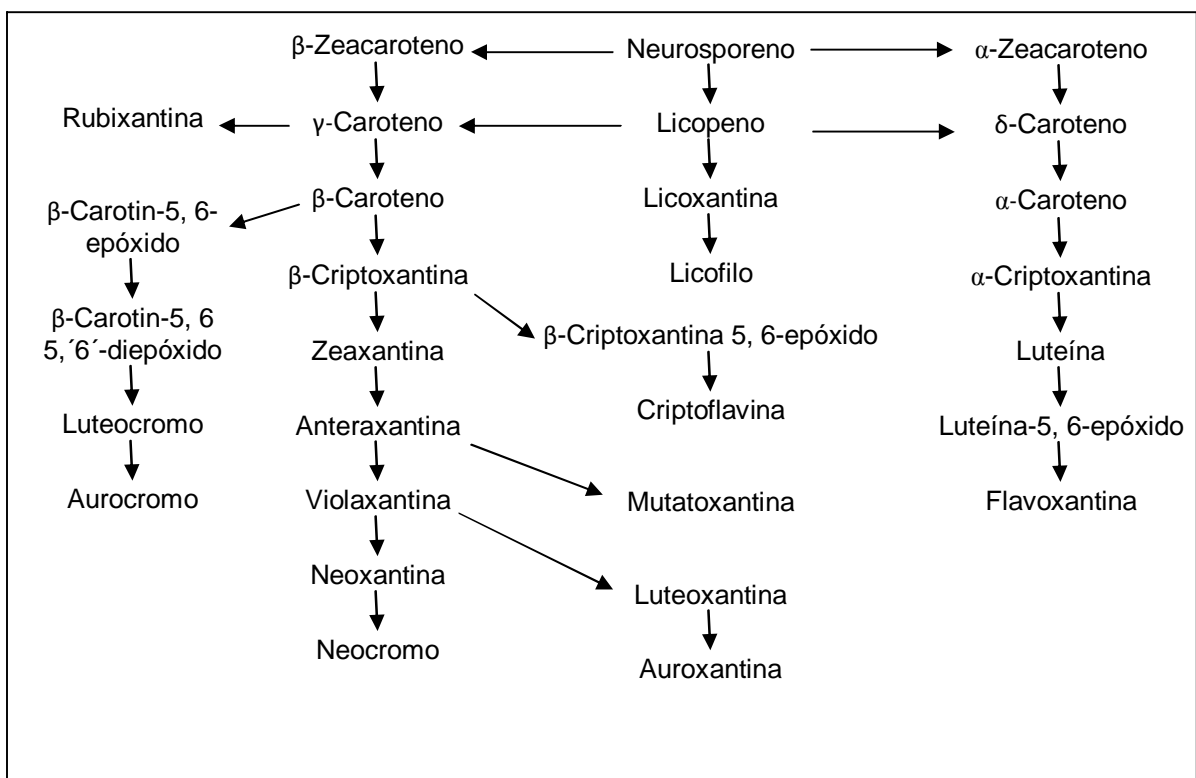


Figura 3. Reacciones de transformación durante la biosíntesis de carotenoides.

Los carotenoides son compuestos pertenecientes al grupo de los isoprenoides o terpenoides, todos ellos derivados de una molécula de cinco carbonos que es el isopreno. Esta molécula en su forma reactiva, isopentil pirofosfato (IPP), se condensa

en su propio isómero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para producir inicialmente el geranil pirofosfato (GPP), posteriormente el farnesil pirofosfato (FPP) y finalmente el geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Las unidades se van uniendo conforme un patrón cabeza-cola hasta antes de la formación de GGPP, la cual se origina de la unión cola-cola de dos moléculas de GPP para producir un compuesto de 40 carbonos con el orden invertido en el centro, el cual da origen al fitoeno, primer carotenoide producido en la ruta, que es incoloro. La insaturación posterior de la cadena hidrocarbonada produce dobles enlaces conjugados, lo que le da a la molécula la capacidad de absorber luz de ciertas longitudes de onda y provocar la pigmentación de los organismos o tejidos que los contienen (Del Villar-Martínez y col., 2007). El fitoeno da lugar al fitoflueno y ésta a su vez al ζ -caroteno y este carotenoide al neurosporeno. Todos los carotenoides son derivados de la unidad acíclica (isopreno) por diferentes reacciones que involucran hidrogenación, deshidrogenación, ciclización u oxidación (Graßmann, 2005; Figura 3).

2.2.3 Isómeros de carotenoides

Los carotenoides debido a que son hidrocarburos poliinsaturados con carbonos con dobles enlaces conjugados, permiten que cada doble enlace de la cadena poliénica pueda existir en dos configuraciones: los isómeros geométricos *trans/cis* (*E/Z*). El doble enlace *cis* ocasiona impedimento estérico entre los átomos de hidrógeno y grupos metilo más cercanos, por lo que los isómeros *cis* son termodinámicamente menos estables que la forma *trans*. La mayoría de los carotenoides se encuentran en la naturaleza en la forma *all-trans* pero varios isómeros *cis* se encuentran en sangre y tejidos de animales (Dey y Harborne, 1997; Stahl y Sies, 2005).

En soluciones homogéneas los carotenoides tienden a isomerizarse y formar una mezcla de mono- y poli-*cis* isómeros además de la forma *all-trans*. Aspectos energéticos y estereoquímicos determinan el patrón del isómero. Cuando el pigmento

se incorpora en la composición de un alimento, el carotenoide se vuelve más resistente a la isomerización (Stahl y Sies, 2005).

2.2.4 Distribución

2.2.4.1 Tejidos fotosintéticos

Los carotenoides se acumulan en todos los tejidos fotosintéticos de todas las plantas superiores. Los carotenos y xantófilas se encuentran en las hojas como β -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina (Figura 2) y en menor proporción α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina y 5,6-epóxido-luteína. En general los carotenos comprenden alrededor del 25% del total de los carotenoides mientras que la luteína es del 45%. Durante la senescencia de la hoja los cloroplastos se desintegran y la esterificación de las xantófilas se lleva a cabo.

En cloroplastos fotosintéticamente activos, los carotenoides son parte de los complejos proteína-pigmento en las membranas de los tilacoides. La matriz compleja I (CCI) contiene un β -caroteno por 40 moléculas de clorofila a, mientras que el complejo I proteína-clorofila colectora de luz (LHCI) está asociado con luteína, violaxantina y neoxantina. β -caroteno está también en la matriz compleja II (CCII), mientras que el complejo II proteína-clorofila colectora de luz contiene xantófilas. Pequeñas cantidades de carotenoides están en la envoltura de los cloroplastos y amiloplastos. En la membrana de los plástidos el principal carotenoide es la violaxantina.

2.2.4.2 Tejidos no fotosintéticos

Los carotenoides en pétalos de flores pueden ser divididos en tres grupos: a) carotenoides altamente oxigenados tal como auroxantinas y flavoxantinas; b) carotenos, algunas veces en altas concentraciones por ejemplo β -caroteno en narcisos y c) especies específicas, por ejemplo crocetina en azafrán. Los carotenoides en flores están frecuentemente esterificados.

La distribución de los carotenoides en frutas es extremadamente compleja y sujeta a considerable variación. Patrones característicos de cada especie y variedad a menudo se presentan en cada etapa de la madurez y puede variar de poco hasta a 50 % en frutas cítricas. Su biosíntesis es autónoma en la mayoría de las frutas y continúa después que la fruta ha sido removida de la planta madre. Las frutas inmaduras (verdes) contienen los mismos pigmentos como otros tejidos fotosintéticos pero sobre la maduración los cloroplastos se transforman en cromoplastos, y hay a menudo, pero no siempre, síntesis de carotenoides.

Las frutas se pueden clasificar en ocho grupos de acuerdo al contenido de carotenoides: (i) cantidades insignificantes, p.e. fresa, (ii) grandes cantidades de cloroplastos-carotenoides p.e arándano; (iii) grandes cantidades de licopeno, sus derivados hidroxilo y más carotenoides saturados, p.e. jitomate; (iv) grandes cantidades de β -caroteno y sus derivados hidroxilo, p.e. durazno; (v) grandes cantidades de epóxidos de carotenoides, p.e. carambola; (vi) carotenoides inusuales p.e. capsantina en pimiento rojo; (vii) poli-*cis* carotenoides p.e. prolicopeno en tomate-tangerina y (viii) apocarotenoides p.e. persicaxantina en especies *Citrus* (Dey y Harborne, 1997).

La mayoría de las semillas tienen solo trazas de carotenoides, con excepción del maíz que contiene grandes cantidades de β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina. En el caso de carotenoides en raíces está el β -caroteno en zanahorias y camotes (Dey y Harborne, 1997; Burns y col., 2003).

2.2.5 Funciones en plantas

Los carotenoides realizan tres funciones principales en plantas:

2.2.5.1 Pigmentos accesorios para recolectar luz

Los carotenoides son importantes componentes de las antenas colectoras de luz. Con pocas excepciones, los cloroplastos de todas las especies contienen una

colección de principales carotenoides como β -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina, estos pigmentos absorben luz entre 450 y 570 nm por tanto expanden el espectro de absorción de la fotosíntesis y aumentan su efectividad. Es importante que los carotenoides estén localizados cerca de las moléculas de clorofila para asegurar una transferencia de energía de manera efectiva. Los principales carotenoides con esta función son xantofilas: luteína, violaxantina y neoxantina (Graßmann, 2005).

2.2.5.2 *Prevención de daño fotooxidativo*

El estado triplete excitado de la clorofila, generado por el aparato fotosintético, puede iniciar los procesos de fotooxidación vía el oxígeno en singulete y dañar el sistema fotosintético. Las moléculas con nueve o más dobles enlaces conjugados pueden absorber la energía de la clorofila en estado triplete o del oxígeno en singulete y de esta manera evitan la generación del daño por el oxígeno en singulete. Durante el ciclo de las xantofilas se manifiesta el papel protector de éstas al remover el exceso de energía desde las antenas fotosintéticas. Bajo condiciones de exceso de energía en excitación, se acumula zeaxantina desde violaxantina vía dos etapas de-epoxidación. La acumulación permite una rápida extinción no fotoquímica de la fluorescencia clorofílica.

Bajo ciertas condiciones, se puede restringir la capacidad fotosintética mediante el ciclo de las xantofilas que pueden prevenir el daño por dispersión del exceso de luz; lo que indica un incremento en el ciclo de las xantofilas (por ejemplo las hojas de las espinacas).

2.2.5.3 *Pigmentación para atraer animales para efectuar la polinización y dispersión de semillas*

Los carotenoides no sólo se localizan en cloroplastos sino también en cromoplastos donde contribuyen a los colores rojo, anaranjado y amarillo de las frutas o flores. Sin embargo, otros compuestos como antocianinas solubles en agua

también contribuyen al color de las frutas y flores. El verde de la clorofila enmascara los colores amarillo y rojizo pero éstos son revelados en las hojas de los árboles en el otoño.

En humanos, los carotenoides juegan un papel importante en la salud. La función del retinol (vitamina A) en la visión ha sido ampliamente conocida por largo tiempo. El retinol es formado principalmente por segmentación simétrica del β -caroteno. Alrededor de 50 carotenoides pueden funcionar como provitamina A, algunos de los más importantes son α -caroteno, β -critoxantina y β -caroteno. Se ha sugerido que los carotenoides son agentes quimiopreventivos en frutas y hortalizas; ya que hay varios mecanismos por los cuales los carotenoides pueden prevenir enfermedades (Graßmann, 2005).

2.2.6 Propiedades antioxidantes de los carotenoides

Los carotenoides son posiblemente los más involucrados en la expulsión o eliminación del oxígeno singulete y radicales peróxido. Adicionalmente, pueden desactivar moléculas sensibilizadoras, las cuales están involucradas en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Un ejemplo es la clorofila triplete, la cual emerge durante la fotosíntesis y puede iniciar los procesos fotooxidativos.

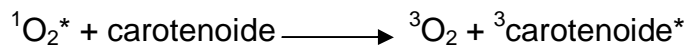
2.2.6.1 Neutralización del oxígeno singulete

La neutralización del oxígeno singulete por los carotenoides puede presentarse vía neutralización física o química. La neutralización física involucra la transferencia de energía de excitación del $^1\text{O}_2$ al carotenoide, resultando en un oxígeno estado desarrollado y un carotenoide en estado triplete excitado como se explica más adelante. Las constantes de velocidad para la reacción de los carotenoides con el oxígeno singulete están en el intervalo de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El β -caroteno y otros carotenoides son los más eficientes neutralizadores naturales del

oxígeno singulete. Su actividad neutralizadora está muy relacionada con el número de dobles enlaces conjugados presentes en la molécula (Stahl y Sies, 2005).

El oxígeno singulete puede ser generado por la energía de un electrón transferido desde el estado excitado de un sensibilizador al oxígeno. Los sensibilizadores pueden ser clorofilas, riboflavina, porfirinas, y otros; pueden inducir la producción de oxígeno singulete en sistemas biológicos y consecuentemente pueden conducir al daño de proteínas, lípidos, DNA y otras moléculas biológicas. Por tanto, es benéfico para las plantas poseer carotenoides, los cuales son los más efectivos neutralizadores del oxígeno singulete encontrados en la naturaleza.

El mejor ejemplo de una acción antioxidante de carotenoides involucra la habilidad de estos pigmentos para neutralizar o inactivar el oxígeno singulete excitado ($^1\text{O}_2$). El mecanismo de fotoprotección involucra un intercambio de electrón y la energía se transfiere entre el oxígeno singulete y un carotenoide para generar un estado triplete del carotenoide (^3CAR) y causa un estado de oxígeno ($^3\text{O}_2$):



El (^3CAR) formado puede retornar a su estado original por pérdida de su energía a través de interacciones vibracionales y rotacionales con el sistema solvente:



El carotenoide surge sin alteración de esta reacción, listo para iniciar otro ciclo de neutralización del oxígeno singulete. Se ha estimado que cada carotenoide puede neutralizar 1000 moléculas de oxígeno singulete antes de reaccionar químicamente. Esta neutralización química es la responsable de la destrucción de la molécula (Krinsky y Johnson, 2005; Graßmann, 2005).

2.2.6.2 Eliminación de peróxidos y otros radicales

Los radicales peróxido son intermediarios del proceso de peroxidación lipídica (LPO), el cual es caracterizado por una reacción en cadena de radicales. Este proceso puede ser interrumpido por antioxidantes que rompen la cadena, los cuales están disponibles para reaccionar con los radicales lipoperóxido. Los antioxidantes rompe cadenas son por ejemplo tocoferoles, fenoles o ácido ascórbico. Una importante característica de ellos es que el radical antioxidante resultante es poco reactivo para propagar la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. El radical antioxidante puede ser removido por reacción con otro radical y por lo tanto formar un producto estable. Otro destino común del radical antioxidante es que puede ser reciclado por otro antioxidante. Los carotenoides pueden actuar como antioxidantes rompe cadenas por tres vías: transferencia de electrón, separación de hidrógeno o adición de radical. Sobre cuál de estas vías sigue su curso principalmente, depende de la estructura del carotenoide, del ambiente y sistema utilizado para valorar la actividad antioxidante. Es improbable por ejemplo, que la transferencia del electrón tenga lugar en un ambiente altamente lipofílico, donde esto no facilita la carga-separación. Un punto importante es que la actividad antioxidante de los carotenoides puede ser convertido en una actividad prooxidante a alta presión de oxígeno. En un intervalo fisiológico de presión de oxígeno, la reacción de radicales peróxido con carotenoides conducirá a una estructura de estabilidad-transferencia de electrón (resonancia) que finalizará con procesos de peroxidación; en vista que la tensión de oxígeno se incrementa el radical carotenoide reaccionará con el oxígeno, por tanto producirá radicales, los cuales están disponibles para propagar la peroxidación. Sin embargo, más datos indican que el efecto prooxidante sólo aumenta a 100% de oxígeno y no en condiciones ambientales (21% de oxígeno) o en concentraciones fisiológicas o de tejido (1-2% de oxígeno). En investigaciones recientes, se ha encontrado que el β -caroteno provee similar protección antioxidante bajo una atmósfera de aire (150 torr O_2) y bajo condiciones fisiológicas (15 torr O_2). Por lo que hay poca evidencia sobre la tesis que el β -caroteno puede actuar como prooxidante en el cuerpo (Graßmann, 2005).

2.2.6.3 *Productos de oxidación de los carotenoides*

Debido a la diversidad de carotenoides es obvio que por diferentes reacciones de oxidación se generarán una gran variedad de productos de oxidación. Éstos probablemente estén como metabolitos *in vivo*; por lo tanto, no sólo los carotenoides deben ser tomados en cuenta sino también sus productos de la oxidación o segmentación. Los epóxidos o apo-carotenoides son algunos de los productos de la oxidación que han sido detectados. Estos compuestos pueden tener actividades biológicas y pueden interferir con una variedad de señales de las vías, es el caso del deterioro de la respiración mitocondrial. El producto más potente de la oxidación de un carotenoide es el ácido retinoico obtenido por desdoblamiento enzimático del β -caroteno (Graßmann, 2005).

2.2.6.4 *Actividad antioxidante de los carotenoides in vitro*

2.2.6.4.1 *Reactividad al oxígeno singulete*

El primer mecanismo detectado en el cual los carotenoides actúan como antioxidantes fue la habilidad para neutralizar el oxígeno singulete. Y se ha encontrado que al aumentar los dobles enlaces del carotenoide aumenta su habilidad para neutralizar el oxígeno singulete, es el caso de la luteína (n=10) y la zeaxantina (n=11). Por otra parte, Di Mascio y col. (1992) reportaron que el licopeno presenta velocidades de neutralización más elevadas que aquéllas del β -caroteno, posiblemente se deba a que el anillo abierto de la β -ionona tenga un efecto positivo sobre la neutralización del oxígeno singulete (1O_2). Es importante señalar que depende de las técnicas empleadas en la determinación de las constantes de velocidad. Se ha reportado que los carotenoides son extremadamente buenos neutralizadores del oxígeno singulete *in vitro*, pero se ha investigado poco sobre como ellos protegen la célula contra el daño relacionado con el oxígeno singulete.

2.2.6.4.2 *Reactividad a diferentes especies de radicales*

La actividad antioxidante del carotenoide puede ser estudiada siguiendo la decoloración del pigmento o el análisis de los productos de oxidación del carotenoide

durante o después de su reacción con diferentes especies de radicales. Este proceso involucra la interrupción del sistema de dobles enlaces conjugados ya sea por eliminación o adición a uno de los dobles enlaces. La eliminación puede ser detectada por caracterizar los productos que son formados, los cuales frecuentemente son carbonilos o epóxidos.

Krinsky y Johnson (2005) reportan que al menos hay tres mecanismos para la reacción de los carotenoides con especies de radicales (Figura 4): (1) Adición de un radical, (2) Transferencia de un electrón al radical y (3) Separación de un hidrógeno alílico.

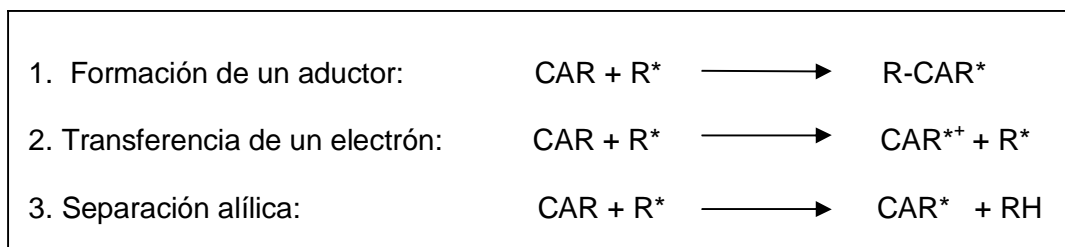
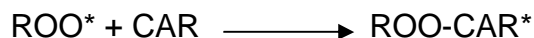


Figura 4. Tres posibles reacciones de carotenoides con especies de radicales (R^*).

Estos mismos investigadores propusieron que el radical peróxido lipídico (ROO^*) puede adicionarse en cualquier lugar de la cadena poliénica de un carotenoide, resultando en la formación de una resonancia estabilizada de radical-centrado-carbono ($ROO-CAR^*$). Donde este radical es completamente estable, podría interferir con la etapa de propagación en la peroxidación lipídica y explicaría muchos ejemplos del efecto antioxidante de carotenoides en solución.



Sin embargo, las reacciones subsecuentes del $ROO-CAR^*$ aún no son bien entendidas (Krinsky y Johnson, 2005). Choe y Min (2006) reportaron que el β -caroteno (provitamina A) reacciona con especies reactivas del oxígeno (ROS) tal

como radicales hidroxilo y peróxido y oxígeno singulete (Figura 5). El radical peróxido puede sustraer un hidrógeno del β-caroteno o adicionárselo. Los potenciales de reducción del β-caroteno y radical peróxido son 542 mV y 1000 mV respectivamente. El β-caroteno (Car) puede donar un hidrógeno a los radicales peróxido y formar un radical caroteno (Car●). El radical caroteno sufre repetidas reacciones de adición de oxígeno y sustracción de radicales y produce epóxidos de caroteno y compuestos carbonilo de carotenos (Choe y Min, 2006; Figura 5). La oxidación de los carotenoides por ROS causa la pérdida de su color característico.

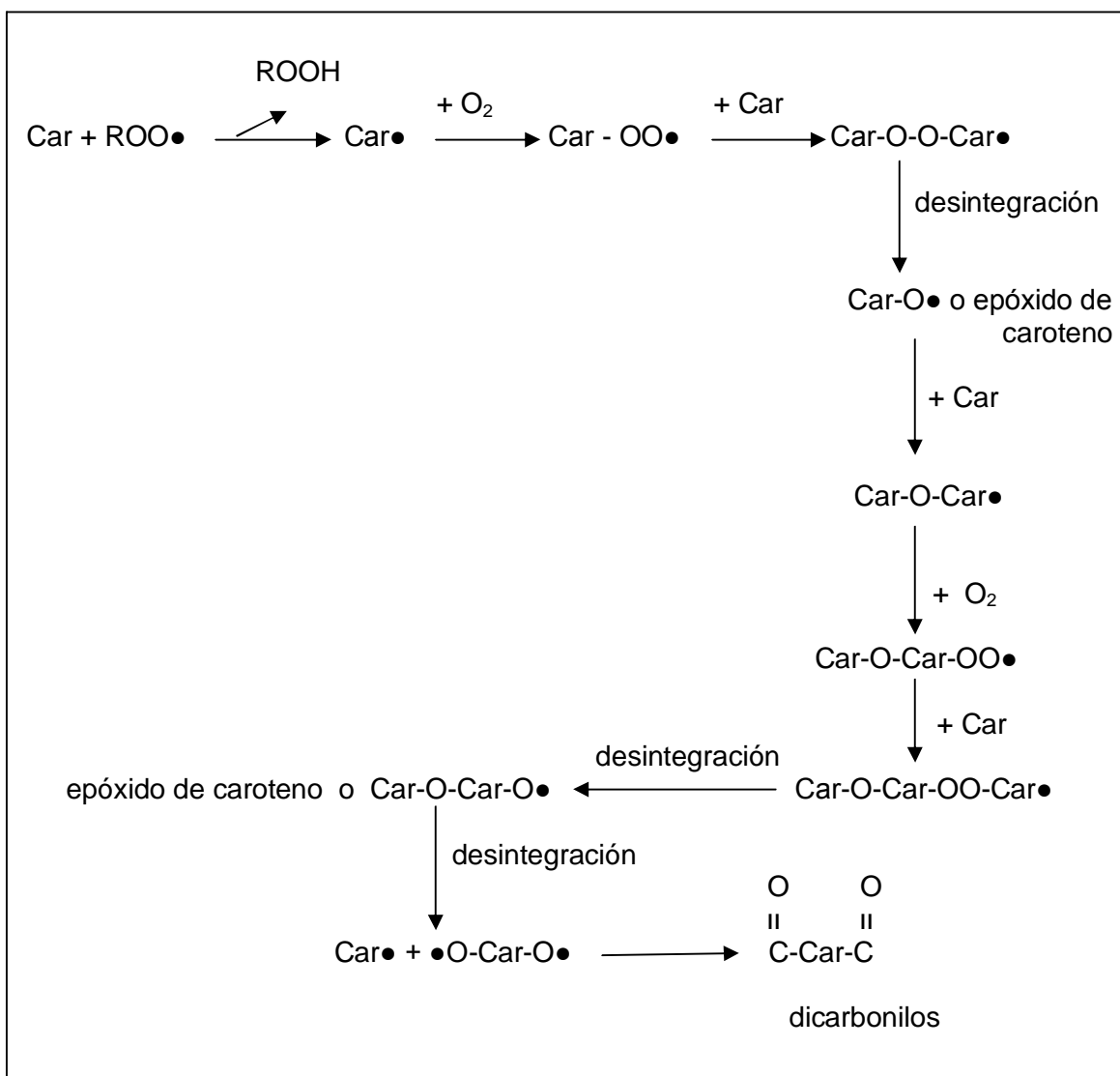


Figura 5. Oxidación del β-caroteno por radical peróxido a través del radical caroteno

También se han reportado reacciones de transferencia de electrón, dando lugar a la formación del radical catión carotenoide $CAR^{+\bullet}$. Cuando los carotenoides reaccionan con la lipoxidasas de la soya en presencia de ácidos grasos insaturados, se presenta una cooxidación con la constante formación de una serie de carbonilos volátiles. Similares compuestos se han observado siguiendo la autooxidación del β -caroteno o cuando el β -caroteno es tratado con compuestos iniciadores de radicales. Algunos de estos derivados carbonilo son: β -apo-8'-carotenal, β -apo-10'-carotenal, β -apo-12'-carotenal, β -apo-14'-carotenal, β -apo-15-carotenal (retinal), β -apo-13-carotenona (C_{18} quetona), β -ionona (Krinsky y Johnson, 2005).

Diferentes investigaciones confirman que los carotenoides son moléculas disponibles para atrapar el oxígeno y/o radicales orgánicos libres. La luteína además de atrapar radicales oxígeno también elimina radicales sulfuro. El β -caroteno con radicales fenóxilo resulta en la formación de un radical catión β -caroteno. Los radicales fenóxilo son importantes especies en los sistemas biológicos y son formados cuando los antioxidantes fenólicos reaccionan con radicales peróxido y alcóxido; el radical tocoferol representa el más importante radical fenóxilo en sistemas biológicos (Graßmann, 2005).

De acuerdo a las especies de radicales, la acción de los carotenoides seguirá diferentes mecanismos: el proceso de transferir o adicionar un electrón tendrá lugar. Graßmann (2005) reportó que Mortensen y col. en 2001 clasificaron las especies de radicales en dos grupos: 1) Aquéllos que causan transferencia de electrón como $^{\bullet}CCl_3$, $^{\bullet}OCCl_3$, RSO_2^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , $C_6H_6O^{\bullet}$ y radicales tocofenoxilo. 2) Aquéllos que presentan procesos de adición como RS^{\bullet} , L^{\bullet} , LOO^{\bullet} y $O^{2-\bullet}$.

En estudios *in vitro* realizados con varios carotenoides en presencia de prooxidantes como NaOCl, foto-irradiación, luz UV y Rosa de Bengala como fotosensibilizador, se encontró que el rompimiento del licopeno y β -caroteno fue más rápido que el de luteína y zeaxantina en todos los sistemas. La elevada actividad

antioxidante del licopeno en la “oxidación inducida- con luz” , reafirma que este carotenoide es un efectivo neutralizador del oxígeno singulete y es posible que en presencia de luz UV o Rosa de Bengala, el oxígeno singulete sea la principal especie oxidada (Graßmann, 2005).

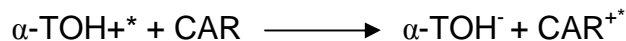
La actividad antioxidante relativa de varios carotenos y xantofilas de acuerdo a la capacidad de eliminar radicales catión AMVN [2,2'-azobis(2,4'-dimetilvaleronitrilo)] es: licopeno > β -criptoxantina \approx β -caroteno > luteína \approx zeaxantina \approx α -caroteno >> astaxantina \approx cantaxantina. Es posible que la eliminación de radicales catión se deba a las propiedades de donación de hidrógeno por los carotenoides. Por lo que se plantea la tesis que la separación del hidrógeno en los átomos de carbono alílico de los carotenoides puede contribuir a la actividad antioxidante de estos tetraterpenos.

2.2.6.4.3 Interacción con otros carotenoides o antioxidantes

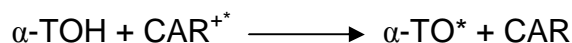
La capacidad antioxidante de los carotenoides se puede considerar de acuerdo la interacción entre sustancias con diferente modo de acción o polaridad. Varios carotenoides pueden mostrar interacciones entre ellos. Registrando la neutralización de un radical catión carotenoide por otro carotenoide se encontró que astaxantina > cantaxantina > luteína > zeaxantina > β -caroteno > licopeno. Esto significa que el licopeno es el carotenoide más fácilmente de oxidar y es el más disponible para reparar todos los otros radicales catión carotenoides. Estudiando los potenciales de oxidación de diferentes carotenoides en micelas con Tritón X-100, se encontró que el licopeno es el carotenoide más fácil de oxidar sus radicales catión y la astaxantina la más difícil.

La reactividad de los carotenoides al α -tocoferol (α -TO) está influenciada por el ambiente. En un ambiente polar el catión α -tocoferol es desprotonado y el catión desprotonado no reacciona con el carotenoide, mientras que en un ambiente no polar como hexano, el radical catión α -tocoferol protonado es convertido a α -tocoferol por

el carotenoide. Entonces, el carotenoide puede proteger el tocoferol, aunque el resultado es la formación de CAR^{+*} .



Otras investigaciones reportaron que el $\alpha\text{-TOH}$ reduce el CAR^{+*} para regenerar el carotenoide intacto:



Los carotenoides también pueden interaccionar con antioxidantes hidrofílicos como el ácido ascórbico. Éste antioxidante puede reparar radicales catión carotenoide en metanol, debido a la naturaleza más polar de los radicales catión carotenoide (Krinsky y Johnson, 2005; Graßmann, 2005).

2.3 Licopeno

En recientes años el licopeno ha cobrado gran interés debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, especialmente relacionadas con sus efectos como antioxidante. Aunque no tiene actividad provitamina A, exhibe una constante física de velocidad de extinción o neutralización del oxígeno singulete casi dos veces mayor que el del β -caroteno. Su carácter antioxidante controla la formación de radicales libres y neutraliza moléculas oxidantes como el oxígeno singulete que puede iniciar reacciones en cadena. Esta neutralización física del oxígeno singulete, permite que no presente cambio en su estructura. Esta propiedad, destaca la importancia de su papel potencial en la salud humana. Por otra parte estudios epidemiológicos, reportan al licopeno como un micronutriente con importantes benéficos a la salud, debido a que parece proveer protección contra un rango amplio de cánceres epiteliales (próstata, pulmón, estomago y enfermedades del corazón). El licopeno es considerado como un indicador nutricional de buenos hábitos dietéticos y estilos de vida saludables, por lo que es considerado un ingrediente nutracéutico, ya

que proporciona beneficios a la salud del consumidor más allá de los que ofrecen los alimentos convencionales. Este pigmento carotenoides puede ser la base para elaborar nuevos alimentos funcionales o nutraceuticos (Shi y Le Maguer, 2000; Rao y col., 2006).

2.3.1 Propiedades físicas y químicas

El licopeno (ϕ , ϕ -caroteno; Figura 2) es uno de los 600 carotenoides encontrados en la naturaleza. Este pigmento natural es sintetizado por plantas y microorganismos para absorber luz durante la fotosíntesis y para protegerlos contra la fotosensibilización. Es un carotenoides no cíclico que tiene una fórmula molecular de $C_{40}H_{56}$, peso molecular de 536.85 daltons, compuesto lipofílico insoluble en agua y es un pigmento rojo que absorbe luz en el rango visible. El licopeno en una solución de éter de petróleo tiene una longitud de onda (λ_{max}) de 472 nm y un coeficiente de extinción ($\epsilon\%$) de 3450 (Rao y col., 2006). Es un hidrocarburo de cadena abierta que contiene 11 dobles enlaces conjugados y dos no conjugados con un arreglo lineal; tiene dos grupos metilo en la posición 1,6. La serie de dobles enlaces conjugados constituye un cromóforo de longitud variable. El color y la actividad antioxidante del licopeno son una consecuencia de su estructura única, un sistema extendido de dobles enlaces conjugados (Rao y col., 2006). Este pigmento carotenoides carece de un anillo de β -ionona como el β -caroteno y no tiene actividad provitamina A. La actividad biológica del licopeno es principalmente su actividad antioxidante y es muy sensible a la luz, calor, oxígeno y ácidos ocasionando la degradación; algunos iones metálicos como Cu^{2+} y Fe^{3+} catalizan su oxidación (Shi y Le Maguer, 2000; Shi y col., 2004).

El licopeno en el jitomate maduro está en cristales en forma de agujas elongadas responsables del color rojo brillante. El licopeno en forma de polvo es de color café-rojizo, soluble en cloroformo, hexano, benceno, disulfuro de carbono, acetona y éter de petróleo e insoluble en agua, etanol y metanol. Es sensible a la

luz, oxígeno, alta temperatura y ácidos; tiene un punto de fusión de 172-175°C (Shi y Le Maguer, 2000; Shi y col., 2004).

Como otros carotenoides, los dobles enlaces en el licopeno pueden sufrir isomerización desde *trans* a mono o poli-*cis* isómeros por luz, energía térmica y reacciones químicas. *All-trans*, *5-cis*, *9-cis*, *13-cis* y *15-cis* son los isómeros del licopeno más comúnmente identificados, (Rao y col., 2006; Figura 6).

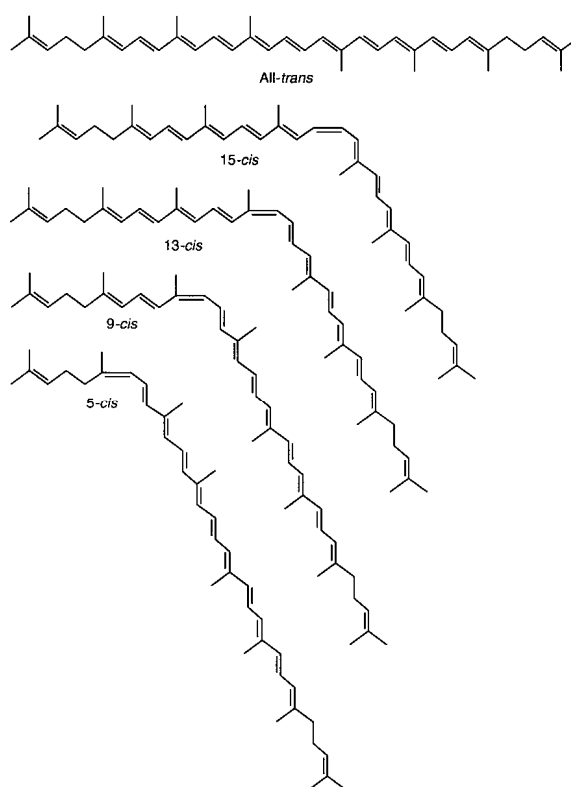


Figura 6. Estructuras de *trans* y *cis* isómeros de licopeno

2.3.2 Propiedades bioquímicas

El licopeno con su estructura acíclica, su arreglo de dobles enlaces conjugados y su extremada hidrofobicidad, exhibe propiedades biológicas distintas,

incluyendo su carácter antioxidante. El licopeno está entre los más eficientes neutralizadores del oxígeno singulete de los carotenoides naturales. La apertura del anillo de la β -ionona del licopeno le permite incrementar su habilidad de neutralización comparado con las estructuras de γ -caroteno y β -caroteno. La actividad antioxidante del licopeno y otros carotenoides son destacados por sus propiedades de extinción (neutralización) del oxígeno singulete y su habilidad para atrapar radicales peróxido (Shi y Le Maguer, 2000; Graßmann, 2005).

2.3.3 Licopeno en jitomate, productos procesados del jitomate y en otras frutas

Cuadro 3. Concentración de licopeno en frutas y hortalizas

Frutas y hortalizas	Licopeno ($\mu\text{g/g}$, peso húmedo)
Jitomate	8.8 – 42.0
Sandía	23.0 – 72.0
Guayaba rosa	54.0
Toronja rosa	33.6
Papaya	20.0 – 53.0
Chabacano	< 0.1

Rao y col., 2006

El licopeno es el carotenoide más abundante en los jitomates maduros, comprendiendo aproximadamente del 80 al 90% de los pigmentos presentes. Otros carotenoides presentes en niveles muy bajos son α -caroteno, β -caroteno, luteína y β -criptoxantina (Shi y Le Maguer, 2000). La cantidad de licopeno presente en el jitomate depende de la variedad, madurez y condiciones ambientales bajo las cuales ha madurado (Lai y col., 2007). Hart y Scott (1995) encontraron que algunas variedades con un color rojo intenso presentaron más de 150 $\mu\text{g/g}$ mientras que variedades amarillas solo presentaron un contenido de 5 $\mu\text{g/g}$. En los cuadros 3 y 4

se indican concentraciones de licopeno en jitomate, en productos procesados del jitomate y en algunas frutas (Rao y col., 2006).

Cuadro 4. Concentración del licopeno en productos del jitomate

Productos del jitomate	Licopeno ($\mu\text{g/g}$, peso húmedo)
Jitomates frescos	8.8 – 42.0
Jitomates cocinados	37.0
Salsa de jitomate	62.0
Pasta de jitomate	54.0 – 1500.0
Sopa de jitomate	79.9
Polvo de jitomate	1126.3 – 1264.9
Jugo de jitomate	50.0 – 116.0

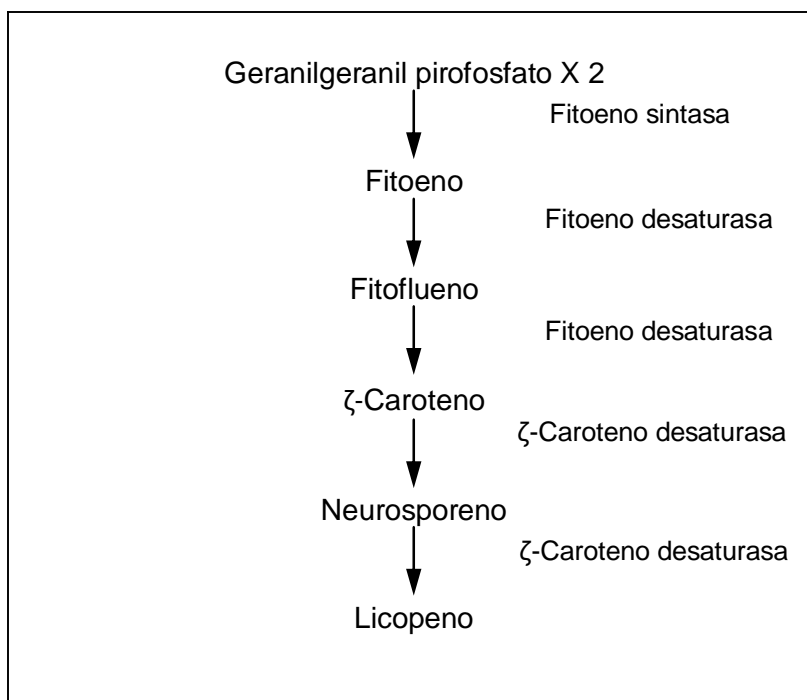
Rao y col., 2006

2.3.4 Biosíntesis del licopeno en células vegetales

A nivel celular, el licopeno está localizado en los cloroplastos del jitomate y se localiza entre las membranas de los tilacoides en el complejo proteína-pigmento fotosintético. En las primeras etapas de la maduración del jitomate, el pigmento dominante en los cloroplastos es la clorofila verde (tomate con superficie verde). A medida que la clorofila se degrada, el color cambia de verde a blanco. Cuando la clorofila en los cloroplastos se reduce, el licopeno es sintetizado con cambios constantes en la ultraestructura de la fruta, resultando con el cambio de color de blanco a rojo. La etapa final del desarrollo del cromoplasto es la formación de los cristales de licopeno que ocupan una gran porción de esta estructura y aparecen como hojas rojas voluminosas en los cromoplastos. La mayor concentración de licopeno está en el pericarpio y cuando el epicarpio del fruto está completamente rojo (Shi y Le Maguer, 2000; Lai y col., 2007).

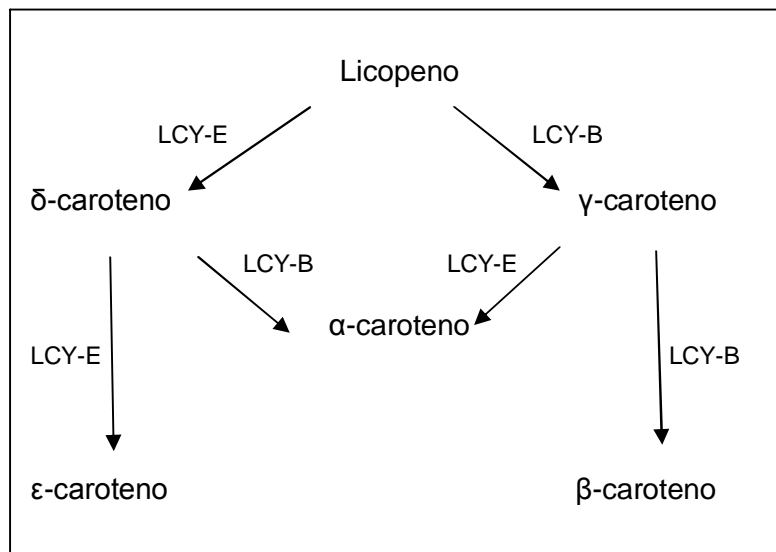
El isopreno es el precursor de los carotenoides, esta molécula en su forma activa, isopentil pirofosfato (IPP) da lugar al geranil geranil pirofosfato (GGPP) y éste

a su vez da lugar al fitoeno, primer carotenoide producido en la ruta de biosíntesis de licopeno (Bramley, 2002; Del Villar-Martínez y col., 2007; Figura 7). Este pigmento es el precursor biosintético de la mayoría de los carotenoides cíclicos; la conversión de licopeno a β -caroteno se debe a la acción de β -licopeno ciclasa (LCY-B), enzima que cataliza la formación de anillos β -ionona en los extremos de la molécula. La ciclación del licopeno se ha planteado como un punto de regulación importante en la ruta de la biosíntesis de los carotenoides. La formación del ciclo en ambos extremos de la molécula de licopeno da como resultado a los α -, β -, o ϵ - carotenos. El β -caroteno es el precursor de las xantófilas como zeaxantina, violaxantina y anteraxantina (Figura 3). Las xantófilas se producen cuando uno o más átomos de oxígeno en grupos ceto, hidroxilo, epoxi, etc. se introducen a la molécula del caroteno (Bramley, 2002; Burns y col., 2002; Del Villar-Martínez y col., 2007; Figura 8).



Bramley, 2002 y Del Villar-Martínez y col., 2007.

Figura 7. Biosíntesis del licopeno a partir de la formación del fitoeno y reacciones de desaturación.



Bramley, 2002 y Del Villar-Martínez y col., 2007

Figura 8. Biosíntesis de carotenoides cíclicos a partir del licopeno. Licopeno ϵ -ciclase (LCY-E) y Licopeno β -ciclase (LCY-B).

2.3.5 Degradación oxidativa del licopeno

Existe muy poco conocimiento acerca del mecanismo de la propiedad antioxidante del licopeno así como de sus productos oxidados. La reacción del licopeno con radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) generados del peróxido de hidrógeno, produjo licopeno-1,2-epóxido y licopeno-5,6-epóxido, los cuales son los principales productos que se han encontrado. Estos productos también se encontraron estudiando la oxidación del licopeno con ácido *m*-cloroperbenzoico seguido de una hidrólisis ácida. El licopeno-1,2-epóxido es estable mientras que el licopeno-5,6-epóxido es inestable y sufre un reordenamiento para formar 2,6-ciclicolicopeno-1,5-epóxido A y B. Ambos compuestos en presencia de ácido o una enzima en el cuerpo humano son convertidos en 2,6-ciclicolicopeno-1,5-diol A y B. Estos compuestos han sido identificados en suero humano y leche; en jitomate y en sus productos procesados se encontraron en trazas (Khachik y col., 2002; Shi y col., 2004, Figura 9).

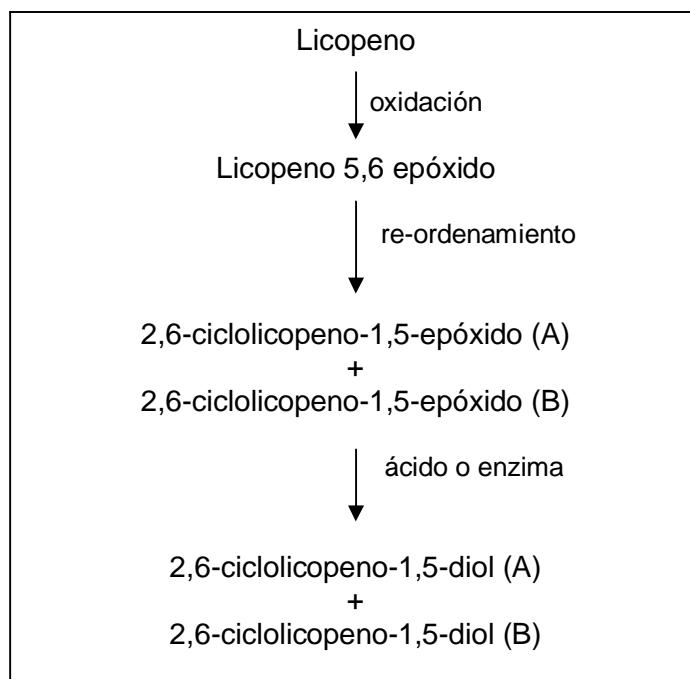


Figura 9. Vía propuesta para la oxidación del licopeno en humanos.

El licopeno también puede ser convertido en radicales peróxido capaces de actuar como prooxidantes y sufrir autooxidación por ellos mismos. El oxígeno es introducido en el licopeno por al menos dos maneras: a) oxidación de un metilo o grupo metileno y b) adición a un doble enlace carbono-carbono. La degradación oxidativa puede ocurrir en cualquiera de los extremos del esqueleto carbono- C_{40} (Shi y col., 2004, Figura 10).

Caris-Veyrat y col., (2003) reportaron que la oxidación del licopeno con permanganato de potasio *in vitro* ocasionó la descomposición oxidativa de uno o dos dobles enlaces del caroteno. Los compuestos resultado de la oxidación fueron llamados apo-licopenal (grupo aldehído en un extremo), apo-licopenona (grupo cetona en un extremo) y apo-carotendial (dos grupos aldehído en los extremos de la molécula). Se obtuvieron once apo-licopenales/apo-licopenonas y seis apo-carotendiales. Cuando la oxidación del licopeno fue con oxígeno atmosférico y

catalizada con una metaloporfirina; primero hubo una isomerización del all-*trans*-licopeno, después la oxidación y finalmente la descomposición. Los productos de la oxidación fueron: isómeros *cis* (9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis*), monóxidos de licopeno y compuestos de la descomposición (apo-licopenal/apo-licopenona).

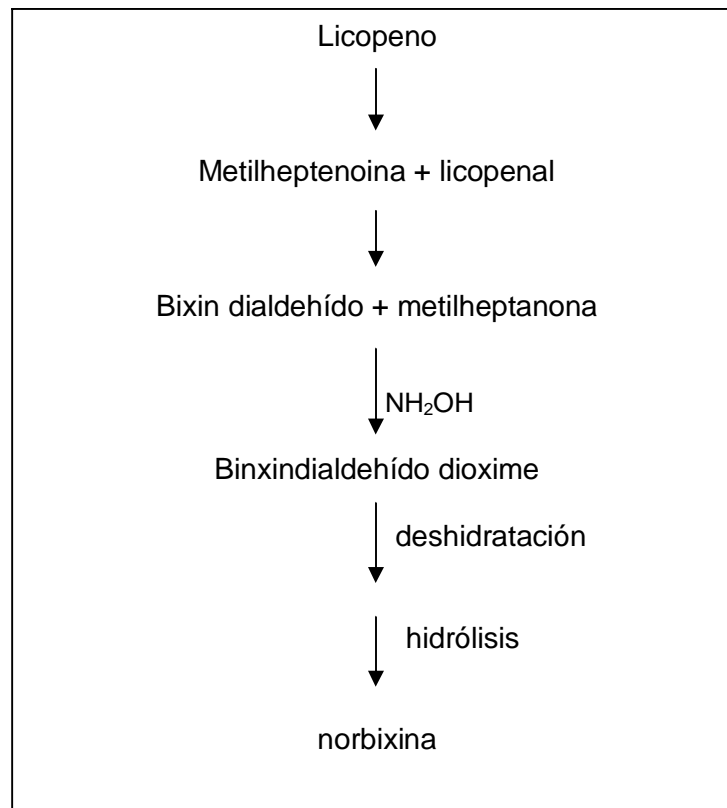


Figura 10. Vía de degradación del licopeno

2.4 Escaldado de frutas y hortalizas

El isómero all-*trans* de licopeno es la forma más estable y es la que está presente en los jitomates en estado fresco. Sin embargo, es liberado de la matriz del tejido durante su procesamiento y espontáneamente sufre isomerización y oxidación, lo cual causa degradación del pigmento. Hay una gran pérdida de licopeno cuando el fruto es sometido a varios tratamientos térmicos como escaldado, esterilización y deshidratación (Candelas-Cadillo y col., 2005; Goula y col., 2006).

El escaldado se aplica antes del procesado para destruir sistemas enzimáticos de frutas y hortalizas. Entre las enzimas responsables de pérdidas en el valor nutritivo y modificaciones en las características organolépticas de las frutas y hortalizas se encuentran la lipoxigenasa, poligalacturonasa, polifenoloxidasas, clorofilasa, catalasa y peroxidasa. La adecuada inactivación de las enzimas requiere un calentamiento rápido hasta una temperatura determinada, el mantenimiento a ésta durante el tiempo necesario y un enfriamiento rápido hasta una temperatura próxima a la del ambiente (Fellows, 2007). Las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasa afectan la calidad de los productos procesados del jitomate y extracción del licopeno por lo que se aplica el escaldado (Schwartz, 1994; Takeoka y col., 2001; Fellows, 2007). Los métodos de escaldado más frecuentes son con vapor o con agua caliente y el tratamiento térmico puede ser aplicado al fruto entero o picado (reducción de tamaño). Sin embargo, para el procesado del jitomate a nivel industrial se aplica los métodos de rompimiento en caliente (“hot break”, 82-90°C) o rompimiento en frío (“cold break”, 60-65°C; Re y col., 2002; Fellows, 2007).

Con relación a la estabilidad del licopeno, Shi y Le Maguer (2000) reportaron que el calor induce la isomerización de all-*trans* a formas *cis*. Los isómeros *cis* se incrementan con la temperatura y tiempo de procesamiento. Boileau y col. (2002) también reportaron que los isómeros *cis* del licopeno son más biodisponibles que all-*trans* debido a su más elevada solubilidad de los isómeros *cis* en las micelas del ácido biliar y su menor tendencia a agregarse. El licopeno en productos procesados del jitomate es también sensible a altas temperaturas, prolongado tiempo de procesamiento, luz, oxígeno, ácidos y algunos iones metálicos tal como Cu^{2+} y Fe^{3+} que catalizan su oxidación (Shi y Le Maguer, 2000).

2.5 Los pigmentos como colorantes naturales

Los pigmentos son compuestos que absorben luz en un rango de longitud de onda de la región visible. Esta absorción es debida a una molécula con estructura específica (cromóforo) que captura la energía de una fuente radiante. Alguna energía

no es absorbida y es reflejada y/o refractada; esta energía es capturada por el ojo y genera impulsos nerviosos, los cuales son transmitidos al cerebro, donde son interpretados como un color. Los pigmentos están ampliamente distribuidos en organismos vivos y un gran número han sido reportados, como es el caso de las antocianinas que cuentan con 250 estructuras diferentes. También es común encontrar pigmentos con estructuras complejas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). La mayoría de los pigmentos biológicos están agrupados en no más de seis clases de estructuras: tetrapirroles, isoprenoides, quinonas, benzopiranos, compuestos N-heterocíclicos y metaloproteínas. Informes científicos han descrito alrededor de 34 tetrapirroles (28 cíclicos y 6 lineales), sobre 600 carotenoides, más de 4100 flavonoides y alrededor de 250 antocianinas (aunque constituida de sólo 17 antocianidinas). Las quinonas están ampliamente distribuidas de acuerdo a la importancia de sus funciones. Se emplean en el teñido de productos textiles y otras como colorantes de alimentos y las betalaínas se emplean en la industria alimentaria (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

2.5.1 Importancia de los colorantes naturales

En el siglo XIX, los colorantes derivados de minerales fueron aplicados en la pigmentación de alimentos. Sin embargo, varios de ellos ocasionaron problemas de salud. Fue el caso del cromato de plomo y sulfato de cobre utilizados en la pigmentación de dulces y col en salmuera, causaron algunas muertes debido a que los productos fueron contaminados con arsénico y otras impurezas tóxicas. Simultáneamente, un gran número de colorantes sintéticos derivados del alquitrán y otros derivados del petróleo fueron desarrollados por W.H. Perkin y otros. Los colorantes sintéticos fueron utilizados ampliamente en alimentos, medicinas y cosméticos, pero a través de los años su importancia disminuyó. Actualmente sólo siete pigmentos sintéticos pueden ser utilizados en la pigmentación de alimentos según la FDA (Food and Drug Administration, USA). La reducción de colorantes sintéticos se inició hace cuarenta años y todos los alimentos sintéticos sufrieron severas críticas entre ellos los aditivos sintéticos y particularmente los pigmentos

alimenticios fueron atacados. Estas críticas provocaron una fuerte inclinación hacia los colorantes naturales. El criterio para la selección de colorantes naturales es importante ya que además de proveer un valor cosmético no debe causar daño a la salud. La Food and Drug Administration de Estado Unidos (FDA), The European Union y The World Health Organization (WHO), son las autoridades internacionales responsables de evaluar los colorantes naturales antes de su comercialización (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

En Estados Unidos en 1958 se estableció una enmienda a la Acta Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos, dividió los ingredientes alimenticios en dos categorías:

1. Sustancias que son generalmente reconocidas como seguras (generally recognized as safe, GRAS) que no requieren de una evaluación previa de FDA para ser comercializadas.
2. Todas las sustancias restantes adicionadas como sustituto en el alimento (aditivos alimentarios) que deben ser evaluados por la FDA antes de su comercialización.

Los ingredientes GRAS son aquéllos que han sido reconocidos como seguros “por expertos calificados” para evaluar la inocuidad del alimento e ingredientes alimentarios. El ingrediente debe haber sido utilizado en un alimento previo al 1º de enero de 1958 o ser encontrado seguro por procedimientos científicos. Cualquier ingrediente alimentario que no pueda ser determinado como GRAS, automáticamente es clasificado como un “aditivo alimentario” y requiere ser aprobado por la FDA previo a la adición a un alimento. Un ejemplo de sustancia GRAS es el jarabe de maíz de alta fructosa (Burdock, 2003).

2.5.2 Clasificación de colorantes para alimentos

La clasificación de los pigmentos se puede realizar por diferentes sistemas (Cuadro 5). En clasificación de los colorantes según su origen y legislación, considera las preferencias del consumidor, que se inclina por los pigmentos naturales sobre los pigmentos sintéticos obtenidos en laboratorios. Además la introducción de colorantes naturales como aditivos no es tan clara en la FDA de los Estados Unidos (Food and Drug Administration) y la Organización Mundial de la Salud (WHO).

El color es el principal factor de calidad en los productos naturales para ser comercializados. En estos días, los productos naturales son comúnmente procesados o almacenados antes de su consumo, las características de calidad y particularmente el color es afectado; consecuentemente, se utilizan colorantes (aditivos). Éstos se han utilizado desde tiempos remotos. Sin embargo, se deben de considerar ciertos factores para elegir un colorante como aditivo para una aplicación específica como: 1) Tono del color requerido, 2) Forma física (líquido, sólido, emulsión), 3) Propiedades del producto procesado a colorear y 4) Condiciones de procesamiento (si el proceso requiere calor o frío, condiciones de almacenamiento), un ejemplo es cuando se utilizan colorantes solubles en aceite, éstos deben ser emulsificados para ser adicionados a aceites de cítricos. En el caso de antocianinas y betalaínas, éstas son solubles en agua, mientras que los carotenoides y xantofilas son solubles en aceite. Las antocianinas contienen un nivel significativo de azúcares, consecuentemente son susceptibles al ataca de microorganismos, por lo que este factor debe considerarse durante la fabricación de productos pigmentados.

Los consumidores reconocen el color, sabor y textura como los principales atributos de una alimento, y de éstos el más importante es el color. Éste es asociado con la inocuidad del alimento. Un color inapropiado es relacionado con deterioro, mal procesamiento o un transporte inadecuado. Consecuentemente, la calidad de los alimentos está asociada en primera instancia con el color.

Cuadro 5. Sistemas de clasificación de los colorantes

Bases del sistema	Clase de los pigmentos agrupados	Características	Ejemplos
Origen	Natural	Compuestos orgánicos obtenidos de organismos vivos.	Carotenoides, antocianinas, curcumina.
	Sintético	Compuestos orgánicos obtenidos por síntesis química.	Colorantes FD&C ^a .
	Inorgánico	Encontrados en la naturaleza u obtenidos por síntesis.	TiO ₂
Una característica química global	Cromóforos con sistemas conjugados	Múltiples dobles enlaces, separados solamente por un enlace sencillo.	Carotenoides, antocianinas, betalaínas, caramelo, colorantes FD&C, lacas.
	Compuestos coordinados metálicos	Un metal presente en su estructura química.	Colorantes Hemo (mioglobinas, hemoglobinas, clorofilas).
Una característica estructural específica de pigmento natural	Derivados de tetrapirroles,	Compuestos con cuatro estructuras pirrol.	Clorofilas y colores hemo.
	Carotenoides	Derivados de isoprenoides, la mayoría de los compuestos son polímeros de ocho monómeros isopreno.	Licopeno, caroteno, luteína, capsantina.
	Iridoides	Derivados de isoprenoides	Purinas, pterinas, flavinas, penazinas, betalaínas.
	Compuestos N-heterocíclicos pero no tetrapirroles.	El nitrógeno esta presente en su estructura química.	
	Derivados de Benzopiranos.	Compuestos heterocíclicos oxigenados.	Antocianinas y otros flavonoides.
	Quinonas	Grupos funcionales de quinonas son encontrados en la estructura química.	Benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas.
	Melaninas	Estructuras poliméricas obtenidas de nitrógeno conteniendo monómeros.	Eumelaninas, Facomelaninas.
Legislación	Certificable	Sintéticos antropogénicos.	Colorantes FD&C y lacas
	Excepto de certificación	De origen natural (vegetales, animales o minerales) o contrapartes sintéticas.	Jugo de uva, TiO ₂ , carmín y β-caroteno sintético.

FD&C = Colorantes certificables permitidos para ser utilizados para alimentos, medicamentos y cosméticos. Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003.

El uso de aditivos en la industria alimentaria es necesaria para: 1) Restaurar la apariencia original del alimento, 2) Asegurar la uniformidad del color, 3) Intensificar los colores normales del alimento 4) Proteger otros componentes (como antioxidantes), 5) Obtener la mejor apariencia del alimento, 6) Conservar las características asociadas con el alimento, 7) Apoyar como una característica visual de la calidad del alimento. Es importante mencionar que los colorantes nunca deben ser utilizados para cubrir un mal procesamiento o manipulación como estrategia en la producción del alimento (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

2.6 Oxidación lipídica en alimentos

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de alimentos naturales y procesados. La descomposición de los alimentos por oxidación tiene un gran impacto económico en la industria alimentaria a causa que afecta diversas características de calidad tal como sabor (rancidez), color, textura y valor nutritivo de los alimentos. Además produce compuestos tóxicos. La oxidación de lípidos es uno de los principales procesos que limitan la vida útil de los alimentos. La inestabilidad oxidativa de los ácidos grasos poli-insaturados a menudo limita su uso como lípidos nutricionalmente benéficos en alimentos funcionales.

La estabilidad oxidativa puede incrementarse al reducir la concentración de los ácidos grasos poli-insaturados al sustituirlos con grasas elevadas en ácidos grasos saturados. Sin embargo, esta práctica es contraria a las recomendaciones nutricionales presentes que apoyan un incremento de ácidos grasos insaturados en la dieta con el propósito de disminuir riesgos por enfermedades coronarias del corazón. Otro método para reducir la rancidez es aplicando la hidrogenación parcial de las grasas y aceites para eliminar la mayor parte de ácidos grasos insaturados, los cuales son muy susceptibles a la oxidación (por ejemplo ácido linolénico). Sin embargo, la hidrogenación parcial conduce a la formación de ácidos grasos *trans*, los cuales generan un incremento de la lipoproteína de baja densidad ocasionando problemas de colesterol (Nawar, 1993; Chaiyasit y col., 2007).

Para retardar la oxidación lipídica en alimentos se utilizan métodos como la eliminación del oxígeno aunque resulta no práctico durante el procesamiento y almacenamiento y la adición de antioxidantes que atrapen los radicales libres y controlen metales prooxidantes. Sin embargo, sólo un número limitado de eliminadores de radicales libres y secuestradores de metales son adecuados para utilizarlos en alimentos. Algunos de estos compuestos son sintéticos y no son del todo aceptados por los consumidores (Chaiyasit y col., 2007).

Varias tecnologías con aplicación de antioxidantes tienen el potencial para estabilizar alimentos que se inclinan a la rancidez oxidativa. Estas tecnologías incluyen el control de prooxidantes (por ejemplo: especies reactivas al oxígeno y metales prooxidantes) y reducir los efectos del daño de los radicales libres (por ejemplo: adición de atrapadores de radicales libres). Un método para aumentar la eficiencia de los antioxidantes es transferirlos al sitio de las reacciones oxidativas o utilizarlos en combinación con otras tecnologías que puedan reducir las velocidades de oxidación. En investigaciones realizadas en la oxidación lipídica en emulsiones Aceite/Agua, indican que las propiedades físicas de los alimentos tienen efecto sobre la química de la oxidación lipídica (McClements y Decker, 2000). También se encontró que las propiedades de la interfase aceite-agua en las emulsiones aceite-en-agua juega un papel crítico en las cinéticas de la oxidación lipídica; por ejemplo, las gotas lipídicas formadas en las emulsiones de aceite-en-agua con una membrana interfacial catiónica provocarán que los metales de transición sean repelidos electrostáticamente del sustrato de oxidación (hidroperóxidos lipídicos en la interfase de la gota de la emulsión), entonces disminuye las velocidades de oxidación. Tales tecnologías no solamente incrementan la estabilidad oxidativa de los lípidos emulsionados sino también incrementan la efectividad del antioxidante (Chaiyasit y col., 2007).

2.6.1 Oxidación lipídica

La oxidación lipídica es un término general que describe una secuencia compleja de interacciones químicas entre grupos acil grasas insaturadas en lípidos con especies reactivas del oxígeno. Los ácidos grasos insaturados en los triacilgliceroles y fosfolípidos tienen baja volatilidad y no contribuyen directamente al aroma de los alimentos. Sin embargo, estos ácidos grasos se descomponen durante la oxidación lipídica para formar moléculas volátiles que producen pérdida de aromas y están asociadas a rancidez oxidativa. Estos compuestos volátiles afectan la calidad del alimento excepto en el caso de alimentos fritos, cereales fritos y quesos, donde pequeñas cantidades de estos compuestos volátiles son importantes en su perfil de sabor. Los mecanismos de la oxidación lipídica en un alimento particular depende de la naturaleza de las especies reactivas presentes y su ambiente fisicoquímico (McClements y Decker, 2000; Chaiyasit y col., 2007).

2.6.2 Mecanismos de la oxidación lipídica

Teóricamente, la oxidación lipídica es una reacción en cadena de radical libre entre grasas insaturadas y oxígeno que se presenta de una manera auto-catalítica. Sin embargo, la oxidación lipídica en muchos sistemas alimentarios es acelerada por prooxidantes tal como iones de metales de transición, fotosensibilizadores, luz UV y ciertas enzimas. El mecanismo de la oxidación lipídica incluye tres etapas (Figura 11). En la etapa de iniciación, un radical ácido graso conocido como el radical alquil (R^*) es formado por sustracción de un hidrógeno de un ácido graso (RH) en presencia de un iniciador (In^*) (Ecuación 1). En la primera etapa de propagación se involucra la adición de oxígeno al radical alquil (R^*) resultando en la formación del radical peróxido (ROO^*), el cual tiene una mayor energía que el radical alquil (Ecuación 2). Entonces el radical peróxido puede sustraer un hidrógeno de otro ácido graso insaturado (RH) y producir un hidroperóxido lipídico ($ROOH$) y un nuevo radical alquil (Ecuación 3). Con la interacción de dos radicales libres para formar especies no-radical se terminará el proceso (Ecuaciones 4-6, Figura 11). En bastantes

alimentos las etapas de iniciación y propagación son rápidas que cuando se alcanza la etapa de terminación, el alimento ya está rancio (Chaiyasit y col., 2007).

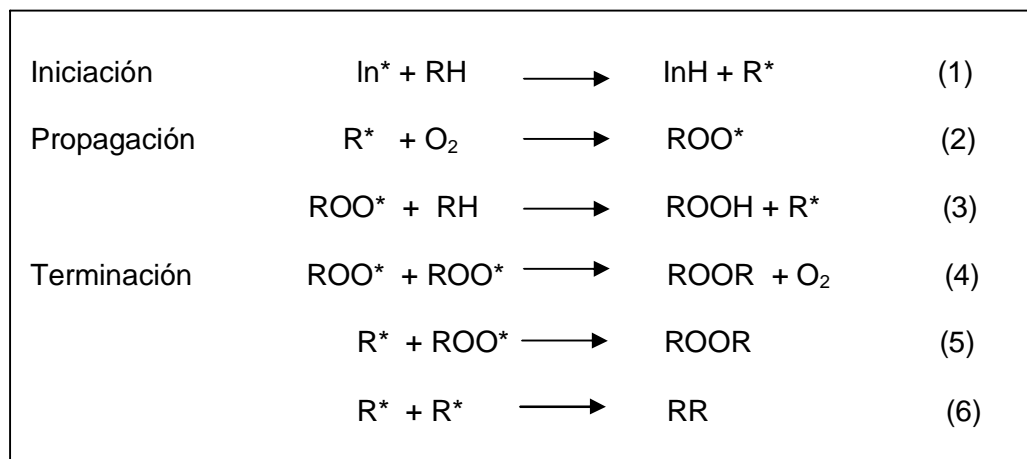


Figura 11. Mecanismo de la oxidación lipídica.

2.6.3 Productos de la descomposición de la oxidación lipídica

La rancidez en los alimentos se presenta cuando los ácidos grasos insaturados se descomponen en compuestos volátiles. Estos son el resultado de la descomposición de los hidroperóxidos de los ácidos grasos. Esta reacción produce un radical alcoxilo (RO^*) y un radical hidroxilo ($^*\text{OH}$). El radical alcoxilo (RO^*) es el más energético que el radical alquil (R^*) o radical peróxido (ROO^*) por lo que puede intervenir en diferentes vías de la reacción. El radical alcoxilo (RO^*) puede atacar otro ácido graso insaturado, un grupo pentadieno con el mismo ácido graso o los enlaces covalentes adyacentes al radical alcoxilo. Esta última reacción es conocida como reacción β -escisión y es importante para la calidad de los alimentos, ya que los ácidos grasos se descomponen en moléculas de bajo peso, compuestos volátiles que causan rancidez. La descomposición de la cadena hidrocarbonada por el radical alcoxilo sobre el metilo terminal del ácido graso produce compuestos volátiles. Sobre la descomposición de la cadena del ácido graso, resulta en radicales que interaccionan con una variedad de compuestos para producir productos secundarios

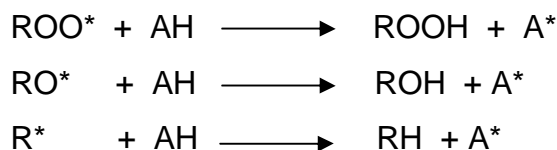
de la oxidación lipídica tal como aldehídos, cetonas, alcoholes, furanos, hidrocarbonos y ácidos (Yanishlieva y Marinova, 2001; Chaiyasit y col., 2007).

2.6.4 Prooxidantes

La oxidación lipídica a menudo es referida como una autooxidación. Sin embargo, en la mayoría de los alimentos hay varios sistemas prooxidantes que producen radicales libres e hidroperóxidos lipídicos además de las etapas clásicas de la iniciación y propagación. Los prooxidantes son compuestos que inician, facilitan o aceleran la oxidación lipídica. Muchos prooxidantes no son verdaderos catalizadores ya que se alteran durante la reacción. Por ejemplo, el acero ferroso se convierte en acero férrico durante la interacción con los hidroperóxidos y el oxígeno singulete es convertido a hidroperóxido por la interacción con los ácidos grasos insaturados. Los prooxidantes pueden acelerar la oxidación lipídica por interaccionar directamente con los ácidos grasos insaturados para formar hidroperóxidos lipídicos (lipoxigenasas, oxígeno singulete) o por promover la formación de radicales libres (metales de transición o luz ultravioleta promueven la descomposición de los hidroperóxidos).

2.6.5 Antioxidantes

La incorporación de antioxidantes en alimentos es uno de los más efectivos métodos para retardar la oxidación lipídica. Sin embargo, diversos factores pueden impactar la actividad antioxidante de un antioxidante, ya que un antioxidante puede retardar la oxidación lipídica bajo ciertas condiciones pero este mismo antioxidante puede promover la oxidación lipídica bajo otras condiciones. Un antioxidante (AH) reacciona con radicales lipídicos como sigue:



Para que un antioxidante sea efectivo debe inactivar radicales libres antes que ellos puedan atacar los ácidos grasos insaturados. Se considera que los antioxidantes “atrapa radicales libres” interaccionan principalmente con los radicales peróxido (ROO*); Yanishlieva y Marinova, 2001; Chaiyasit y col., 2007). Algunos antioxidantes sintéticos atrapadores de radicales libres, eficientes y baratos son hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propil (PG), y terc-butilhidroquinona (TBHQ). Estos antioxidantes sintéticos no son del todo aceptados por el consumidor, ya que se trata de evitar el uso de aditivos alimentarios sintéticos. Las catequinas son compuestos naturales atrapadores de radicales libres y además tienen beneficios de salud como inhibidores de oxidaciones biológicas (Chaiyasit y col., 2007).

2.6.6 Agentes quelantes o secuestrantes

Los quelantes son un grupo de antioxidantes secundarios que pueden fijar y por tanto inactivar o reducir la actividad de los metales prooxidantes. Los más comunes quelantes que se utilizan en alimentos son: ácido cítrico (y su lipofílico, éster monoglicérido), ácido fosfórico (y sus derivados de polifosfato) y etilendiaminotetraacético (EDTA).

2.6.7 Neutralizadores del oxígeno singulete

El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es un estado excitado del oxígeno que puede estar formado por reacciones enzimáticas en sistemas biológicos o por la presencia de fotosensibilizadores, luz y oxígeno triplete. El oxígeno singulete puede ser inactivado a través de las vías de neutralización física y química por compuestos como tocoferoles, carotenoides (β -caroteno, licopeno y luteína), polifenoles (catequinas y flavonoides), aminoácidos, péptidos, proteínas, urato y ascorbato (Chaiyasit y col., 2007).

2.7 Emulsiones aceite-en-agua

Un gran número de productos naturales tienen propiedades importantes para la salud humana ya que pueden prevenir diversas enfermedades. El problema es que no todos estos productos naturales pueden ser absorbidos por el cuerpo humano, sólo pequeñas fracciones de ellos. Debido a lo anterior, varios centros de investigación están estudiando diversas maneras de absorción de estos productos naturales como es el caso del licopeno. Este pigmento se puede disolver en una fase dispersa de aceite en una emulsión aceite-agua (O/W) para mejorar su biodisponibilidad. Además estas emulsiones enriquecidas con carotenoides son potenciales para aplicarse en alimentos como jugo de naranja y malteadas entre otros (Ribeiro y col., 2005).

2.7.1 Conceptos básicos en emulsiones

2.7.1.1 Emulsiones aceite en agua

Generalmente una emulsión consiste de al menos dos líquidos inmiscibles como es el caso de aceite y agua; uno de los líquidos está disperso en pequeñas gotas esféricas en el otro líquido. El diámetro medio de las gotas en sistemas alimentarios es entre 100 nm y 100 μ m pero en algunos sistemas pueden ser valores más pequeños o más grandes (McClements y col., 2007).

2.7.1.2 Clasificación de las emulsiones

Las emulsiones pueden clasificarse de acuerdo a su organización espacial de las fases de aceite y agua. Un sistema que consiste de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es la emulsión aceite-en-agua (O/W). Mientras un sistema que consiste de gotas de agua dispersas en una fase de aceite es denominada emulsión agua-en-aceite (W/O). La sustancia que hace las gotas en una emulsión es la fase dispersa mientras que la sustancia que rodea las gotas es la fase continua. También se pueden preparar emulsiones múltiples, por ejemplo, aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) o agua-en-aceite-en-agua (W/O/W).

Las emulsiones son termodinámicamente sistemas inestables, que tienden a romperse con el tiempo debido a una variedad de mecanismos fisicoquímicos, incluyendo separación gravitacional (cremado o sedimentación), floculación, coalescencia y maduración Ostwald. Es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables por un período razonable de tiempo al adicionar sustancias conocidas como estabilizantes los cuales pueden ser: emulsificantes o espesantes (modificadores de textura).

2.7.1.3 *Cremado*

Es el movimiento hacia arriba de las gotas debido a que éstas tienen más baja densidad que el líquido que las rodea.

2.7.1.4 *Sedimentación*

Es el movimiento hacia abajo de las gotas, debido a que éstas tienen más elevada densidad que el líquido que las rodea. Los aceites comestibles líquidos normalmente tienen densidades más bajas que el agua líquida y así el cremado es el que prevalece en emulsiones aceite-en-agua (McClements y col., 2007).

2.7.1.5 *Floculación*

Se presenta cuando dos o más gotas se juntan para formar un agregado con lo cual las gotas retienen su integridad individual.

2.7.1.6 *Coalescencia*

Es el proceso donde dos o más gotas se funden juntas para formar una gota única más grande. Cuando se presenta la coalescencia puede eventualmente formarse una capa separada de aceite en la parte superior de la muestra (McClements, 1999).

2.7.1.7 Emulsificantes

Los emulsificantes son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas formadas durante la homogeneización formando una capa protectora que impide la agregación de las gotas. Los emulsificantes más comunes utilizados en la industria son proteínas anfifílicas (tienen regiones polares y no polares en la misma molécula), fosfolípidos y pequeñas moléculas surfactantes (McClements y col., 2007). Estas sustancias químicas que reducen la tensión superficial de un líquido también se denominan tensoactivos, surfactantes o detergentes. Al reducir la tensión superficial, se posibilita la formación de nuevas superficies cuando se aplica energía al sistema (por ejemplo con el homogeneizador) y permite así que se formen un número mayor de gotitas. Algunos tensoactivos son naturales y están presentes en los alimentos como alcoholes, fosfolípidos y proteínas y es muy común su aplicación en la formulación de emulsiones. Sin embargo las sustancias sintéticas tienen una actividad superficial mayor, por lo que se pueden utilizar en pequeñas cantidades. Estas sustancias contienen zonas polares (o hidrofílicas) en uno de sus extremos y zonas apolares (o lipofílicas) en el otro extremo. En las emulsiones, las moléculas de los agentes emulsificantes se orientan en la superficie de las gotas con el extremo polar en la fase acuosa y el extremo apolar en la fase lipídica (Nawar, 1993; Fellows, 2007). En el caso de las emulsiones, los agentes emulsificantes se clasifican en espesantes y surfactantes (McClements y col., 2007).

2.7.1.7.1 Espesantes (modificadores de textura)

Los modificadores de textura espesan o cuajan (en forma de gel) la fase continua, lo cual mejora la estabilidad de la emulsión por retardar o prevenir el movimiento de las gotas. Los agentes espesantes más utilizados en la industria alimentaria son los polisacáridos. La selección del estabilizador más apropiado es uno de los factores más determinantes en las propiedades fisicoquímicas y vida útil de las emulsiones basadas en sistemas de distribución (McClements y Decker, 2000; McClements y col., 2007).

2.7.1.7.2 Surfactantes

Un surfactante es una molécula anfifílica que tiene un grupo hidrofílico (“cabeza”), el cual tiene una alta afinidad por el agua y un grupo lipofílico o hidrofóbico (“cola”), el cual tiene una alta afinidad por el aceite. Los surfactantes pueden por tanto ser representados por la fórmula RX, donde X representa la cabeza hidrofílica y R la cola lipofílica. Las características de un surfactante particular depende de la naturaleza de sus grupos hidrofílico (cabeza) y lipofílico (cola). El grupo hidrofílico puede ser catiónico, aniónico, zwitteriónico o no iónico. Los surfactantes más empleados en la industria alimentaria son los no iónicos (monoacilglicérols, ésteres de ácidos grasos, sacarosa), aniónicos (ácidos grasos), o zwitteriónico (lecitina). El grupo lipofílico (cola) generalmente consiste de una o más cadenas hidrocarbonadas, entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena. Las cadenas pueden ser saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, alifáticas y/o aromáticas. La mayoría de los surfactantes utilizados en la industria tienen una o dos cadenas alifáticas lineales, las cuales pueden ser saturadas o insaturadas. Cada tipo de surfactante tiene propiedades funcionales que son determinadas por su estructura química única. Es necesario seleccionar un surfactante que se considere que es el más apropiado para cada aplicación particular (McClements, 1999).

2.7.1.8 Barrera química

Ciertos tipos de moléculas emulsificantes pueden actuar como barreras químicas a la oxidación lipídica. Soluciones acuosas de ciertos azúcares y aminoácidos son capaces de atrapar radicales libres, por tanto retardan la oxidación lipídica. Bastantes moléculas de emulsificantes contienen fracciones de aminoácidos y azúcares (por ejemplo, goma arábiga, almidones modificados y proteínas) y pueden entonces atrapar radicales libres. Las proteínas tienen también aminoácidos como cisteína que puede ser más rápidamente oxidada que los lípidos. Los emulsificantes adsorbentes son particularmente efectivos en retardar la oxidación lipídica a causa de su elevada concentración local y proximidad al sustrato de oxidación. La actividad antioxidante de las proteínas del suero posiblemente se debe

a los aminoácidos con grupos sulfhídrico y no sulfhídrico, además de quelantes de metales de transición que atrapan radicales libres (McClements y Decker, 2000).

2.7.2 Características de la emulsión

La emulsión se puede dividir en tres regiones diferentes: 1) el interior de las gotas, 2) la fase continua y 3) la región interfacial (Figura 12). La interfase consiste de una región estrecha que rodea cada gota de la emulsión, la cual está constituida principalmente de moléculas de superficie-activa, pero también puede contener algunas moléculas de agua y aceite así como, también algún otro tipo de moléculas que son atraídas hacia ella. Las características de la interfase dependen del tipo y concentración de las moléculas presentes. Tiene un espesor de pocos nanómetros y sus propiedades varían con un movimiento hacia afuera desde las partes hidrofóbicas a las hidrofílicas de las moléculas del emulsificante. La fracción del espacio ocupado por la región interfacial en una emulsión depende sobre el tamaño de la gota. Para gotas relativamente pequeñas la región interfacial comprende un volumen significativo de la gota total, especialmente para capas interfaciales gruesas.

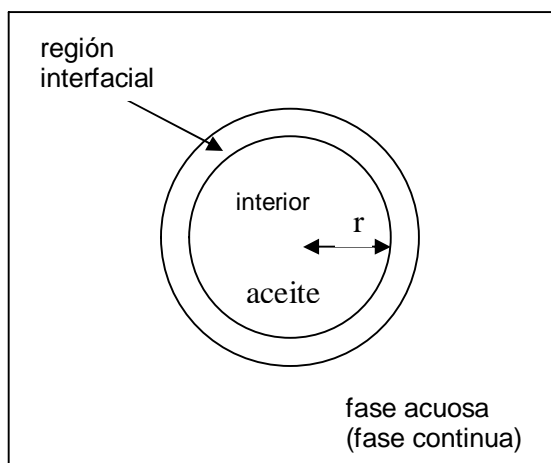


Figura 12. Emulsión aceite-en-agua formada por tres fases: interior de la gota, región interfacial y la fase acuosa.

Cuando se utilizan surfactantes para estabilizar emulsiones, sólo una fracción de ellos rodea las gotas, el resto permanece en la fase acuosa, generalmente como micelas surfactantes. Moléculas anfífilas y no polares pueden asociarse con moléculas surfactantes que rodean las gotas de la emulsión también como aquéllas presentes en las micelas surfactantes. Entonces, la concentración total del surfactante adicionado así como su distribución entre las gotas y micelas, pueden tener un impacto significativo sobre la distribución de las moléculas en una emulsión (McClements y Decker, 2000).

2.7.3 Características de la gota

Las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones (como reología, propiedades ópticas, estabilidad, partición molecular y características de liberación), son altamente dependientes de las propiedades de las gotas que ellas contienen.

2.7.3.1 Concentración de la gota

La concentración de la gota es expresada como el número, masa o volumen de gotas por unidad de volumen o masa de emulsión. Por ejemplo, la fracción volumen fase dispersa (ϕ) es el volumen de las gotas por unidad volumen de la emulsión. La concentración de la gota de una emulsión puede ser generalmente controlada por variar las proporciones de los dos líquidos inmiscibles utilizados para prepararla.

2.7.3.2 Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula (PSD) de una emulsión representa la fracción de partículas en diferentes categorías de tamaño. Es típicamente representada como una tabla o gráfica de concentración de partículas (volumen o por ciento en número) comparada con el tamaño de la gota (p.e diámetro o radio). Es conveniente representar la distribución del tamaño de partícula (PSD) de una emulsión por una medida de tendencia central (p.e. media, mediana o moda) y una medida de amplitud de la distribución por ejemplo, desviación estándar. La PSD de

una emulsión puede ser controlada por variar las condiciones de homogeneización (p.e. intensificar o prolongar la energía suministrada) o la composición del sistema (p.e. el tipo y concentración del emulsificante utilizado). Gotas más pequeñas pueden ser producidas al incrementar la intensidad o duración de la homogeneización, o por incrementar la concentración del emulsificante utilizado (McClements y col., 2007).

2.7.3.3 Carga de la gota

Las características eléctricas de las gotas de la emulsión pueden ser controladas por una selección cuidadosa del emulsificante. Las gotas estabilizadas por surfactantes no iónicos tienden solamente a que la gota tenga una pequeña carga (por ejemplo Tweens y Spans), aquéllas estabilizadas por surfactantes aniónicos tienen una carga negativa (por ejemplo lecitina, DATEM, CITREM, ácidos grasos), aquéllas estabilizadas por emulsificantes como polisacáridos tienden a tener una carga negativa (por ejemplo goma arábica, almidones modificados y pectina de remolacha) y aquéllas estabilizadas por proteínas tienen una carga positiva abajo del punto isoeléctrico y carga negativa arriba de él (por ejemplo proteínas del suero, caseína y proteínas de soya) (Mancuso, 1999; McClements y col., 2007).

2.7.3.3.1 Proteínas del suero

En bastantes estudios de oxidación de las emulsiones de aceite-en-agua, el modelo de emulsión se ha preparado con surfactantes sintéticos como por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), dodecil trimetil bromuro de amonio (DTAB), Brij y Tween, aunque no todos estos surfactantes (SDS, DTAB y Brij) están aprobados para utilizarlos en un alimento. Las proteínas representan aditivos alimentarios que generalmente son reconocidas como seguras (GRAS) para formar emulsiones físicamente estables ya que alteran las propiedades de la interfase de la gota de la emulsión de una manera que incrementa la estabilidad oxidativa (Hu y col., 2003a).

Varios investigadores han demostrado que las proteínas del suero inhiben la oxidación lipídica en emulsiones aceite-en-agua cuando están en la superficie de la

gota de la emulsión o en la fase acuosa. El mecanismo antioxidante de la proteína del suero ha sido atribuida a su habilidad para: (1) Formar cargas catiónicas sobre la superficie de las gotas de la emulsión; (2) Formar películas viscoelásticas gruesas en la interfase de la gota de la emulsión, las cuales minimizan las interacciones hidroperóxidos lipídicos-metales de transición; (3) Secuestra (agente quelante) los metales prooxidantes y (4) Inactiva radicales libres a través de sus radicales sulfhídrico y otros aminoácidos (Hu y col., 2003a).

2.7.3.3.2 Goma arábica

La goma arábica (*Acacia senegal*) es un biopolímero hidrofílico de elevado peso molecular clasificado como hidrocoloide. Se utiliza como ingrediente funcional en la industria alimentaria para el control de microestructura, textura, sabor y vida útil. Este hidrocoloide es un hetero-polielectrolito complejo y ramificado con una columna vertebral de unidades de 1,3 β -galactopiranosas unidas a cadenas laterales de unidades de 1,6 galactopiranosas y finaliza en un ácido glucurónico o residuos de ácido 4-O-metil glucurónico. También contiene aproximadamente 2% de proteína unida covalentemente al carbohidrato a través de residuos de hidroxiprolina y serina, resultando en una mezcla de complejos de arabinogalactana-proteína, cada una conteniendo varias unidades de polisacáridos unidos a un núcleo común de proteína. Esta fracción de proteína asociada con una fracción de masa molecular elevada representa al menos el 30% de la goma total. Esta fracción proteica parece ser la responsable de las propiedades emulsificantes y estabilizantes del hidrocoloide. La cadena proteica hidrofóbica del híbrido proteína-polisacárido se fija en la interfase y los bloques de carbohidrato hidrofílico proveen una barrera fuertemente estérica hacia la coalescencia y floculación (Garti y Reichman, 1993; Garti y Leser, 2001; Dickinson, 2003).

Se ha reportado que las películas de goma arábica son más elásticas y de mayor estabilidad que otras películas construidas por otras gomas. Entre mayor sea

la masa molecular de la goma arábiga mayor será el espesor de las películas, mayor barrera estérica y por lo tanto mayor estabilidad (Dickinson, 2003).

2.7.3.4 Características de la región interfacial

Las gotas en la mayoría de las emulsiones están cubiertas por una capa de especies adsorbentes en el orden de protegerlas de la agregación (p.e. emulsificantes o biopolímeros). Las propiedades de la región interfacial están determinadas por el tipo, concentración e interacciones de algunas de las especies de superficie-activa presentes durante la homogeneización, también como por los eventos que ocurren antes, durante y después de la formación de la emulsión, por ejemplo, adsorción competitiva y formación capa por capa. Es posible controlar las características de la región interfacial, tal como tensión, carga, grosor, permeabilidad, reología y sensibilidad ambiental, por alterar la composición del sistema o condiciones de procesamiento. El control de las características de la región interfacial es uno de los métodos de diseño de sistemas de distribución más poderosos con ejecución de función específica. Las características de la región interfacial de las gotas de la emulsión pueden ser controladas por la selección de emulsificantes específicos. Por ejemplo, caseinatos tienden a formar capas de región interfacial fluidas espesas, mientras que las proteínas del suero forman capas delgadas elásticas (McClements y col., 2007).

2.7.4 Emulsiones basadas en sistemas de distribución para componentes lipofílicos bioactivos

Una razón para utilizar emulsiones es que diversas industrias se han planteado la necesidad de depositar componentes lipofílicos funcionales en una forma comestible y que se pueda aprovechar en el sector alimentario, farmacéutico y de salud. Estos componentes lipofílicos pueden ser diversas sustancias como lípidos bioactivos, saborizantes, antimicrobianos, antioxidantes y medicamentos. Es importante considerar la distribución de lípidos bioactivos que proveen beneficios de salud a humanos como ácidos grasos omega 3 (ω -3), carotenoides y fitoesteroles

(Cuadro 6). Además los mismos sistemas de distribución pueden utilizarse para encapsular otro tipo de componentes lipofílicos funcionales. La distribución de lípidos bioactivos en un medio acuoso es ventajoso ya que incrementa la aceptabilidad, deseabilidad y bioactividad. Por ejemplo, un lípido bioactivo incorporado en una bebida o alimento que puede ser bebido o consumido (McClements y col., 2007).

Cuadro 6. Principales componentes nutraceuticos lipofílicos que necesitan ser distribuidos en alimentos

Nombre	Tipos	Beneficio nutricional potencial
Ácidos grasos	ácidos grasos ω -3, ácido linoleico conjugado, ácido butírico.	Enfermedad coronaria del corazón, salud de huesos, respuesta inmune a desordenes, recuperación de peso, prevención de apoplejía, salud mental, cáncer y agudeza visual.
Carotenoides	β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina	Cáncer, enfermedad coronaria del corazón, degeneración macular y cataratas.
Antioxidantes	Tocoferoles, flavonoides y polifenoles.	Enfermedad coronaria del corazón, cáncer y enfermedad en el tracto urinario.
Fitoesteroles	Estigmasterol, β -sitosterol y campesterol.	Enfermedad coronaria del corazón

McClements y col., 2007

Los carotenoides endógenos en alimentos son generalmente estables. Sin embargo, como aditivos alimentarios, los carotenoides son relativamente inestables en sistemas alimentarios a causa que son susceptibles a luz, oxígeno y autooxidación. Consecuentemente la dispersión de carotenoides en un sistema de ingredientes puede resultar en su rápida degradación. Un reto es utilizar los carotenoides como ingredientes en alimentos funcionales debido a su alto punto de

fusión que los hace cristalizar durante el almacenamiento del alimento y a temperaturas del cuerpo (McClements y col., 2007).

2.7.4.1 Características de sistemas de distribución

Un sistema de distribución comestible debe cumplir con ciertas características para poder utilizarlo en la industria de alimentos, cosméticos u otra:

- a) Grado alimento: Debe ser elaborado de ingredientes alimentarios permitidos y utilizando operaciones de procesamiento aprobadas. Algunos de los ingredientes grado alimento que pueden ser utilizados para ensamblar sistemas de distribución basadas-en-emulsiones se indican en el Cuadro 7 (McClements y col, 2007).
- b) Producción económica: El sistema de distribución debe ser económico en su fabricación y de ingredientes de bajo costo. Los beneficios ganados de la encapsulación de lípidos bioactivos en un sistema de distribución (p.e. mejora la vida útil, aumenta el potencial de venta, nueva funcionalidad, mejor biodisponibilidad) debe valer más que los costos asociados con la encapsulación.
- c) Protección contra la degradación química: El sistema de distribución puede proteger un lípido bioactivo encapsulado contra algunas formas de degradación química, por ejemplo, oxidación e hidrólisis. Con base al conocimiento del mecanismo de la reacción de degradación química y los factores que la impactan (oxígeno, pH, calor) puede facilitar el diseño de un sistema de distribución más protector.
- d) Mecanismo de distribución: El sistema de distribución debe ser diseñado para que libere el lípido bioactivo en un particular sitio de acción a una velocidad controlada o en respuesta a un estímulo ambiental específico (pH, fuerza iónica, actividad enzimática o temperatura).

Cuadro 7. Principales componentes estructurales grado alimento que pueden ser utilizados para construir sistemas de distribución para componentes bioactivos.

Nombre	Características importantes	Ejemplos
Lípidos	No polaridad Estabilidad química	Grasas animales: res, cerdo, pollo. Aceites de pescado: hígado de bacalao, atún, salmón. Aceites vegetales: palma, coco, girasol, azafrán, maíz, semilla de linaza, semilla de soya. Aceites aromáticos: limón, naranja.
Surfactantes	Solubilidad (HBL) Carga de la cabeza de grupo. Geometría molecular Superficie cargada en saturación.	No-iónicos: Tween, Span. Aniónicos: SLS, DATEM, CITREM. Catiónicos: arginato láurico. Zwitteriónico: lecitina.
Biopolímeros	Masa molar Conformación Carga Hidrofobicidad Flexibilidad	Proteínas globulares: suero, soya, huevo. Proteínas flexibles: caseína, gelatina. Polisacáridos no iónicos: almidón, dextran, agar, galactomananas, celulosa. Polisacáridos aniónicos: alginatos, pectina, xantana, carragenina, goma arábica. Polisacáridos catiónicos: quitosano.

McClements y col., 2007

- e) Compatibilidad con la matriz del alimento: El sistema de distribución debe ser compatible con el medio de la matriz del alimento, es decir, no debe afectar la apariencia, textura, sabor o estabilidad del producto final.

- f) Biodisponibilidad/bioactividad: El sistema de distribución debe aumentar (o al menos no tener efecto adverso) la biodisponibilidad/bioactividad del componente encapsulado.

Diversos estudios epidemiológicos reportan que el consumo de jitomate y sus productos ricos en licopeno son de gran beneficio para la salud, ya que este carotenoide se considera un micronutriente con propiedades nutraceuticas relacionadas con la prevención de diferentes tipos de cáncer. Por otra parte, México cultiva diversas variedades de jitomate tanto para el mercado nacional como de exportación, siendo el 50% de la producción nacional la que se exporta a Estados Unidos. Sin embargo, cuando este país tiene suficiente producción las autoridades norteamericanas limitan el volumen de exportación del jitomate mexicano. Estas prácticas proteccionistas ocasionan en el mercado nacional una sobreoferta de producto y baja de precio.

Una alternativa para el aprovechamiento del excedente de jitomate es la obtención de los pigmentos carotenoides presentes, principalmente del licopeno para su uso como antioxidante, colorante natural y complemento nutricional o para la preparación de un alimento funcional mediante la incorporación de licopeno en una emulsión aceite-en-agua.

Al aplicar el escaldado al jitomate se inactivan sistemas enzimáticos (poligalacturonasa, pectinesterasa y polifenoloxidasas) que afectan los pigmentos y por tanto su color. La extracción del licopeno del jitomate cv Saladette se puede llevar a cabo con solventes como hexano y evaluar su estabilidad a factores como iluminación, diferentes temperaturas y aire. En la matriz del tejido del fruto el licopeno no se encuentra biodisponible, pero al extraerlo y disolverlo en una fase lipídica (aceite de canola) aumenta su biodisponibilidad. Se puede evaluar la estabilidad y actividad antioxidante en dicha fase.

Es posible formular una emulsión aceite-en-agua, en la cual el licopeno se encuentra en la fase dispersa (aceite de canola) y de esta manera aumentar su biodisponibilidad. En la formulación de la emulsión se pueden evaluar dos emulsificantes: (1) sistema lípido/proteína (suero de leche) y (2) sistema

lípidos/carbohidratos (goma arábiga). En una emulsión aumenta la estabilidad del licopeno, sobre todo cuando el emulsificante tiene aminoácidos. Estas emulsiones se pueden considerar como un sistema de distribución o transferencia de licopeno.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la extracción, recuperación y purificación del licopeno de jitomate cv Saladette para su estabilidad en sistemas alimentarios modelo: pigmento-lípido y pigmento/lípido-carbohidrato y pigmento/lípido-proteína.

Objetivos específicos

- ❖ Determinar las propiedades fisicoquímicas del jitomate Saladette en estado fresco y escaldado.
- ❖ Estudiar y seleccionar el método de extracción y purificación de los pigmentos carotenoides presentes en el jitomate.
- ❖ Determinar el efecto del escaldado (tratamiento térmico) en la concentración y estabilidad del licopeno.
- ❖ Evaluar la estabilidad y actividad antioxidante del licopeno, licopeno/lípido a factores como temperatura, iluminación, aire, antioxidantes y tiempo de almacenamiento.
- ❖ Caracterizar el licopeno en emulsiones aceite-en-agua: licopeno/lípido-proteína y licopeno/lípido-carbohidrato.
- ❖ Estudiar el efecto de los emulsificantes suero de leche (proteína) y goma arábica (hidrocoloide) en emulsiones de licopeno aceite-en-agua.

El fruto de jitomate cv Saladette en etapa rojo presenta un buen rendimiento de licopeno, el cual puede extraerse y utilizarlo como aditivo alimentario (colorante, antioxidante) o complemento nutricional.

- ❖ Factores como elevadas temperaturas, iluminación y oxígeno afectan la estabilidad del licopeno, sobretodo cuando se combinan luz y oxígeno.
- ❖ La degradación del licopeno es menor cuando se conserva en condiciones de oscuridad y/o se aplican antioxidantes durante su almacenamiento.
- ❖ En un sistema licopeno-lípido, el caroteno tiene efecto antioxidante en el aceite de canola y por tanto reduce la oxidación lipídica, prolongando la vida útil del lípido.
- ❖ La degradación del licopeno es mayor en una fase lipídica y elevadas temperaturas y/o iluminación.
- ❖ Es posible formar una fase estable de la combinación licopeno-lípido para formar una emulsión (O/W) considerando un sistema licopeno/lípido-proteína o licopeno/lípido-carbohidrato (hidrocoloide). Tomando en cuenta a la proteína y polisacárido como estabilizantes.

6.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por jitomates cv Saladette (tipo guaje) en etapas de madurez rojo claro y rojo de acuerdo al patrón de color que incluye la Norma Oficial Mexicana para tomate en estado fresco (*Lycopersicon esculentum* Mill.) NMX-FF-031-1997-SCFI, procedentes de Los Mochis. La hortaliza se adquirió en las bodegas mayoristas de la Central de Abasto “Hank González” de la Ciudad de México y se cosechó en Los Mochis, Sin., Los jitomates se seleccionaron y clasificaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana con base a la uniformidad de tamaño, forma, color y libre de daños y defectos. Los estudios se realizaron a jitomates en estado fresco como a jitomates sometidos a un tratamiento térmico de escaldado.

6.2 Métodos

6.2.1 Efecto de la etapa de madurez, almacenamiento a 4°C y tratamiento térmico en el jitomate Saladette

6.2.1.1 Escaldado

Los jitomates se sumergieron en agua a 93.5°C por 50 segundos con la finalidad de inactivar las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasa. Posteriormente se sometieron a enfriamiento con agua a temperatura ambiente (Takeoka y col., 2001; Fellows, 2007).

El lote de jitomates se almacenó a 4°C durante 13 días; los muestreos se realizaron durante ese tiempo. Las muestras fueron divididas en dos lotes de 24 jitomates cada uno, un grupo fue sometido a escaldado y el otro grupo sin escaldar como control (8 jitomates por cada repetición).

6.2.1.2 Determinación de pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST), azúcares reductores, ácido ascórbico y color.

Preparación de la muestra

Los jitomates escaldados y no escaldados, se picaron y homogeneizaron en un homogeneizador de tejidos (M133/1281-O Biospec Products Inc. Bartlesville, OK, EUA) durante 60 segundos a 4°C y se pasó cada extracto a través de un tamiz para eliminar la piel y semillas. El homogeneizado se utilizó para los análisis fisicoquímicos y extracción de pigmentos carotenoides. Estas operaciones se realizaron a las muestras en estudio a los 0, 6, 12 y 13 días.

Para los análisis fisicoquímicos se centrifugaron 100 g de homogeneizado a 4000 rpm por 20 minutos a 20°C en una centrifuga modelo IEC Centra CL3/CL3R (Termo Electrón Corporation, Waltham, MA, EUA), el sobrenadante se decantó y se le determinó pH, acidez titulable, sólidos solubles totales y azúcares reductores solubles (Figura 13).

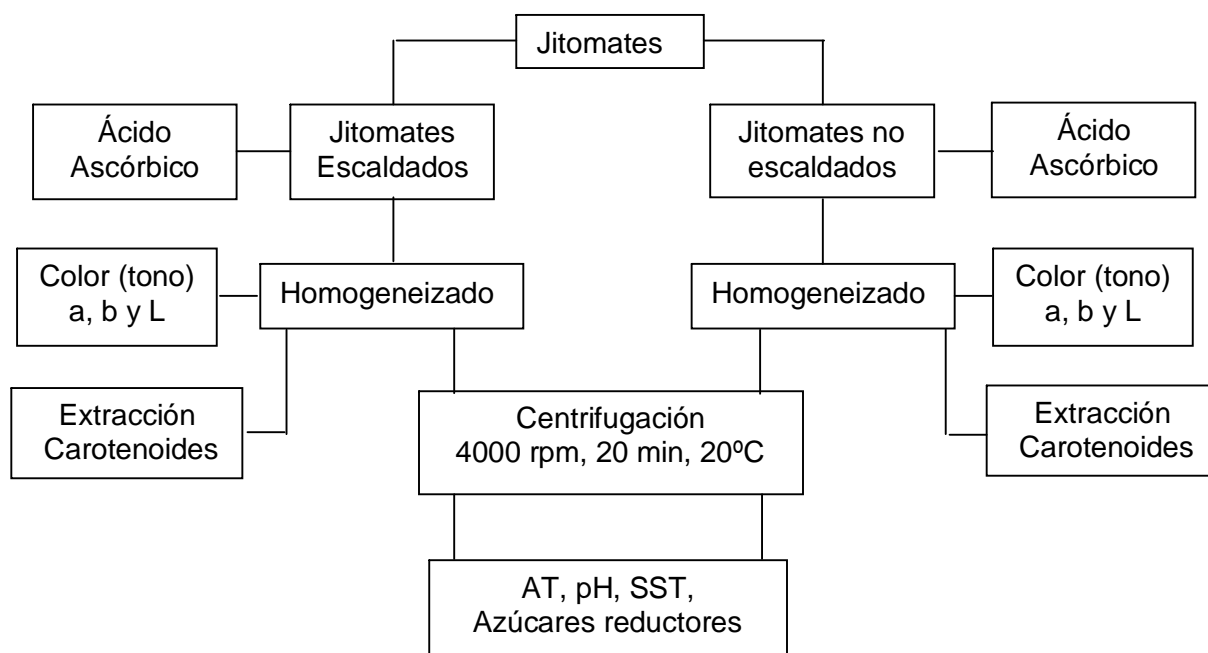


Figura 13. Diagrama de flujo para el análisis fisicoquímico en jitomates escaldados y no escaldados.

a.1 Determinación del pH, acidez titulable (AT) y sólidos solubles totales (SST).

Se llevaron a cabo según las técnicas descritas en el Anexo 1.

a.2 Determinación de la concentración de azúcares reductores solubles.

Se siguió el método descrito por Nelson-Somogyi (1944), reportado en el anexo 2.

a.3 Determinación de ácido ascórbico

Se siguió el método descrito por Robinson y Stotz, 1954 y AOAC, 1980. Se describe en el Anexo 3.

a.4 Determinación del color

Al homogeneizado se le determinó el color por el sistema CIE-LAB (Pomeranz y Meloan, 1994; Francis, 1999; Jiménez y Gutiérrez, 2001). Los parámetros L, a, b se cuantificaron con un espectrofotómetro 45/0 Hunter Lab, CM-2002 (apertura 19.1 mm, ángulo 10°, iluminante D₆₅, Hunter Associates Laboratory Inc. Reston, VA., EUA) y el software fue Universal v3.73. El instrumento fue estandarizado con una placa de cerámica blanca con las coordenadas a = - 1.07, b = 0.35 y L = 93.20.

El color del jitomate se calculó considerando el tono o matiz (H):

$$H = \arctan(b^*/a^*) = \tan^{-1}(b/a)$$

En la que L, a y b están en unidades Hunter.

L = luminosidad o claridad (0-100)

a = rojos (+) y verdes (-)

b = amarillos (+) y azules (-)

Un valor de tono menor y positivo indica un color más rojo (Thompson y col., 2000).

Cuadro 8. Fuentes de variación y variables de respuesta para los jitomates almacenados a 4°C y aplicación del escaldado.

Fuente de variación	Nivel
Tratamiento térmico	Escaldado y no escaldado
Tiempo	0, 6, 12 y 13 días
Variables respuesta	pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, ácido ascórbico, azúcares reductores, color (Hue).

6.2.2 Extracción del licopeno en jitomates con maduración en etapa rojo

6.2.2.1 Extracción de pigmentos carotenoides

El licopeno fue extraído a partir de 10 g de homogeneizado de jitomates escaldados o no escaldados, el cual se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 100 mL del sistema de disolventes hexano:acetona:etanol en una relación de 50:25:25; se cubrió con papel aluminio para evitar la fotooxidación y se sometió a agitación en un agitador orbital (Lab Line Instruments, Inc., Melrose Park, Ill, EUA) a 140 rpm por 15 minutos a una temperatura de 20°C. Para estudiar el efecto de los antioxidantes en la retención de licopeno, se adicionaron a la mitad de las muestras (escaldadas y no escaldadas) BHA:BHT al 0.025% (Sigma Chemicals. St. Louis, MO, EUA; Takeoka y col., 2001). Posteriormente se adicionaron 15 mL de agua para separar la capa de hexano (anaranjado) de la capa inferior (agua:etanol) y se agitó por 5 minutos a 140 rpm a 20°C. Después la capa superior de licopeno (aproximadamente 50 mL) se separó con una pipeta y se colectó en un matraz Erlenmeyer ámbar de 250 mL. El licopeno residual en la capa agua:etanol fue separado utilizando el mismo procedimiento (100 mL del sistema de disolventes y 15 mL de agua). La capa de hexano se separó con una pipeta, se colectó con la primera extracción y se agitó. El volumen total de extracción fue de aproximadamente 100 mL (Sadler y col., 1990; Thompson y col., 2000). El pigmento en hexano se concentró a vacío a un volumen final de 10 mL en un rotavapor Buchi 011 (Buchi Lab., Flawii 1,

Switzerland) a una temperatura de 35°C y posteriormente se llevó a un volumen de 250 mL con hexano. Esta disolución fue la que se utilizó para las pruebas de estabilidad del licopeno. Todos los procedimientos se realizaron rápidamente y bajo luz reducida (Figura 14).

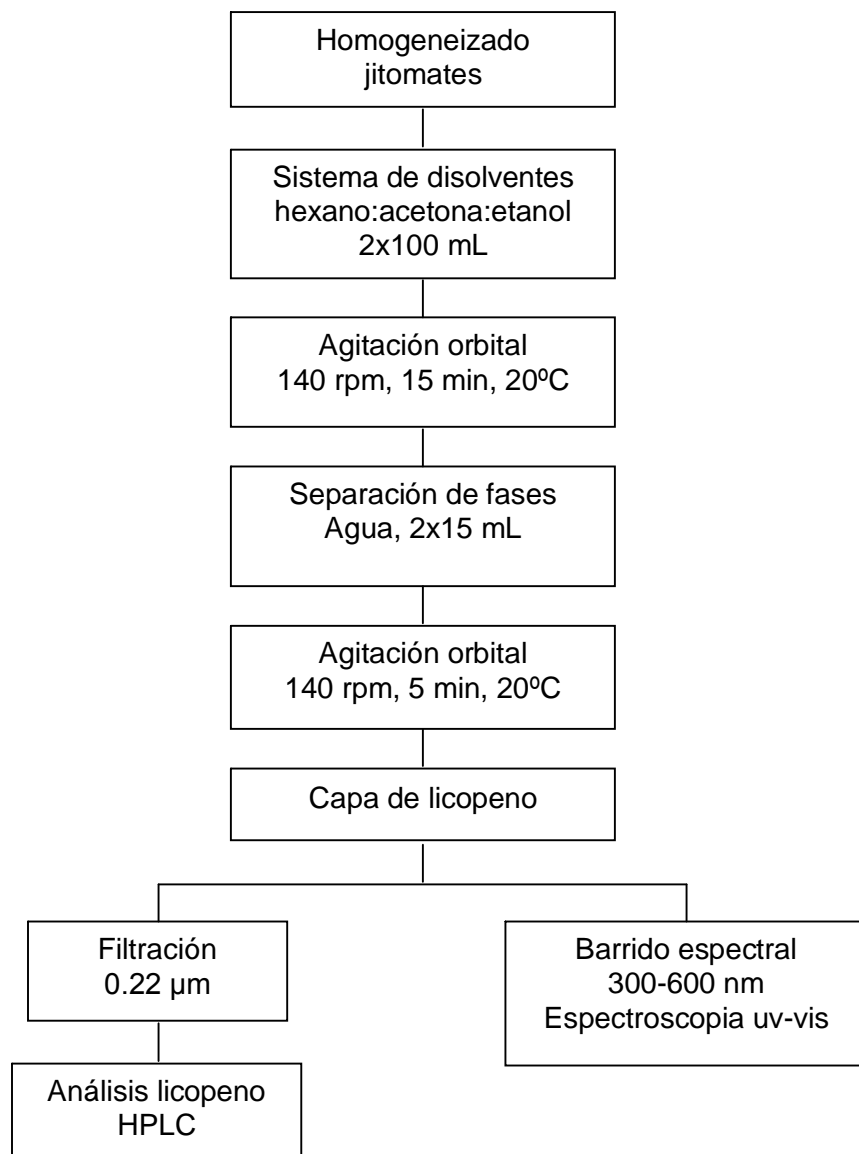


Figura 14. Diagrama de flujo para la extracción, separación y purificación del licopeno de jitomates escaldados y no escaldados.

6.2.2.2 *Análisis de licopeno en cromatografía líquida de alta resolución*

El pigmento fue identificado en las muestras de licopeno-hexano, las cuales fueron previamente filtradas a través de filtros 0.22 µm (Gelman Acrodis^{MR} GHP No.13, Pall Corporation, Exton, PA, EUA). La concentración de licopeno se determinó al inyectar las muestras filtradas y soluciones patrón preparadas de un estándar de licopeno de 90-95% (Sigma Chemical, St. Louis MO, EUA) a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Thermo Separation Products, ConstaMetric3200Bio, Riviera Beach, FL, EUA) para relacionar las áreas de los picos y tiempos de retención. Las condiciones del HPLC fueron: corridas isocráticas, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; un volumen de inyección de 20 µL y una longitud de onda de detección de 470 nm. Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ Spherisorb ODS2 de 250 mm de largo por 4.6 mm de diámetro interno (Waters Associates Inc., Milford, MA, EUA) y tamaño de partícula de 5 µm. De acuerdo a Thompson y col. (2000) la fase móvil consistió de acetonitrilo:metanol:diclorometano en una relación 43.3:43.3:13.4 v/v/v previamente desgasificada y filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 µm resistente a solventes Millipore^{MR} (Millipore, Bedford, MA).

6.2.2.3 *Espectrofotometría*

Los barridos espectrales (300nm-600nm) de las muestras de carotenoides colectados en hexano se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-600 UV-vis (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EUA) utilizando celdas de cuarzo y hexano como blanco.

6.2.3 *Estabilidad del licopeno*

6.2.3.1 *Preparación de las muestras en almacenamiento*

La extracción del licopeno se llevó a cabo como se describió en el inciso 6.2.2.1. La estabilidad del licopeno fue estudiada en las soluciones del carotenoide en hexano extraídos de jitomates escaldados y no escaldados bajo las siguientes condiciones y niveles: antioxidantes (ninguno y BHA:BHT al 0.025%);

almacenamiento en oscuridad y luz fluorescente a 20°C. También se aplicaron temperaturas de 4, 20 y 60°C en condiciones de oscuridad.

Las muestras fueron preparadas bajo las siguientes condiciones: A viales de 20 mL de capacidad, se les adicionó 10 ml de la solución de licopeno dejando el 50% de espacio de cabeza y cubriéndolos con papel aluminio, se almacenaron en oscuridad a 4, 20 y 60°C. Otras muestras fueron colocadas en viales transparentes y almacenadas a 20°C bajo luz fluorescente de 4186 lux a una distancia de la fuente luminosa de 30 cm (luxómetro CIR LX-101, Cole Parmer Instrument Company, Chicago, IL, EUA) para promover la fotooxidación (Goulson y Warthesen, 1999; Figura 15). Los tiempos de almacenamiento fueron 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis. La concentración de licopeno se determinó con HPLC como se describió en 5.2.2.2. Seis experimentos con tres replicas fueron realizados bajo las condiciones indicadas en el cuadro 9.

Cuadro 9. Diseño de experimentos con licopeno y hexano

Experimento	Unidad experimental	Condiciones (niveles)
Ia	Licopeno en hexano (jitomates escaldados).	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
Ib	Licopeno en hexano (jitomates no escaldados).	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
IIa	Licopeno en hexano (jitomates escaldados) con antioxidantes y 20°C.	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
IIb	Licopeno en hexano (jitomates escaldados) sin antioxidantes y 20°C.	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
IIIa	Licopeno en hexano (jitomates escaldados) con antioxidantes.	Temperatura: 4, 20 y 60°C. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días
IIIb	Licopeno en hexano (jitomates escaldados) sin antioxidantes.	Temperatura: 4, 20 y 60°C. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días

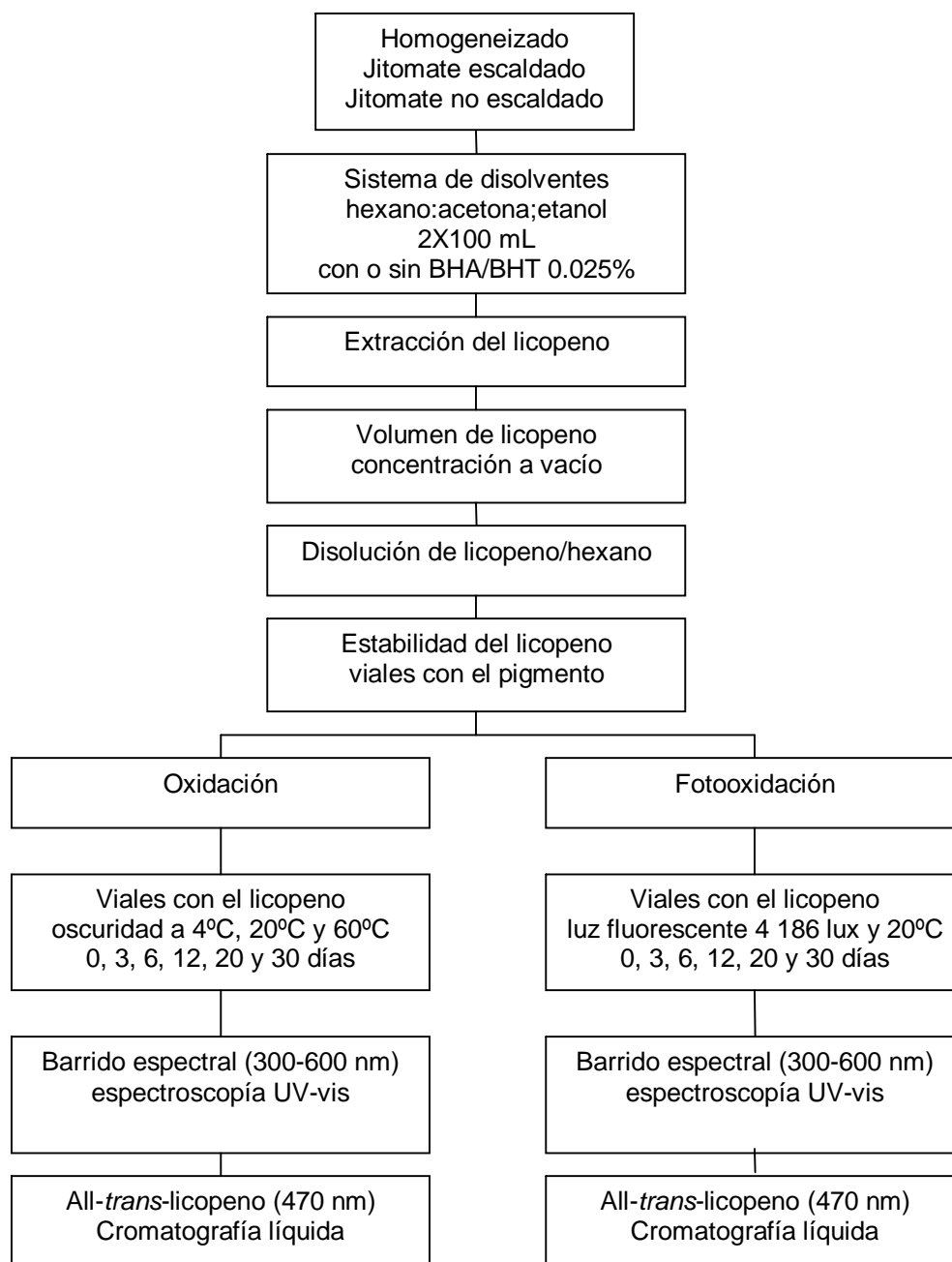


Figura 15. Diagrama de flujo para la estabilidad del licopeno a diferentes condiciones de almacenamiento durante 30 días.

6.2.3.2 Barrido espectral

El contenido de licopeno de los extractos de este carotenoide de los jitomates escaldados y no escaldados con y sin antioxidante se cuantificó espectrofotométricamente a 470 nm y con apoyo de una curva estándar de licopeno (pureza de 90% a 95% de Sigma Chemical, St. Louis, MO., EUA). Estas mismas disoluciones se inyectaron en el HPLC con el mismo propósito. También para cada extracto de licopeno se realizó su barrido espectral (300-600 nm) para asegurar la presencia del mismo (Hakala y Heinonen, 1994; Hart y Scott, 1995; Anguelova y Wathersen, 2000a).

Cuadro 10. Fuentes de variación y variables de respuesta para las disoluciones de licopeno almacenadas en condiciones de oscuridad (autooxidación) y luz (fotooxidación).

Fuente de variación	Nivel
Tratamiento térmico	Escaldado y no escaldado
Iluminación	Oscuridad y luz
Antioxidantes	Con antioxidantes y sin antioxidantes
Temperatura	4, 20 y 60°C
Tiempo	0, 3, 6, 12, 20 y 30 días
Variable respuesta	Concentración de licopeno

6.2.4 Estabilidad y actividad antioxidante del licopeno en aceite de canola

6.2.4.1 Estabilidad del licopeno en aceite de canola

6.2.4.1.1 Preparación de las muestras en un sistema licopeno/aceite de canola

La extracción del licopeno se llevó a cabo como se describió en el inciso 6.2.2.1 El volumen total de extracción fue de aproximadamente 100 mL, se separaron 4 mL de la mezcla y se paso a través de un filtro de 0.22 μm (Gelman Acrodis^{MR} GHP No.13, Pall Corporation, Exton, PA, EUA). El filtrado se utilizó para

determinar la concentración del pigmento de acuerdo al inciso 6.2.2.2. El resto de la mezcla se concentró a vacío a un volumen final de 10 mL en un rotavapor Buchi 011 (Buchi Lab., Flawii 1, Switzerland) a una temperatura de 35°C y posteriormente se llevó a un volumen de 250 mL con aceite de canola. Esta disolución fue la que se utilizó para las pruebas de estabilidad y actividad antioxidante del licopeno en aceite de canola.

6.2.4.1.2 Preparación de las muestras en almacenamiento

La estabilidad del licopeno fue estudiada en las disoluciones del carotenoide en aceite de canola extraídos de jitomates escaldados bajo las siguientes condiciones y niveles: antioxidantes (ninguno y BHA:BHT al 0.025%); almacenamiento en oscuridad y luz fluorescente a 20°C. También se aplicaron temperaturas de 4, 20 y 60°C en condiciones de oscuridad.

Las muestras fueron preparadas bajo las siguientes condiciones: A viales de 20 mL de capacidad, se les adicionó 10 ml de la solución de licopeno en aceite de canola dejando el 50% de espacio de cabeza y cubriéndolos con papel aluminio, se almacenaron en oscuridad a 4, 20 y 60°C. Otras muestras fueron colocadas en viales transparentes y almacenadas a 20°C bajo luz fluorescente de 4186 lux a una distancia de la fuente luminosa de 30 cm (luxómetro CIR LX-101, Cole Parmer Instrument Company, Chicago, IL, EUA) para promover la fotooxidación (Goulson y Warthesen, 1999; Figura 16). Los tiempos de almacenamiento fueron 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Cuatro experimentos con tres réplicas fueron realizados bajo las condiciones indicadas en el cuadro 11.

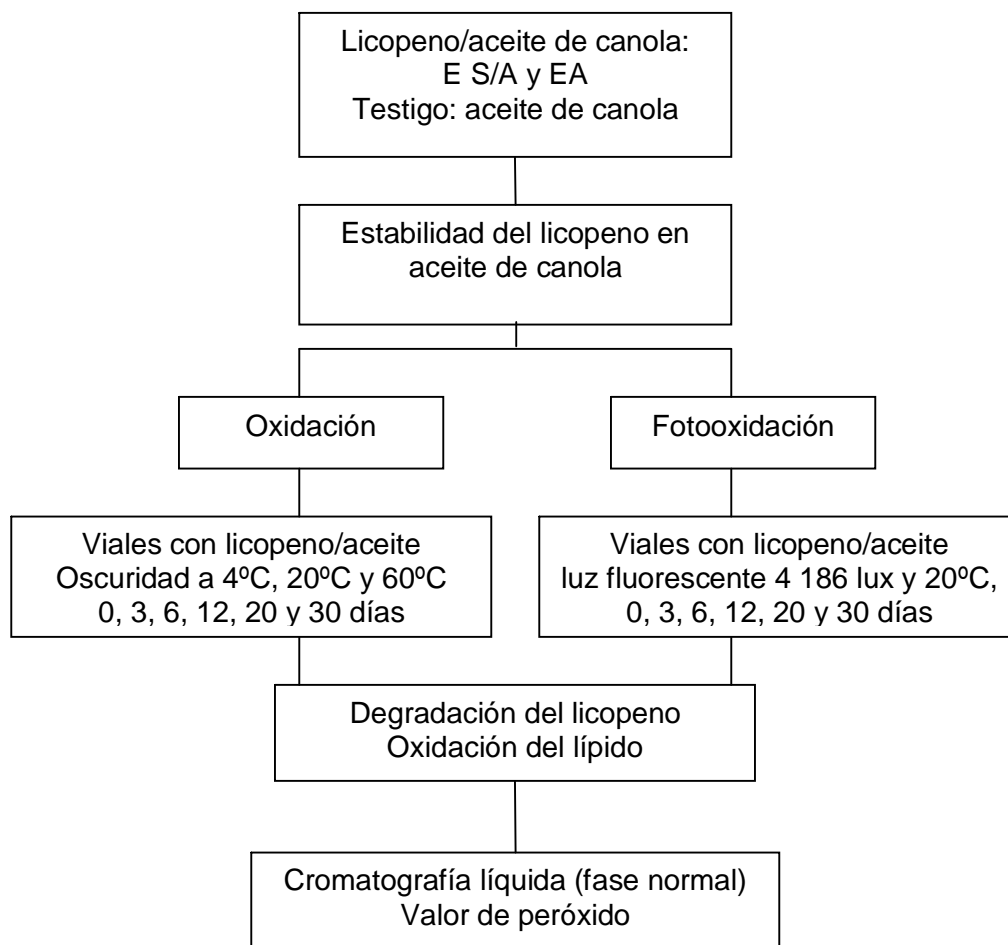


Figura 16. Diagrama de flujo para las pruebas de estabilidad del licopeno en aceite de canola a diferentes condiciones de almacenamiento durante 30 días.

Cuadro 11. Diseño de experimentos con licopeno en aceite de canola

Experimento	Unidad experimental	Condiciones (niveles)
IVa	Licopeno en aceite de canola (jitomates escaldados) con antioxidantes y 20°C.	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
IVb	Licopeno en aceite de canola (jitomates escaldados) sin antioxidantes y 20°C.	Iluminación: luz y oscuridad. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días.
Va	Licopeno en aceite de canola (jitomates escaldados) con antioxidantes.	Temperatura: 4, 20 y 60°C. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días
Vb	Licopeno en aceite de canola (jitomates escaldados) sin antioxidantes.	Temperatura: 4, 20 y 60°C. Tiempo: 0, 3, 6, 12, 20 y 30 días

6.2.4.1.3 Análisis de licopeno en cromatografía líquida de alta resolución fase normal

El pigmento fue identificado en las muestras de licopeno-aceite de canola, las cuales fueron previamente filtradas a través de filtros 0.22 μm (Gelman Acrodis^{MR} GHP No.13, Pall Corporation, Exton, PA, EUA). La concentración de licopeno se determinó al inyectar las muestras filtradas y soluciones patrón preparadas de un estándar de licopeno de 90-95% (Sigma Chemical, St. Louis MO. EUA) a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Thermo Separation Products, ConstaMetric3200Bio, Riviera Beach, FL, EUA) para relacionar las áreas de los picos y tiempos de retención. Las condiciones del HPLC fueron: corridas isocráticas, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; un volumen de inyección de 20 μL y una longitud de onda de detección de 470 nm. Se utilizó una columna de fase normal silica Spherisorb S5W de 100 mm de largo por 4.6 mm de diámetro interno (Waters

Associates Inc., Milford, MA, EUA), y tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil consistió de 2-propanol al 0.65% en hexano grado HPLC (Goulson y Warthesen, 1999). La fase móvil fue previamente filtrada con una membrana Millipore^{MR} (Millipore, Bedford, Mass., EUA) de 0.45 µm resistente a disolventes y desgasificada antes de su aplicación en el cromatógrafo. Las muestras fueron preparadas haciendo una dilución al 7% del aceite (p/p).

6.2.4.2 Efecto antioxidante del licopeno

6.2.4.2.1 Determinación del valor de peróxido en aceite de canola

El efecto antioxidante del licopeno se determinó por el valor de peróxido en el aceite de canola según las técnicas descritas en el Anexo 4

Cuadro 12. Fuentes de variación y variables de respuesta para las disoluciones de licopeno en aceite de canola almacenados en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C (autooxidación) y luz a 20°C (fotooxidación).

Fuente de variación	Nivel
Antioxidante	Con antioxidantes y sin antioxidantes
Iluminación	Luz, oscuridad
Temperatura	4, 20 y 60°C
Tiempo	0, 3, 6, 12, 20 y 30 días
Variables respuesta	Concentración de licopeno Valor de peróxido

6.2.5 Estabilidad de emulsiones de licopeno (Aceite/Agua)

6.2.5.1 Preparación del licopeno para las emulsiones Aceite/Agua.

La extracción del licopeno proveniente de jitomates escaldados y no escaldados se llevó a cabo como se describió en el inciso 6.2.2.1. El volumen total de extracción fue de aproximadamente 100 mL, se separaron 4 mL de la mezcla y se paso a través de un filtro de 0.22 μm (Gelman Acrodis^{MR}GHP No.13, Pall Corporation, Exton, PA, EUA). El filtrado se utilizó para determinar la concentración del pigmento de acuerdo al inciso 6.2.2.2. El resto de la mezcla se concentro a vacío hasta sequedad en un rotavapor Buchi 011 (Buchi Lab., Flawii 1, Switzerland) a una temperatura de 35°C. El residuo se cubrió con papel aluminio y se dejo reposar toda la noche para eliminar el olor a hexano. Posteriormente se llevó a un volumen de 125 mL con aceite de canola y 8.75 mg de α -tocoferol como antioxidante para conformar la fase dispersa (Ribeiro y col., 2003). En la fase continua se adicionó el estabilizante: el suero de leche (proteína) o la goma arábica (carbohidrato).

6.2.5.2 Emulsiones de licopeno (aceite/agua).

6.2.5.2.1 Emulsión de licopeno con suero de leche como estabilizante

Las emulsiones se prepararon según el anexo 5

6.2.5.2.2 Emulsiones de licopeno con goma arábica como estabilizante

Las emulsiones se prepararon según el anexo 5

6.2.5.3 Preparación de las muestras en almacenamiento.

Las emulsiones de licopeno y testigos se colocaron en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad y se cubrieron con hojas de papel aluminio; se almacenaron a temperatura de 4°C durante 20 días (Figura 17). Dos experimentos con tres replicas fueron realizados bajo las condiciones indicadas en el cuadro 13.

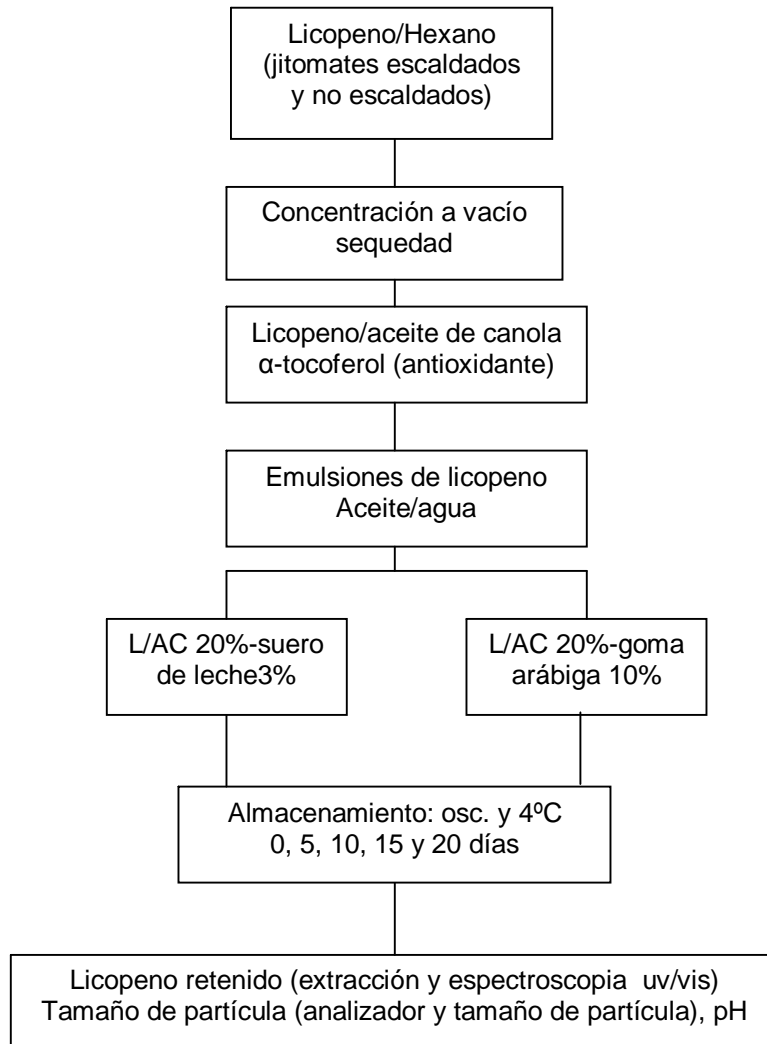


Figura 17. Diagrama de flujo para las pruebas de estabilidad de las emulsiones Aceite (licopeno)/Agua almacenadas a 4°C durante 20 días.

6.2.5.4 Determinación del pH.

Se llevaron a cabo según las técnicas descritas en el Anexo 1.

6.2.5.5 Determinación del licopeno retenido.

La extracción del licopeno de la emulsión se realizó por el sistema de disolventes descrito en el inciso 6.2.2.1 y la concentración de licopeno se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-600 UV-vis (Beckman Instruments, Inc.,

Fullerton, CA, EUA) a una longitud de onda de 470 nm y utilizando celdas de cuarzo y hexano como blanco.

6.2.5.6 Determinación del tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo con las muestras de las emulsiones a temperatura ambiente en un analizador y tamaño de partícula Malvern Instrument, serie 2600, modelo PS14B serial 178, software 2600 versión B.OD. serial 2852, diodo no. DT 13135 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Reino Unido).

Cuadro 13. Diseño de experimentos con licopeno en emulsión

Experimento	Unidad experimental	Condiciones (niveles)
Vla	Licopeno aceite de canola/suero de leche.	Tratamiento térmico: escaldado y no escaldado. Tiempo: 0, 5, 10, 15 y 20 días.
Vlb	Licopeno aceite de canola/goma arábica.	Tratamiento térmico: escaldado y no escaldado. Tiempo: 0, 5, 10, 15 y 20 días.

Cuadro 14. Fuentes de variación y variables respuesta para las emulsiones Agua/Aceite con licopeno en la fase dispersa almacenadas a 4°C.

Fuente de variación	Nivel
Tratamiento térmico	Escaldado, no escaldado
Estabilizador	Goma arábica 10%, suero de leche 3%
Tiempo	0, 5, 10, 15 y 20 días
Variables respuesta	Concentración de licopeno Tamaño de partícula pH

6.2.6 Análisis estadístico

Los datos de retención de licopeno fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA para diseños de dos factores: escaldado-tiempo, iluminación-tiempo, temperatura-tiempo y las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) correspondientes a los factores principales y la interacción; tanto para las disoluciones de licopeno en hexano, licopeno en aceite de canola como para las emulsiones Aceite/Agua.

Se ajustaron modelos exponenciales para retención de licopeno a través del tiempo utilizando regresión curvilínea (equivalente a un modelo de regresión lineal simple aplicando logaritmo natural a la función exponencial) y se compararon las pendientes o velocidades de degradación mediante la prueba de t-Student. Se calcularon en los modelos ajustados los tiempos en los que se retuvo el 50 % de licopeno. El programa fue SPSS para Windows 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, Ill., EUA). Para la comprobación de la normalidad de los errores se utilizó el programa NCSS para Windows 2001 software (NCSS Inc., Kaysville, Ut., EUA).

7.1 Efecto del escaldado en las propiedades fisicoquímicas del jitomate cv. Saladette después del almacenamiento a 4°C.

La maduración del jitomate es un proceso programado genéticamente que culmina con cambios en el color, textura, sabor y composición química. Debido a que el jitomate es un fruto climatérico, éste puede madurar después de la cosecha, y su composición nutricional final dependerá del proceso de maduración y temperatura de almacenamiento (Javanmardi y Kubota, 2006). En esta parte de la investigación se estudio el efecto del almacenamiento a 4°C en la composición fisicoquímica de jitomates en madurez rojo. Posteriormente, se evaluó los cambios ocasionados por el escaldado.

Cuadro 15. Efecto del escaldado en las propiedades fisicoquímicas del jitomate cv. Saladette después del almacenamiento a 4°C.

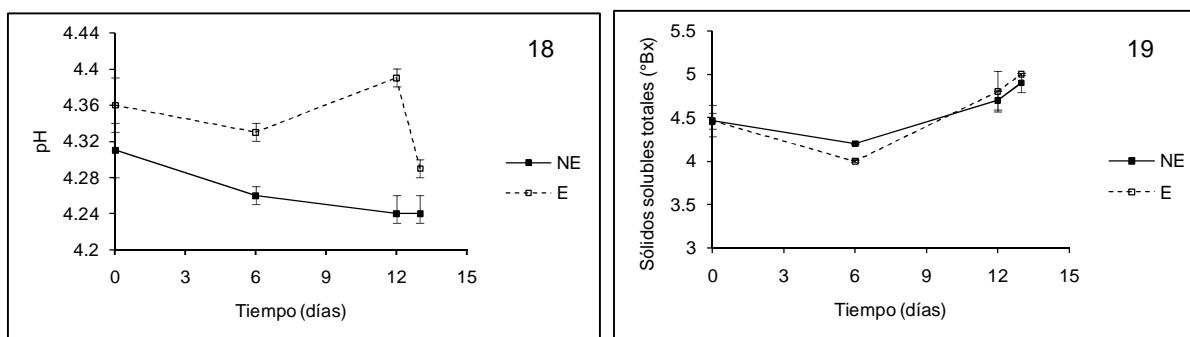
Tratamiento	Tiempo días	pH	S.S.T °Bx	A.T % ác. Cítrico	Ácido ascórbico mg/100g	Azúcares Reductores %	Tono Tan ⁻¹ (b/a)
Sin escaldar	0	4.31 (0.06)	4.46 (0.09)	0.321 (0.01)	21.82 (0.44)	0.059 (0.14)	0.524 (0.01)
	6	4.26 (0.01)	4.20 (0.01)	0.297 (0.01)	33.70 (0.57)	0.570 (0.39)	0.541 (0.12)
	12	4.24 (0.02)	4.70 (0.11)	0.309 (0.01)	34.12 (0.52)	0.940 (0.25)	0.613 (0.01)
	13	4.24 (0.02)	4.90 (0.11)	0.237 (0.06)	36.78 (0.29)	1.870 (0.09)	0.569 (0.04)
Escaldados	0	4.36 (0.03)	4.46 (0.09)	0.313 (0.02)	23.63 (0.66)	0.072 (0.02)	0.573 (0.01)
	6	4.33 (0.01)	4.00 (0.01)	0.280 (0.01)	29.33 (0.19)	0.536 (0.06)	0.627 (0.01)
	12	4.39 (0.01)	4.80 (0.08)	0.242 (0.01)	31.42 (0.32)	1.049 (0.41)	0.644 (0.01)
	13	4.29 (0.01)	5.00 (0.01)	0.240 (0.01)	30.92 (0.34)	2.067 (0.13)	0.651 (0.01)

Medias (desviación estándar).

7.1.1 pH

En el cuadro 15 y figura 18 se muestra que el pH de los jitomates sin escaldar (control) presentó un descenso durante los trece días de almacenamiento a 4°C. Sin embargo, al aplicar el tratamiento térmico (escaldado), los valores de pH de los

jitomates escaldados fueron significativamente más altos ($p \leq 0.001$). La media estimada para las muestras no escaldadas fue menor ($\text{pH} = 4.26$) que para muestras escaldadas ($\text{pH} = 4.34$). En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, sólo en el día trece, el pH presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los demás días de almacenamiento, el valor fue de 4.27. En la medida en que se aumentaron los días de almacenamiento, el valor de pH disminuyó.



Figuras 18 y 19. Comportamiento del pH y sólidos solubles totales con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico. Claves: NE = no escaldado, E = escaldado.

El tratamiento térmico promovió la maduración del jitomate con el consecuente aumento de pH. Periago y col. (2007) reportaron un pH de 4.24 para jitomates cultivar “Canario” en estado fresco y un pH de 4.25 para jitomates escaldados por el método de “hot break” y procesados como salsa.

7.1.2 Sólidos solubles totales

Los factores principales para el diseño dos factorial fueron tratamiento térmico y tiempo. El tratamiento térmico no fue significativo ($p \leq 0.05$) con respecto a los sólidos solubles totales, mientras que el tiempo y la interacción tratamiento térmico*tiempo si fueron significativos ($p \leq 0.001$).

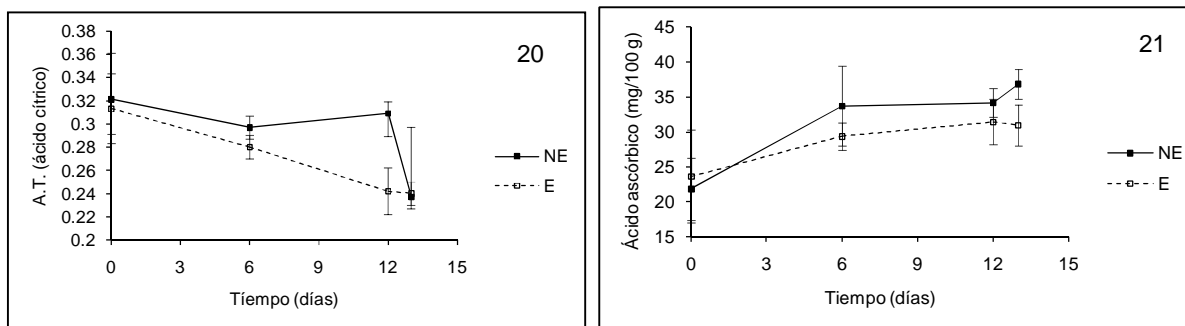
La media estimada para las muestras escaldadas y para las muestras no escaldadas fue de 4.56 %. En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, todos

los días de almacenamiento presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los sólidos solubles totales, siendo el valor a los trece días de 4.95 %. Al aumentar los días de almacenamiento y aplicar el escaldado los sólidos solubles totales aumentaron (Figura 19).

Con respecto a las interacciones tratamiento térmico*tiempo, las medias estimadas de los sólidos solubles totales las muestras no escaldadas y muestras escaldadas en el día trece no presentaron diferencia significativa entre sí pero si fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de las demás, sus valores fueron 4.90 y 5.00 % respectivamente. Kaur y col., 1999 reportaron 5.25°Bx para tomates frescos cv. "Pusa Gaurav" y 5.30°Bx para jitomates escaldados por el método de "hot break", no hubo diferencia significativa. Por otra parte, Takeoka y col., (2001), indicaron que los sólidos solubles para jitomates cultivar BOS 3155 en estado fresco y para el extracto resultado del tratamiento térmico de "hot break" fueron de 5.4°Bx , no hubo diferencia significativa.

7.1.3 Acidez titulable

Los factores principales para el diseño dos factorial fueron tratamiento térmico y tiempo. El tiempo fue significativo con respecto a la acidez titulable ($p \leq 0.001$) no así el tratamiento térmico y la interacción tratamiento térmico*tiempo.



Figuras 20 y 21. Comportamiento de la acidez titulable y concentración de ácido ascórbico con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico. Claves: NE = no escaldado, E = escaldado.

La media estimada de acidez titulable para las muestras escaldadas fue menor (0.269 %) que la media para las muestras no escaldadas (0.291 %). En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, sólo en el día trece, la acidez titulable presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los demás días de almacenamiento, el valor fue de 0.238 %. En la medida en que se aumentaron los días de almacenamiento, los valores de acidez titulable disminuyeron (Figura 20).

Con respecto a las interacciones tratamiento térmico*tiempo, las medias estimadas de la acidez titulable en las muestras escaldadas de los días doce y trece y no escaldadas en el día trece presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás, sus valores estuvieron en un rango de 0.237 - 0.242 %.

La acidez influye en el sabor y consistencia del producto, esta disminución puede ser por degradación de los ácidos orgánicos debido al tratamiento térmico.

7.1.4 Ácido ascórbico

Los factores principales para el diseño dos factorial fueron tratamiento térmico y tiempo. Ambos factores y la interacción tratamiento térmico*tiempo fueron significativos con respecto al ácido ascórbico en el jitomate ($p \leq 0.001$).

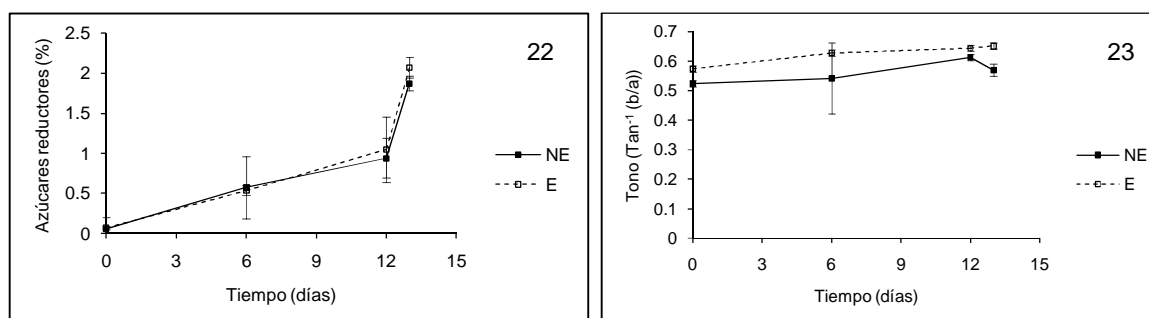
La media estimada para las muestras escaldadas fue menor (28.82 mg/100 g) que para muestras no escaldadas (31.60 mg/100 g). La pérdida del ácido ascórbico por el escaldado fue del 9.0 %. En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, todos los días de muestreo fueron significativos ($p \leq 0.05$) con respecto al ácido ascórbico, para el día trece el valor fue de 33.85 mg/100 g. En la medida en que se aumentaron los días de almacenamiento y se aplicó el tratamiento térmico, el contenido de ácido ascórbico disminuyó (Figura 21).

Con respecto a las interacciones tratamiento térmico*tiempo, las medias estimadas del ácido ascórbico en las muestras no escaldadas del día trece presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás, su valor fue de 36.78 mg/100 g.

El ácido ascórbico fue el componente más susceptible al tratamiento térmico (escaldado). Abushita y col. (2000) reportaron una concentración de ácido ascórbico de 21 mg/100 g en jitomates cv Jovanna en estado fresco y una vez sometidos a tratamiento térmico por “hot break”, la concentración fue de 13 mg/100 g, la pérdida por el tratamiento térmico fue del 38 %.

7.1.5 Azúcares reductores

Durante la maduración del tomate se incrementa el contenido de azúcares reductores mientras que la sacarosa y los ácidos orgánicos tienden a disminuir; la relación fructosa/glucosa se mantiene constante (Arias, 1992). Bajas temperaturas disminuyen la maduración y respiración del jitomate, sin embargo aún a la temperatura de almacenamiento de 4°C se promovió la síntesis de azúcares reductores en las muestras. Por otra parte, altas temperaturas aceleran la maduración del fruto y síntesis de azúcares reductores.



Figuras 22 y 23. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores y tono con respecto al tiempo en jitomate Saladette almacenado a 4°C y posterior tratamiento térmico. Claves: NE = no escaldado, E = escaldado.

El tratamiento térmico no fue significativo ($p \leq 0.05$) con respecto a los azúcares reductores en el jitomate, mientras que el tiempo y la interacción tratamiento térmico*tiempo si fueron significativos ($p \leq 0.001$).

La media estimada para las muestras escaldadas fue mayor (0.931 %) que para muestras no escaldadas (0.860 %). En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, todos los días de muestreo fueron significativos ($p \leq 0.05$) con respecto a los azúcares reductores, para el día trece el valor fue de 1.96 %. En la medida en que se aumentaron los días de almacenamiento y se aplicó el tratamiento térmico, el contenido de azúcares reductores aumentó (Figura 22).

Con respecto a las interacciones tratamiento térmico*tiempo, las medias estimadas de azúcares reductores en el día seis en las muestras escaldadas y no escaldadas no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sí, mientras que en los demás días sí presentaron diferencia significativa. Al aplicar el tratamiento térmico el contenido de azúcares reductores aumentó; la media estimada para las muestras escaldadas fue de 2.06 % y de 1.87 % en muestras no escaldadas en el día trece. Cano y col. (2005) reportaron un contenido total de azúcares reductores en jitomates maduros frescos de 2.6%. Mientras que Spagna y col. (2005) reportaron un contenido total de azúcares de 2.84 % en jitomates cv Rosa Maletto en estado fresco.

7.1.6 Color (tono o matiz)

El color es un importante factor de calidad en el jitomate y sus productos procesados y está determinado por el pigmento licopeno. Thompson y col. (2000) sugirieron que el valor de tono o matiz ($\tan^{-1}(b/a)$) es un parámetro relacionado con la concentración de licopeno e indicaron que un valor de tono bajo y positivo indica un color más rojo y mayor concentración de licopeno.

En el estudio el escaldado, el tiempo y la interacción tratamiento térmico*tiempo fueron significativos con respecto al tono o matiz en el jitomate ($p \leq 0.001$).

La media estimada del tono para las muestras escaldadas fue mayor (0.624) que para muestras no escaldadas (0.562). En la prueba de comparaciones múltiples

de Tukey, los días doce y trece no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$), pero con respecto a los demás días sí; el rango fue de 0.610 – 0.628. El valor del tono aumento después de aplicar el escaldado (Figura 23).

Con respecto a las interacciones tratamiento térmico*tiempo, las media estimada de tono en el día trece en las muestras escaldadas presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás, siendo el valor de 0.65. Al aplicar el tratamiento térmico el tono aumentó, es decir el color rojo fue menor.

Thompson y col. (2000) reportaron un decremento en el valor del tono a medida que el fruto maduraba, fue el caso del cultivar Suncoast (og); en estado verde el tono (H) fue de – 1.35, a los seis días fue de 0.62 y a los doce días en estado rojo el tono fue de 0.52. Estos investigadores al igual que Martínez-Valverde y col. (2002) encontraron que a menor valor de tono el fruto presentó un color más rojo.

7.2 Efecto del tratamiento térmico en el color y concentración de licopeno en el jitomate entero en etapa rojo

7.2.1 Efecto del escaldado en el color y concentración del licopeno

Con respecto al día trece de almacenamiento, el valor promedio del tono de los homogeneizados de las muestras no escaldadas fue menor (0.569) indicando un color más rojo; estas muestras también tuvieron el contenido de licopeno más elevado 79.20 $\mu\text{g/g}$ (Cuadro 16). Una vez que se aplicó el escaldado, el valor promedio del tono de los homogeneizados de las muestras escaldadas fue mayor (0.651) indicando un color menos rojo; estas muestras presentaron menor contenido de licopeno 75.25 $\mu\text{g/g}$ (Cuadro 16). El valor de tono del homogeneizado de jitomate correlaciona bien con el contenido de licopeno (coeficiente de correlación = -0.948), por lo que es un buen indicador del contenido de licopeno.

Cuadro 16. Longitud de onda de los picos, hombros y tono de jitomates cv Saladette no escaldados y escaldados

Tratamiento	λ máxima experimental nm	λ máxima literatura nm	Tono $\tan^{-1}(b/a)$	Licopeno $\mu\text{g/g}$
J. no escaldado	444, 468, 500	446, 473, 504 ⁽¹⁾ 444, 470, 502 ⁽²⁾ 446, 472, 503 ⁽²⁾ 444, 471, 501 ⁽³⁾	0.569 (0.04)	79.20 (1.94)
J. escaldado	444, 470, 502	446, 473, 504 ⁽¹⁾ 446, 472, 503 ⁽²⁾	0.651(0.01)	75.25 (2.09)
Estándar	442, 470, 502			

Medias (desviación estándar).

(1) Tonucci y col (1995) y Anguelova y Warthesen (2000a)

(2) Britton (1996)

(3) Tan B. (1988)

7.2.2 Efecto del escaldado en el espectro de absorción del licopeno en hexano.

Al realizar el barrido espectral (300-550 nm) de las muestras de licopeno extraído del jitomate no escaldado y escaldado del día trece, se obtuvieron los espectros de absorción que se muestran en la figura 12. Los valores de absorbancia del pico y hombros del espectro de las muestras de licopeno de jitomate no escaldado fueron mayores (2.840, 3.412, 3.064 para 444, 468 y 500 nm respectivamente) que los valores de las muestras de licopeno de jitomate escaldado (2.447, 3.264, 2.838 para 444, 470 y 502 nm respectivamente). La pérdida en la intensidad de las principales bandas (hombros y pico) a 444, 468 y 500 nm, fue debido al tratamiento térmico que ocasionó que el licopeno sufriera isomerización y ligera oxidación (debido a la presencia de oxígeno en los tejidos). Cole y Kapur (1957a,b), reportaron pérdidas en la intensidad del color de licopeno en hexano y en pulpas de jitomate libre de suero debido a la isomerización térmica y posible asociación con una ligera pérdida por oxidación debido a la presencia de aire. Anguelova y Warthesen (2000a) indicaron que la pérdida de color en jitomate deshidratado por aspersion es debido a la degradación del licopeno a través de la

isomerización (5,5'-di-*cis* licopeno) pero principalmente la oxidación (5, 6-dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno o licopeno-5,6-diol).

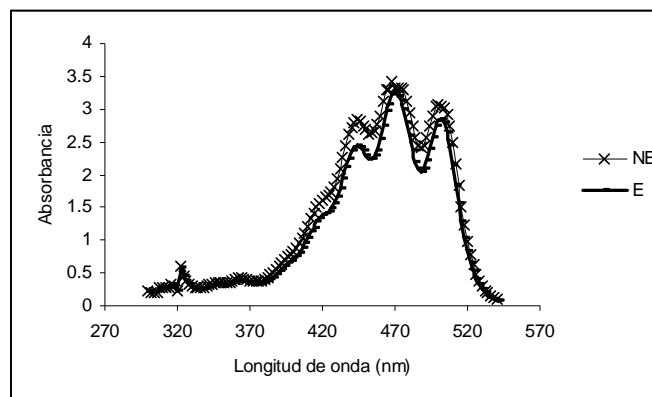


Figura 24. Espectros de absorción uv/visible de licopeno de jitomate no escaldado y escaldado en etapa de madurez rojo. Claves: NE = no escaldado, E = escaldado.

7.2.3 Identificación del licopeno en los cromatogramas (HPLC).

Con respecto a los cromatogramas, los picos fueron identificados por los tiempos de retención del estándar y muestras en estudio en el HPLC y con apoyo de los espectros de absorción (Figuras 25-26 y Cuadro 17). Tanto en las muestras de jitomate escaldado y no escaldado se encontraron cuatro compuestos, siendo el carotenoide predominante el *all-trans* licopeno. Con base a los datos publicados por Khachik y col, 1992; Tonucci y col, 1995 y Anguelova y Warthesen, 2000a, se identificaron en las muestras de jitomate escaldado isómeros *cis*-licopeno y xantofilas. El pico uno puede ser luteína, ésta eluyó antes que *all-trans*-licopeno (pico dos); el pico tres posiblemente corresponde al isómero *cis*: 5,5' di-*cis*-licopeno y el pico cuatro a *all-trans*- β -caroteno y *cis*- β -caroteno.

Anguelova y Warthesen (2000a) reportaron que decrementos de *all-trans*-licopeno van acompañados con incrementos en los contenidos del isómero 5,5'-di-*cis*-licopeno y 5,6,-dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno (licopeno 5,6 diol) como parte del

licopeno total presente en las muestras después del almacenamiento. Por lo que se considera que la degradación del *all-trans*-licopeno continúa a través de la isomerización y autooxidación. Lo anterior se confirma con el cromatograma que corresponde a la muestra de licopeno de jitomate no escaldado (Figura 26), en el cual el pico dos corresponde a *all-trans*-licopeno, el pico tres al isómero 5,5'-*di-cis*-licopeno, el pico cuatro a *all-trans* β -caroteno y *cis*- β -caroteno y posiblemente el pico uno el hidroxicarotenoide 5,6,-dihidroxi-5,6-dihidrolipeno o licopeno 5,6 diol. Khachik y col (1992), encontraron que los principales carotenoides de jitomate crudo, jitomate sometido a cocción (estofado) y pasta de jitomate se podían dividir en tres clases de carotenoides. Considerando el orden de la elución cromatográfica en una columna de fase reversa C_{18} serían: a) Hidroxicarotenoides, b) epoxicarotenoides y c) hidrocarbano carotenoides. Estos mismos investigadores encontraron que los perfiles cromatográficos de extractos de jitomate cocido y pasta de jitomate eran idénticos a aquéllos de jitomates crudos, las principales diferencias entre las muestras fue la concentración de varios componentes.

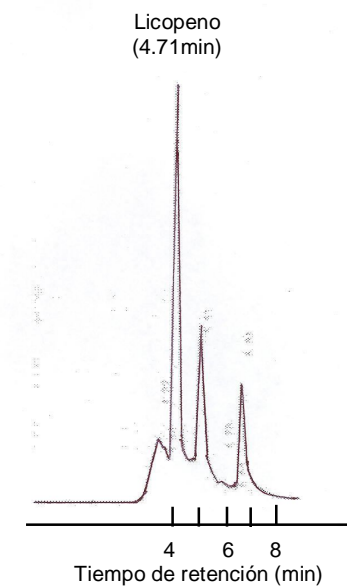


Figura 25. Cromatograma del licopeno natural en jitomate escaldado, sus isómeros *cis*, xantófilas y β -caroteno después de la extracción con hexano:acetona:etanol utilizando una columna de fase reversa C_{18} de 250X4.6 mm.

Cuadro 17. Identificación probable de los picos en cromatografía líquida de alta resolución del extracto de jitomate escaldado considerando sus tiempos de retención y λ máxima absorción.

Pico	Tiempo retención (min)	Carotenoide	λ máxima experimental nm	λ máxima literatura nm
Estándar	4.43	All- <i>trans</i> licopeno	442, 470, 502	
J. escaldado				
1		Xantofila	-----	424, 446, 473 ¹
2	4.71	All- <i>trans</i> licopeno	444, 470, 502	446, 473, 504 ¹
3		5,5' di- <i>cis</i> licopeno	-----	360, 446, 473, 504 ¹
4		All- <i>trans</i> β -caroteno y <i>cis</i> - β -caroteno	-----	(430), 454, 480 ¹

(1)Tonucci y col (1995) y Anguelova y Warthesen (2000a)

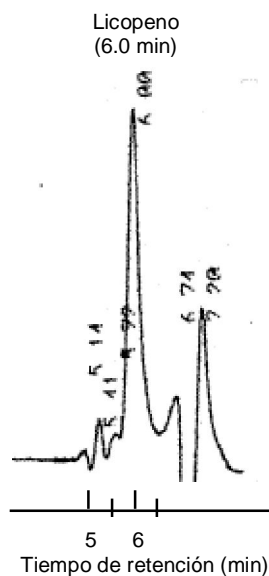


Figura 26. Cromatograma del licopeno natural en jitomate no escaldado con antioxidante almacenado en oscuridad a 4°C durante 30 días.

Los hidroxicarotenoides que encontraron fueron luteína y 5,6,-dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno (licopeno 5,6 diol), mientras que la luteína es el hidrocarotenoide más común en frutas y hortaliza, el licopeno 5,6 diol sólo ha sido encontrado en plasma humano por estos mismos investigadores (Ver 2.3.5).

Los epoxicarotenoides aislados de los extractos de jitomate fueron caracterizados como licopeno 1,2-epóxido (estable), licopeno 5,6-epóxido (poco estable) y un carotenoide que fue tentativamente identificado como 3,4-didehidro-5,6.5',6'-tetrahidro- ψ,ψ -caroteno. También encontraron muy bajos niveles de xantofilas como neoxantina, violaxantina, luteína epóxida y luteína.

Khachik y col. (1998), reportaron que el metabolito de licopeno encontrado en plasma humano identificado como 5,6,-dihidroxi-5,6-dihidroliscopeno y su isómero son en realidad dos metabolitos de licopeno isoméricos identificados como 2,6-cicloliscopeno-1,5-diol A (mayor) y B (menor) provenientes del licopeno 5,6 epóxido (Khachik y col, 2002). Estos mismos investigadores indicaron que ambos dioles han sido identificados a bajas concentraciones en jugo y pasta de jitomate (Ver 2.3.5).

7.2.4 Efecto del escaldado en la concentración de licopeno de jitomates enteros en etapa rojo.

El escaldado es un tratamiento térmico necesario para inactivar las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasa en jitomates. Estas enzimas afectan la calidad de los productos procesados ya que disminuyen la viscosidad, además hay otras enzimas que pueden descomponer los pigmentos presentes (Schwartz, 1994; Barringer, 2004). El escaldado puede ser aplicado por diferentes métodos, y en este caso los jitomates enteros fueron sumergidos en agua a 93.5°C por cincuenta segundos. Como se indicó anteriormente el color rojo del licopeno se utiliza como un factor de calidad de los productos del jitomate y también cuando se utiliza como un colorante alimentario.

La media de la concentración de licopeno en muestras no escaldadas fue mayor ($79.20 \pm 1.94 \mu\text{g/g}$) que la media del pigmento en muestras escaldadas ($75.25 \pm 2.09 \mu\text{g/g}$), no se presentó diferencia significativa ($p \geq 0.05$). Se retuvo el 95.01% del licopeno después de escaldar los jitomates. Es posible que el método de escaldado aplicado al fruto entero con piel disminuyó la velocidad de degradación

durante el calentamiento. Una reducción de licopeno durante el escaldado también fue reportado por otros investigadores, como es el caso de Akanbi y Oludemi (2004), que registraron concentraciones de licopeno de 59.50 $\mu\text{g/g}$ y 47.60 $\mu\text{g/g}$ en jitomates cv. Roma VF y lb local sin tratamiento térmico, pero después del escaldado con vapor de los frutos enteros, las concentraciones de licopeno fueron de 58.40 $\mu\text{g/g}$ y 46.30 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Otros investigadores que aplicaron reducción de tamaño del fruto (rompimiento mecánico) y métodos térmicos más severos observaron mayor degradación del pigmento; Thompson y col. (2000) reportaron variaciones más altas en la concentración de licopeno en cultivares FL7765 y FL7655 (67.10 $\mu\text{g/g}$ y 57.12 $\mu\text{g/g}$), pero después de 4 min de tiempo de cocción, la concentración del pigmento fue de 61.11 $\mu\text{g/g}$ y 57.17 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Mayeaux y col. (2006) demostraron que la intensidad de degradación del licopeno varía de acuerdo a la temperatura de calentamiento y tiempo, solamente el 36.6 % y 35.5 % del licopeno fue retenido después de freírlo a 145 °C y 165 °C por un minuto respectivamente. Sin embargo, el procesamiento térmico medio puede incrementar la concentración del pigmento en productos del jitomate al incrementar la forma libre y bio-disponibilidad del licopeno.

Otros investigadores como Lin y Chen (2005) reportaron concentraciones de licopeno más elevadas en jitomates sometidos a un rompimiento en caliente (“hot-break”, 82 °C y 2 min, 57.7 $\mu\text{g/g}$) que en jitomates que no sufrieron ningún tratamiento térmico (51.2 $\mu\text{g/g}$). Por otra parte, Anese y col. (2002) reportaron que prolongado calentamiento o elevadas temperaturas de almacenamiento promueven el oscurecimiento no enzimático, incluyendo reacciones de Maillard y oxidación del ácido ascórbico; estos cambios pueden enmascarar el color del licopeno. Nguyen y Schwartz (1999) reportaron que el oscurecimiento no enzimático y la pérdida de color del carotenoide son las principales causas de los cambios de color en los productos del jitomate. Este cambio de color en el licopeno es debido a la isomerización del pigmento de la forma *all-trans* a la forma *cis* (Anguelova y Warthesen, 2000a; Hackett y col., 2004).

7.3 Cinéticas de degradación del licopeno en hexano (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) almacenado en diferentes condiciones de iluminación y temperatura.

7.3.1 Experimentos 1a y 1b (Cuadro 9) Cinéticas de degradación del licopeno en hexano (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) almacenadas en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.

Se realizaron dos experimentos, el primero para el licopeno extraído de jitomates escaldados (1a) y el segundo para el licopeno extraído de jitomates no escaldados (1b). Los factores principales para cada uno de los dos diseños fueron iluminación y tiempo. Ambos factores y la interacción iluminación*tiempo fueron significativos en la retención de licopeno ($p \leq 0.001$).

Cuando se compararon ambos diseños, se encontró que la mayor retención de licopeno fue en condiciones de oscuridad, con una retención del pigmento de 81.0 % para soluciones proveniente de jitomates escaldados y 66.78 % para soluciones de jitomates no escaldados. En condiciones de luz, la media fue de 65.39 % para soluciones de licopeno proveniente de jitomates escaldados y de 59.43 % para aquellas provenientes de jitomates no escaldados.

Con respecto a la interacción iluminación*tiempo en ambos experimentos se encontró que el día 3 presentó la más grande retención del caratenoide en condiciones de oscuridad (la media fue 90.33 % para soluciones de licopeno de jitomates escaldados y 77.85 % para soluciones de licopeno de jitomates no escaldados) y la media significativamente menor a las demás fue a los 30 días en condiciones de luz (la media fue de 31.6 % para soluciones de licopeno de jitomates escaldados y de 19.42 % para soluciones de licopeno de jitomates no escaldados). Es de señalar que el tratamiento térmico (escaldado) permitió una mayor retención del pigmento en soluciones que en aquéllas con licopeno de jitomates no escaldados durante el periodo de almacenamiento. También se encontró que en condiciones de luz el pigmento se degradó más rápidamente. Es posible que el escaldado le

proporcione mayor estabilidad al pigmento durante el almacenamiento debido a que el tratamiento térmico inactiva enzimas oxidativas responsables del deterioro del color y por lo tanto permite la retención del pigmento. Estas enzimas y el oxígeno aceleran la oxidación del pigmento en el caso de las muestras no escaldadas (Macrae y col., 1993; Schwartz, 1994; Britton, 1996; Ishida y col., 2007). Por lo anteriormente expuesto, es conveniente escaldar los jitomates cuando se extrae el licopeno y almacenarlo en condiciones de oscuridad.

Por otra parte, Lee y Chen (2002) y Goula y col. (2006) reportaron que las cinéticas de la reacción de degradación del licopeno siguieron un modelo cinético de primer orden:

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t) \quad \text{equivalente a} \quad \ln C = \ln C_0 - k \cdot t \quad (1)$$

Donde C_0 es la concentración del licopeno inicial, C es la concentración de licopeno al tiempo t ; k es la constante de velocidad de reacción. Con base a estos criterios, se realizó estadísticamente el ajuste del modelo exponencial del % de licopeno retenido a través del tiempo para los experimentos de las soluciones del pigmento de jitomates escaldados y de jitomates no escaldados en condiciones de oscuridad y luz a 20°C y considerando que la concentración de licopeno inicial fue del 100 %. Los modelos estimados se indican en el cuadro 18.

En el modelo ajustado para soluciones de licopeno de jitomates escaldados (1a), su constante de velocidad de reacción fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en condiciones de oscuridad (A; 0.018 d^{-1}) que en luz (B; 0.040 d^{-1}), es decir la degradación del pigmento fue menor durante los 30 días de almacenamiento ($R^2 = 0.933$ y 0.933). Este mismo comportamiento se presentó en el modelo ajustado para el licopeno en soluciones de jitomates no escaldados (1b), las constantes de velocidad fueron de 0.037 d^{-1} en oscuridad (A') y 0.055 d^{-1} en luz (B'); $R^2 = 0.873$ y

0.985, respectivamente; Figura 27). De acuerdo a la constante de velocidad de reacción menor y que la concentración de licopeno inicial es 100%, las condiciones adecuadas para almacenar el carotenoide fueron en soluciones de licopeno de jitomates escaldados en oscuridad (A). Lo anterior se confirmó al utilizar 38 días para retener la mitad del licopeno inicial (Cuadro 18). Spagna y col. (2005) reportaron que la polifenoloxidasas es responsable de los cambios de color, así como oscurecimiento y degradación del licopeno, por lo que es altamente recomendable inactivar la polifenoloxidasas para mantener la estabilidad del carotenoide (Ver 2.4).

Cuadro 18. Modelos ajustados para la retención de licopeno en hexano (de jitomates escaldados y no escaldados) en condiciones de oscuridad y luz a 20 °C.

Caso	Escaldado	Iluminación	Modelo ajustado	R ²	Tiempo de retención del 50 % del licopeno inicial (días)
A	Si	oscuridad	% L = 100 exp(- 0.018t)	0.933	38
B	Si	luz	% L = 100 exp(- 0.040t)	0.933	17
A'	No	oscuridad	% L = 100 exp(- 0.037t)	0.873	15
B'	No	luz	% L = 100 exp(- 0.055t)	0.985	12

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A' con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

En todos los casos $p \leq 0.05$

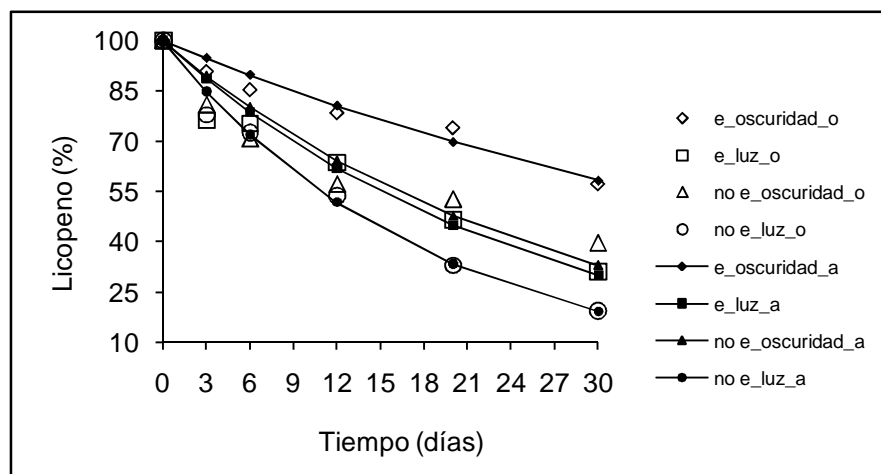


Figura 27. Cinéticas de degradación de soluciones de licopeno extraído de jitomates escaldados y no escaldados, almacenadas en oscuridad y luz a 20°C, (o) modelo observado y (a) modelo ajustado. Claves: -◇- escaldado_oscuridad_o; -□- escaldado_luz_o; -△- no escaldado_oscuridad_o; -○- no escaldado_luz_o; -◆- escaldado_oscuridad_a; -■- escaldado_luz_a; -▲- no escaldado_oscuridad_a; -●- no escaldado_luz_a.

7.3.2 Experimentos Ila y Ilb (Cuadro 9): Cinéticas de degradación del licopeno en hexano con y sin adición de antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.

Los siguientes experimentos se realizaron con licopeno procedente de tomates escaldados.

Factores físicos y químicos como elevadas temperaturas, exposición a la luz, oxígeno, valores extremos de pH y ácidos degradan los carotenoides presentes en los productos procesados del jitomate. En particular, el licopeno es altamente reactivo al oxígeno y luz a causa de los dobles enlaces en su estructura (Nguyen y Schwartz, 2000; Calvo y col., 2007). El licopeno puede convertirse por sí mismo en radicales peróxido capaces de actuar como prooxidantes y sufrir autooxidación por la presencia de oxígeno en el aire. Shi y col. (2004) propusieron que la vía de

degradación oxidativa del pigmento puede tener lugar por dos mecanismos dependiendo de cómo el oxígeno es incorporado al licopeno: 1) Oxidación de un metilo o grupo metileno y, 2) Adición a un doble enlace carbono-carbono, la degradación oxidativa puede presentarse en uno u otro extremo de la estructura del carotenoide (Ver 2.3.5). Los productos finales de la degradación del licopeno son el resultado de la escisión oxidativa directa en los dobles enlaces presentes en la molécula (Shi y Le Maguer, 2000; Shi y col., 2003).

Se realizaron dos experimentos, el primero para soluciones de licopeno con adición de antioxidantes (IIa) y el segundo para soluciones del pigmento sin antioxidantes (IIb). Los factores principales del diseño dos factorial fueron iluminación y tiempo. En ambos experimentos, la iluminación, el tiempo y la interacción iluminación*tiempo fueron significativos en la retención de licopeno ($p \leq 0.001$).

Cuando se compararon ambos experimentos, se observó que la mayor retención de licopeno fue en condiciones de oscuridad en las soluciones con adición de antioxidantes siendo de 81.07 % y de 65.28 % para las soluciones sin antioxidantes. En condiciones de luz, la media fue de 66.92 % para soluciones del carotenoide con antioxidantes y 55.05 % para soluciones sin antioxidantes.

Con respecto a la interacción iluminación*tiempo en ambos experimentos, se encontró que la retención de licopeno en los días 3 y 6 en condiciones de oscuridad presentaron las medias más elevadas y no presentaron diferencia significativa entre ellas ($p \leq 0.05$). Las medias del pigmento con antioxidantes en aquellos días fueron 90.8 % y 85.4 %, respectivamente y las medias para el licopeno sin antioxidantes fueron 70.41 % y 66.21 %, respectivamente. La media significativamente más baja fue en condiciones de luz a 30 días para soluciones de licopeno con antioxidantes así como para soluciones de pigmento sin antioxidantes (31.10 % y 26.91 %, respectivamente). De acuerdo a estos resultados, los antioxidantes permitieron la mayor retención del licopeno en solución en ambas condiciones de oscuridad y luz.

También se encontró que la luz degrada más rápidamente el pigmento. Estos resultados demuestran la sensibilidad del carotenoide a la luz, así como ha sido demostrado por otros investigadores (López-Hernández y col., 2001; Lee y Chen, 2002; Shi y col., 2003). Britton (1996) reportó que este efecto es principalmente a la combinación de la luz y la presencia del oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Lee y Chen (2002) también como Cvetkovic y Markoviv (2008) reportaron un decremento de all-*trans* licopeno cuando el tiempo de exposición a la luz se incrementó. Estos investigadores también señalaron que la isomerización y degradación del licopeno y sus isómeros *cis* durante su exposición a la luz, puede proceder simultáneamente. Sin embargo, a temperaturas medias de procesamiento tal como 50 °C, la isomerización es seguida por la degradación, mientras que a 100 °C la degradación procede más rápidamente que la isomerización; la presencia de luz también induce la isomerización como principal reacción. La autooxidación del licopeno es irreversible y conduce a la fragmentación de la molécula produciendo acetona, metilheptanona, aldehído levulínico, y probablemente glioxal, los cuales causan aparente pérdida de color (Cole y Kapur, 1957a, b; Xianquan y col., 2005; Ver 2.3.5). Mientras que Anguelova y Warthesen (2000a) han reportado que el principal producto de la fotooxidación es el licopeno-5,6-diol (5,6-dihidroxi-5,6-dihidrolipopeno). Hackett y col. (2004) encontraron que la estabilidad del pigmento disminuyó con el tiempo cuando se almacenó bajo luz fluorescente a 25 y 50 °C.

Considerando que las cinéticas de la reacción de degradación del licopeno siguen un modelo cinético de primer orden (ecuación 1), se ajustó a el modelo exponencial del % de licopeno retenido (% L) a través del tiempo para los experimentos del pigmento en solución con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz (IIa y IIb respectivamente). Los modelos estimados se indican en el cuadro 19.

Cuadro 19. Modelos ajustados para la retención de licopeno en soluciones con y sin adición de antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.

Caso	Antioxidantes	Iluminación	Modelo ajustado	R ²	Tiempo de retención del 50 % del licopeno inicial (días)
A	Si	oscuridad	% L = 100 exp(- 0.018t)	0.922	38
B	Si	luz	% L = 100 exp(- 0.038t)	0.898	18
A'	No	oscuridad	% L = 100 exp(- 0.037t)	0.579	19
B'	No	luz	% L = 100 exp(- 0.062t)	0.763	11

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A' con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

En todos los casos $p \leq 0.05$

En el modelo ajustado para el licopeno en soluciones con antioxidantes (IIa), su constante de velocidad de reacción fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en condiciones de oscuridad (A; 0.018 d^{-1}) que en luz (B; 0.038 d^{-1}), es decir la degradación del pigmento fue menor ($R^2 = 0.922$ y 0.898 , respectivamente). Este mismo comportamiento se presentó en el modelo ajustado para el licopeno en soluciones sin antioxidantes (IIb), las constantes de velocidad fueron de 0.037 d^{-1} en oscuridad (A', $R^2 = 0.579$) y 0.062 d^{-1} en luz (B'; $R^2 = 0.763$; Figura 28). De acuerdo a la constante de velocidad de reacción menor y considerando que la concentración de licopeno inicial es del 100 %, las condiciones adecuadas para almacenar el carotenoide fue el licopeno en soluciones con antioxidantes en oscuridad a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (A). Estos resultados son similares a aquéllos reportados por Ferreira y Rodríguez-Amaya (2008), quienes estudiaron sistemas acuosos modelo de licopeno bajo condiciones de oscuridad y luz a temperatura ambiente. Estos investigadores reportaron que la degradación del carotenoide bajo condiciones de oscuridad y luz siguió cinéticas de primer orden, aunque la presencia de luz aceleró la degradación del pigmento.

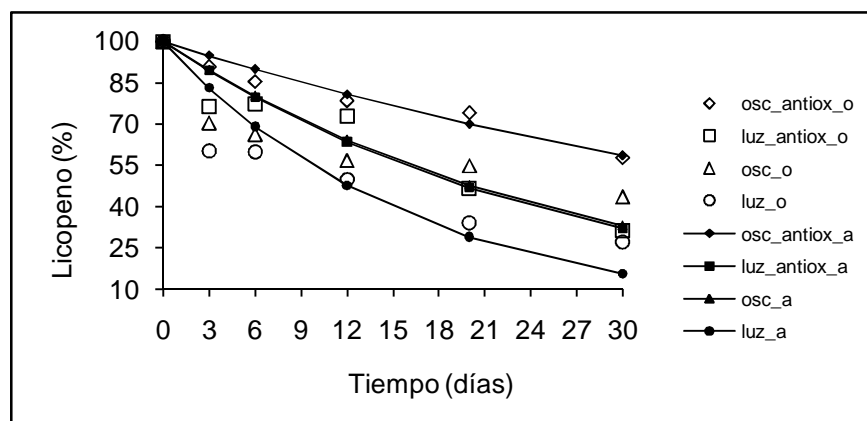


Figura 28. Cinéticas de degradación del licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C (o) modelos observados y (a) modelos ajustados. Clave: -◇- oscuridad con antioxidantes_o; -□- luz con antioxidantes_o; -△- oscuridad_o; -○- luz_o; -◆- oscuridad con antioxidantes_a; -■- luz con antioxidantes_a; -▲- oscuridad_a; -●- luz_a.

7.3.3 Experimentos IIIa y IIIb (Cuadro 9): Cinéticas de degradación del licopeno en hexano con y sin adición de antioxidantes en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.

Se realizaron dos experimentos, el primero para soluciones de licopeno con antioxidantes (IIIa) y el segundo para soluciones de licopeno sin antioxidantes (IIIb). Los factores principales para cada uno de los diseños dos factorial fueron temperatura y tiempo. En ambos experimentos, los factores principales y la interacción temperatura*tiempo fueron significativos con respecto a la retención de licopeno ($p \leq 0.001$). Para ambos experimentos, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró con respecto a la temperatura, que las tres medias fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) y que al incrementar la temperatura, la media de retención de licopeno disminuyó significativamente. Para el experimento con antioxidantes las medias de retención del pigmento fueron 85.58, 81.07 y 68.68 % para 4, 20 y 60°C, respectivamente. Respecto al tiempo ocurre igual comportamiento; todas las medias fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) y al

incrementar el tiempo las medias de retención de licopeno disminuyeron. En el caso del experimento sin antioxidantes, las medias de retención del pigmento fueron 69.26, 65.28 y 60.84 % para 4, 20 y 60 °C, respectivamente.

Con respecto a las interacciones (temperatura*tiempo) para el modelo con antioxidantes, la media más elevada de licopeno retenido fue de 98.57 % en el día 3 a 4 °C y presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás. La menor media que presentó diferencia significativa del resto fue 36.18 % y que correspondió al día 30 con 60 °C. Para el modelo sin antioxidantes la media más elevada de licopeno retenido fue de 74.43 % en el día 3 a 4 °C, la media significativamente ($p \leq 0.05$) menor fue de 35.82 % en el día 30 con 60 °C. Estas diferencias significativas son debido a la degradación del licopeno, el cual involucra dos etapas: isomerización de *all-trans* a los isómeros *cis* y autooxidación de los dobles enlaces insaturados (Lee y Chen, 2001). Estos investigadores también reportaron que la degradación de los mono-isómeros *cis* fue mayor cuando el tiempo de calentamiento se incremento a 50°C. Los principales isómeros *cis* encontrados en jitomates sometidos a varios métodos de tratamiento térmico son 5-*cis* licopeno, 13-*cis* licopeno, 9-*cis* licopeno, 15-*cis* licopeno y di-*cis* licopeno (Lee y Chen, 2001; Hackett y col., 2004; Ishida y Chapman, 2004; Moraru y Lee, 2005).

Para cada una de las 3 temperaturas con y sin antioxidantes se ajustaron los modelos de la forma : $\% L = C_0 (\exp(-k t))^E$, corroborándose en cada uno de ellos que los errores tuvieron distribución normal. Los modelos estimados se indican en el cuadro 20.

En el modelo ajustado para el licopeno en soluciones con antioxidantes (IIIa), la constante de velocidad de reacción fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a temperatura de 4°C (A; 0.014 d^{-1} ; $R^2 = 0.946$) que a 60°C (C; 0.033 d^{-1} ; $R^2 = 0.854$), es decir la degradación del pigmento fue menor. Este mismo comportamiento fue presentado en los modelos ajustados para licopeno en soluciones sin antioxidantes (IIIb), las constantes de velocidad fueron 0.030 d^{-1} a 4 °C (A') y 0.045 d^{-1} a 60 °C (C')

($R^2 = 0.562$ y 0.571 , respectivamente), considerando que la concentración de licopeno inicial fue del 100 % (Figura 29).

Cuadro 20. Modelos ajustados para la retención de licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad a 4 °C, 20 °C y 60 °C.

Caso	Antioxidantes	Temperatura °C	Modelo ajustado	R^2	Tiempo de retención del 50 % del licopeno inicial (días)
A	Si	4	% L = 100 exp(- 0.014t)	0.946	48
B	Si	20	% L = 100 exp(- 0.018t)	0.922	38
C	Si	60	% L = 100 exp(- 0.033t)	0.854	21
A'	No	4	% L = 100 exp(- 0.030t)	0.562	23
B'	No	20	% L = 100 exp(- 0.037t)	0.576	19
C'	No	60	% L = 100 exp(- 0.045t)	0.571	15

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A con C presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B con C presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A' con B' no presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A' con C' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B' con C' no presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

C con C' no presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

En todos los casos $p \leq 0.05$

En el caso de 4 °C y 20 °C para soluciones con antioxidantes, la constante de velocidad fue significativamente más baja ($p \leq 0.05$) para 4 °C (A) que a 20 °C (B) (0.014 d^{-1} y 0.018 d^{-1} , respectivamente) significando que la degradación del pigmento fue menor ($R^2 = 0.946$ y 0.922 , respectivamente). En los modelos ajustados para licopeno en soluciones sin antioxidantes a 4 °C (A') y 20 °C (B') no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$). En el caso de soluciones con antioxidante a 4 °C (A) y sin antioxidante (A') la constante de velocidad fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) para las soluciones con antioxidantes que para soluciones sin antioxidantes (0.014 d^{-1} y 0.030 d^{-1} , respectivamente), significando que la degradación del pigmento fue menor ($R^2 = 0.946$ y 0.562 , respectivamente). Este mismo

comportamiento se presentó en los modelos ajustados para licopeno en soluciones con antioxidantes (B) y sin antioxidantes (B') a 20 °C, las constantes de velocidad fueron 0.018 d⁻¹ para el primer modelo y 0.037 d⁻¹ para el segundo modelo ($R^2 = 0.922$ y 0.576 , respectivamente), considerando una concentración inicial del 100 %. Las soluciones con antioxidantes (C) y soluciones sin antioxidantes (C') a 60 °C no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Con base a estos resultados, la constante de velocidad de reacción más baja y concentración de licopeno inicial del 100 %, las condiciones adecuadas para almacenar el pigmento son en soluciones del carotenoide con antioxidantes en oscuridad a 4 °C (A). Lo anterior fue confirmado por necesitar 48 días para retener la mitad del licopeno inicial (vida media, Cuadro 20). Estos resultados son similares a aquéllos reportados por Nguyen y Schwartz (1998), donde el licopeno en solución almacenado a 4°C disminuyó la formación de isómeros, también la adición de BHT como antioxidante disminuyó la velocidad de isomerización del licopeno.

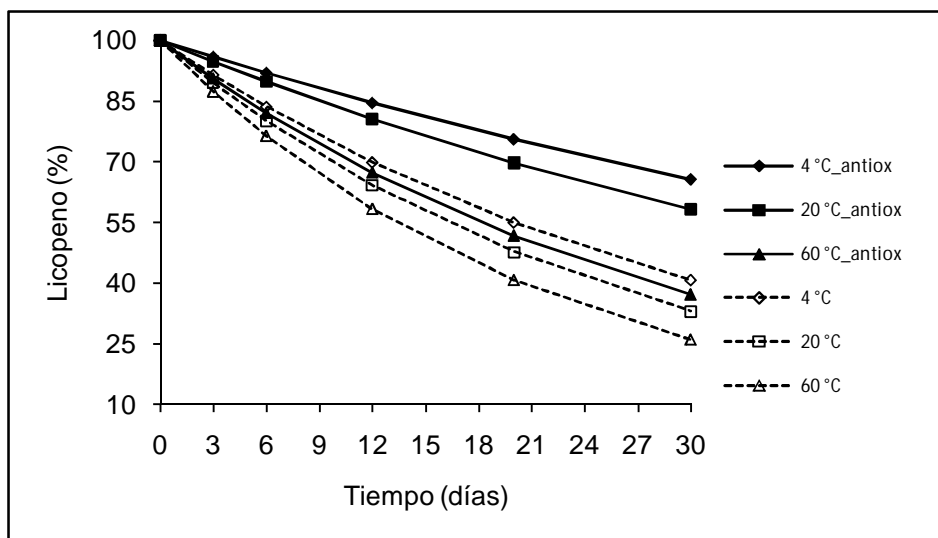


Figura 29. Cinéticas de degradación del licopeno en soluciones con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C (modelos ajustados). Clave: -◆- 4 °C con antioxidantes; -■- 20 °C con antioxidantes; -▲- 60 °C con antioxidantes; -◇- 4 °C; -□- 20 °C; -△- 60 °C.

La adición de antioxidantes y almacenamiento bajo condiciones de oscuridad son factores determinantes para la retención del pigmento.

Por otra parte, la mayor pérdida de licopeno fue en soluciones de licopeno sin antioxidantes en oscuridad a 60 °C. En general, al aumentar la temperatura y tiempo de almacenamiento, la retención de licopeno disminuyó (Figura 29). Esta reducción es posible debido a la oxidación más que a la isomerización donde Lee y Chen (2002) reportaron que la velocidad de oxidación del licopeno fue más elevada que la velocidad de isomerización, cuando la temperatura de almacenamiento se incrementó.

7.4 Estabilidad y actividad antioxidante del licopeno (extraído de jitomates escaldados) en aceite de canola.

Los carotenoides actúan como antioxidantes contra la peroxidación lipídica al neutralizar el oxígeno singulete (1O_2) y atrapar los radicales peróxido libres. La habilidad que presentan los carotenoides para neutralizar el oxígeno singulete depende de su estructura como es el número de dobles enlaces conjugados, grupos terminales (cíclicos o acíclicos) y grupos funcionales sustituibles en los anillos (Anguelova y Warthesen, 2000b; Ver 2.3.5). Di Mascio y col., (1989), reportaron que la capacidad de neutralizar el oxígeno singulete por los carotenos fue en el siguiente orden: licopeno > α - caroteno > β -caroteno.

Para estudiar la estabilidad del licopeno en aceite y su habilidad para inhibir la peroxidación lipídica se utilizó aceite de canola. Goulson y Warthesen (1999), determinaron por cromatografía de gases los ácidos grasos insaturados en el aceite de canola comercial, siendo de 58.8 % de ácido oleico, 21.3 % de ácido linoleico y 9.5 % de ácido linolénico. Estos mismos investigadores reportaron que los ácidos grasos insaturados son más accesibles para reaccionar con radicales libres y por tanto el carotenoide puede desarrollar su actividad antioxidante. Los radicales libres pueden ser de fuentes exógenas, tal como contaminantes en el aire, radiación,

químicos, toxinas ambientales y alimentos profundamente freídos así como estrés físico. Algunos radicales libres son radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), aniones superóxido ($\text{O}_2\bullet$) y óxido nítrico (NO), también como otros oxidantes activos, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Ver 2.6.3). Los antioxidantes eliminan radicales del sistema ya sea por reaccionar con ellos para producir productos inocuos y estables o por rompimiento de las reacciones en cadena de los radicales libres (Shi y col., 2004; Ver 2.6.5).

7.4.1 Inhibición de la peroxidación lipídica (efecto antioxidante del caroteno).

La formación de hidroperóxidos por la oxidación de los ácidos grasos insaturados se determinó por el valor de peróxido en las muestras de aceite con licopeno con y sin adición de antioxidantes (BHA:BHT).

7.4.1.1 Inhibición de la formación de hidroperóxidos (valor de peróxido) en muestras de aceite de canola con licopeno con y sin adición de antioxidantes almacenadas en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.

Se realizaron dos experimentos, el primero para muestras de aceite con licopeno con adición de antioxidantes (IVa) y el segundo para muestras de aceite con el pigmento sin antioxidantes (IVb) a temperatura de 20°C (Cuadro 11). Los factores principales del diseño dos factorial fueron iluminación y tiempo. En ambos experimentos, la iluminación, el tiempo y la interacción iluminación*tiempo fueron significativos en el valor de peróxido ($p \leq 0.001$).

Cuando se compararon ambos experimentos, se observó que el menor valor de peróxido fue en condiciones de oscuridad siendo de 5.0 mEq/kg para las muestras de aceite con licopeno con antioxidantes y 5.41 mEq/kg para las muestras de aceite con pigmento sin antioxidantes. En condiciones de luz, la media estimada fue de 12.0 mEq/kg para muestras con antioxidantes y 12.93 mEq/kg para muestras sin antioxidantes. Debido a las condiciones de luz, el pigmento sufrió degradación aún

con antioxidantes (BHA:BHT) y de ahí el mayor valor de peróxido (mayor formación de hidroperóxidos, Figura 30).

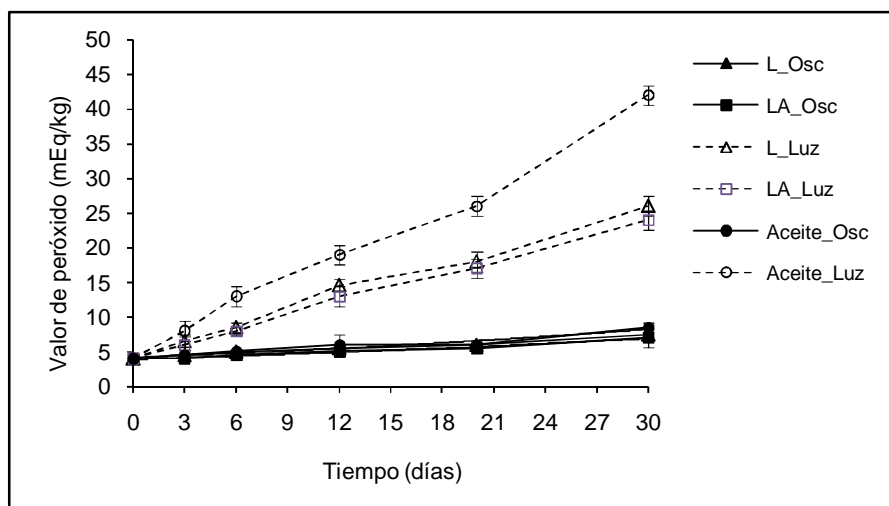


Figura 30. Formación de hidroperóxidos en muestras de aceite de canola con licopeno con antioxidantes, en muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes y en aceite de canola (control), en condiciones de oscuridad y luz (4 186 lux) a 20°C. Clave: -▲- licopeno_oscuridad; -■- licopeno con antioxidantes_oscuridad; -△- licopeno_luz; -□- licopeno con antioxidantes_luz; -●- aceite_oscuridad; -○- aceite_luz.

En la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, las muestras de aceite con pigmento y antioxidantes no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las medias estimadas del valor de peróxido (mEq/kg) en los primeros seis días; los valores estuvieron en un rango de 4 a 6.25 mEq/kg. A los 12 y 20 días las muestras no presentaron diferencia significativa entre sí, el rango de valor de peróxido fue de 9.0 a 11.25 mEq/kg. En la medida en que se aumentaron los días de almacenamiento, el valor de peróxido aumentó, probándose la diferencia de las medias, a los 30 días se obtuvo un valor de peróxido estimado de 15.5 mEq/kg. El comportamiento anterior, lo presentaron también las muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes; para los primeros seis días, el intervalo de valor de

peróxido fue de 5.5 a 6.75 mEq/kg. Para los días 12 y 20 no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$) y el intervalo de valor de peróxido fue de 10.05 a 12.0 mEq/kg. A los 30 días se obtuvo un valor de peróxido estimado de 16.75 mEq/kg.

Con respecto a las interacciones iluminación*tiempo, las medias estimadas del valor de peróxido (mEq/kg) en las muestras de aceite con licopeno y antioxidantes en los días de muestreo (0, 3, 6, 12, 20 y 30 días) en condiciones de oscuridad y el día 3 en condiciones de luz no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$), sus valores estuvieron en un intervalo de 4.0 a 7.0 mEq/kg. Este comportamiento lo presentaron las muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes estando sus valores en un intervalo de 4.0 a 7.5 mEq/kg.

En las muestras de aceite con licopeno con antioxidantes en condiciones de luz, las medias estimadas del valor de peróxido en los días 6, 12, 20 y 30 presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), el intervalo de valores fue de 8.0 a 24 mEq/kg. Este comportamiento también lo presentaron las muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes, siendo el intervalo de valores de 8.5 a 26 mEq/kg.

Al comparar ambos experimentos (muestras de aceite con licopeno y antioxidantes y muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes) las medias estimadas de los valores de peróxido más bajas fueron durante los treinta días en condiciones de oscuridad y a los tres días en condiciones de luz y no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$). Sin embargo, cuando se adicionó antioxidantes, las medias estimadas del valor de peróxido fueron más bajas. Es decir, los antioxidantes protegen al licopeno permitiéndole conservar su efecto antioxidante. En condiciones de luz, las medias estimadas del valor de peróxido fueron más elevadas, es decir, aún con antioxidantes, la luz degradó al carotenoide afectando su propiedad antioxidante. Lo anterior se confirma al observar la figura 30 donde el control (aceite sin licopeno y sin antioxidantes) durante todos los días de almacenamiento en condiciones de luz (4 186 lux) presentó las medias estimadas del

valor de peróxido significativamente más elevadas ($p \leq 0.05$) a las demás, es decir la formación de hidroperóxidos (principal producto de la peroxidación lipídica) se incrementó en ausencia de licopeno como antioxidante.

7.4.1.2 *Inhibición de la formación de hidroperóxidos (valor de peróxido) en muestras de aceite de canola con licopeno con y sin adición de antioxidantes almacenadas en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.(Va y Vb).*

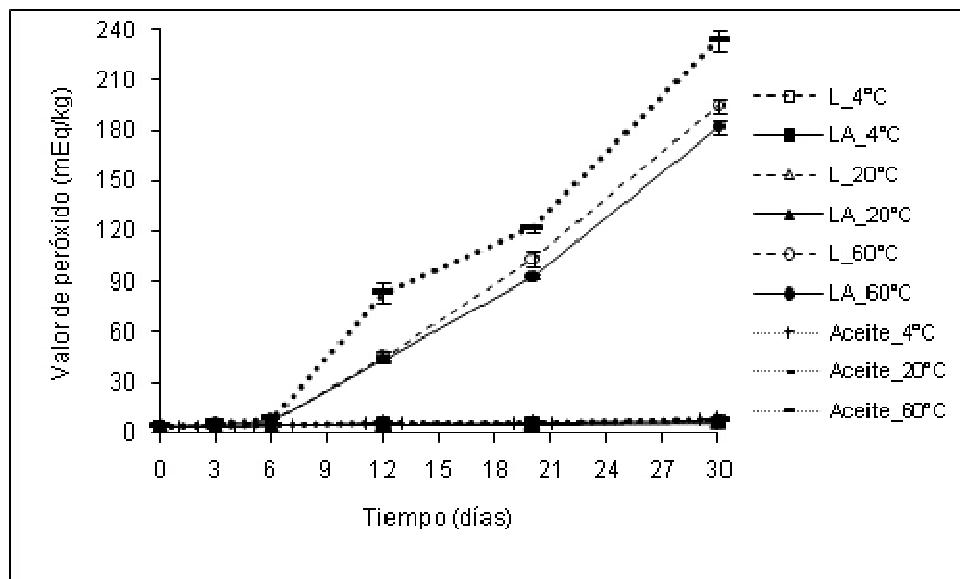


Figura 31. Formación de hidroperóxidos en muestras de aceite de canola con licopeno con antioxidantes, en muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes y en aceite de canola (control) en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C. Clave: -□- licopeno_4°C; -■- licopeno con antioxidantes_4°C; -△- licopeno_20°C; -▲- licopeno con antioxidantes_20°C; -○- licopeno_60°C; -●- licopeno con antioxidantes_60°C; ...+... aceite_4°C; ...-...aceite_20°C; ...-...aceite_60°C.

Se realizaron dos experimentos, el primero para muestras de aceite de canola con licopeno con adición de antioxidantes (Va) y el segundo para muestras de aceite de canola con licopeno sin antioxidantes (Vb) (Cuadro 11); las muestras se almacenaron en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C. Los factores principales del diseño dos factorial fueron temperatura y tiempo. En ambos experimentos, la temperatura, el tiempo y la interacción temperatura*tiempo fueron significativos en el valor de peróxido ($p \leq 0.001$).

Con respecto a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, ambos experimentos (Va y Vb) presentaron el mismo comportamiento con respecto a la temperatura. Para las muestras de aceite con el carotenoide y antioxidantes, la media del valor de peróxido a 60°C fue significativamente distinta a las medias estimadas a 4°C y 20°C, las cuales no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$), siendo las medias de valor de peróxido estimadas de 4.66 mEq/kg, 5.0 mEq/kg y 55.91 mEq/kg para 4°C, 20°C y 60°C respectivamente. En el caso de las muestras sin antioxidantes, las medias de valor de peróxido estimadas fueron de 5.08 mEq/kg, 5.41 mEq/kg y 60.41 mEq/kg para 4°C, 20°C y 60°C respectivamente. Para ambos experimentos se observó que al aumentar la temperatura la media del valor de peróxido aumentó significativamente, siendo los valores mayores para las muestras sin antioxidantes. Respecto al tiempo en los primeros seis días de almacenamiento no se presentó diferencia significativa con respecto al valor de peróxido, sin embargo a los 12, 20 y 30 días las medias estimadas presentaron diferencia significativa entre sí; este comportamiento lo presentaron tanto las muestras de aceite con licopeno y antioxidantes como las muestras con aceite con el pigmento sin antioxidantes. En la medida que aumentó el tiempo aumentó el valor de peróxido, siendo de 65.00 mEq/kg para las muestras con antioxidantes y de 69.83 mEq/kg para las muestras sin antioxidantes a los 30 días de almacenamiento.

En cuanto a la interacción temperatura*tiempo en ambos experimentos (con y sin adición de antioxidantes), Tukey mostró que durante los primeros seis días de almacenamiento no hubo diferencia significativa en las medias estimadas de valor de

peróxido siendo el intervalo de 4.0 a 7.5 mEq/kg para muestras con antioxidantes mientras que para las muestras sin antioxidantes el intervalo fue de 4.0 a 8.0 mEq/kg. Sin embargo, a los 12, 20 y 30 días las medias estimadas fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para ambos experimentos; los valores fueron 44, 93 y 182 mEq/kg respectivamente para las muestras con antioxidantes y 46, 104 y 195 mEq/kg respectivamente para las muestras sin antioxidantes. Con base a estos resultados, se observó que al aumentar la temperatura el valor de peróxido se incrementó, sobre todo a 60°C, el licopeno con antioxidantes disminuyó significativamente su efecto antioxidante. Este mismo comportamiento lo presentaron las muestras sin antioxidantes, siendo sus valores de peróxido más elevados que aquéllos presentados por las muestras con antioxidantes. La elevada temperatura degradó al carotenoide afectando su efecto antioxidante. Valores de peróxido abajo de 10 mEq/kg indican aceites frescos mientras que rangos de 20 a 40 mEq/kg, indican sabores rancios (Nawar, 1993).

Los valores de peróxido en las muestras de aceite con licopeno y sin antioxidantes fueron más elevados que los presentados en las muestras con licopeno y antioxidantes, lo que indica que los antioxidantes (BHT y BHA) protegieron al licopeno permitiendo que conservara su efecto antioxidante y también los antioxidantes disminuyeron la formación de hidroperóxidos. A temperatura de 60°C tanto el licopeno como los antioxidantes se degradaron por lo que perdió su capacidad antioxidante y no presentó efecto inhibitorio en la formación de hidroperóxidos (Figura 31). Lo anterior se confirma con los valores de peróxido obtenidos para las muestras de aceite (control: sin licopeno ni antioxidantes) que estuvieron en un intervalo de 4 – 234 mEq/kg a 60°C. Estos resultados indican que el carotenoide no tuvo capacidad antioxidante a elevada temperatura (60°C) y en la cual la formación de hidroperóxidos fue mayor. Anguelova y Warthesen (2000b) reportaron que la velocidad de formación de hidroperóxidos fue de 4 a 10 veces más rápida a 60 °C que a 37 °C en muestras de metil-linoleato con licopeno, por lo que la capacidad antioxidante del pigmento disminuyó. Sin embargo, otros investigadores como Haila y col. (1996) reportaron que el licopeno tiene efecto prooxidante en la

formación de hidroperóxidos en la autooxidación de triglicéridos, pero señalaron que este efecto depende de la concentración del caroteno, aceite utilizado, solventes, antioxidantes (BHT, α o γ -tocoferol) entre otras condiciones. Shi y col. (2004) reportaron que las reacciones de oxidación de los carotenoides con los radicales libres pueden presentarse en diferentes partes de la molécula involucrando desdoblamiento de la cadena poliénica por adición de radicales peróxido (ROO•), captura del electrón por la molécula y sustracción del hidrógeno desde posiciones alílicas. Sin embargo, la reacción de oxidación fue influenciada por la concentración del oxígeno. A bajas concentraciones de oxígeno, los carotenoides actúan como eficientes antioxidantes para prevenir la oxidación de los lípidos, mientras que a altas concentraciones de oxígeno, los carotenoides aparentemente promueven la oxidación lipídica, es decir actúan como prooxidantes (Shi y col., 2004; Ver 2.6.4).

7.4.2 Experimentos IVa y IVb (Cuadro 11): Cinéticas de degradación del licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola almacenados en condiciones de oscuridad y luz a 20°C.

En los experimentos IVa (aceite de canola con licopeno y antioxidantes) y IVb (aceite de canola con licopeno y sin antioxidantes), además de determinar el valor de peróxido también se determinó la retención de licopeno.

Henry y col. (1998) y Anguelova y Warthesen (2000b) reportaron que las cinéticas de degradación del licopeno en aceite siguieron una reacción de primer orden (ecuación 1).

Los factores principales del diseño dos factorial fueron iluminación y tiempo. En ambos experimentos, la iluminación, el tiempo y la interacción iluminación*tiempo fueron significativos en la retención de licopeno ($p \leq 0.001$). Al comparar ambos experimentos, la media estimada más elevada de retención de licopeno se presentó en condiciones de oscuridad en muestras de aceite con carotenoide y con antioxidantes y fue de 57.75 %, mientras que en presencia de luz fue de 43.57 %.

En el caso de las muestras sin antioxidantes y condiciones de oscuridad fue de 52.61 % y en presencia de luz fue de 39.89 %.

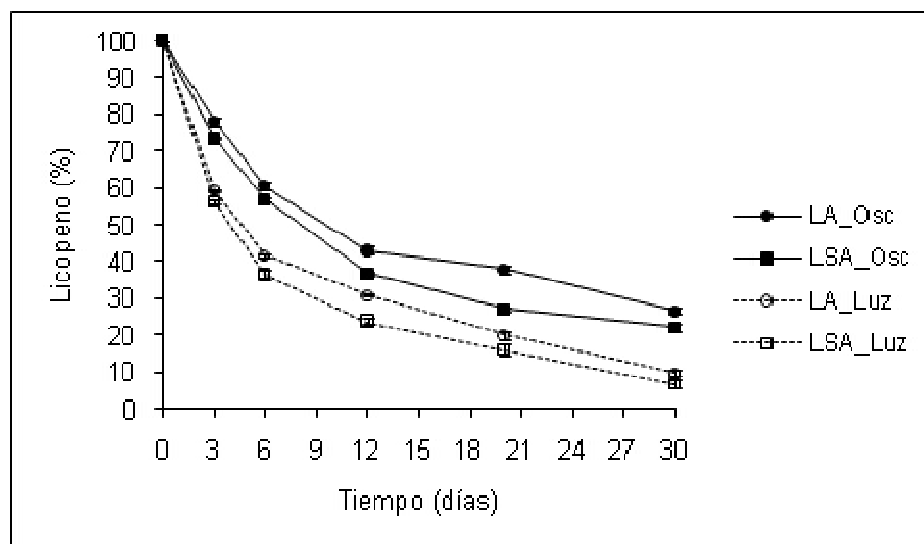


Figura 32. Cinéticas de degradación del licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad y luz a 20°C. Clave: -●- licopeno con antioxidante en oscuridad; -■- licopeno sin antioxidante en oscuridad; -○- licopeno con antioxidante en luz; -□- licopeno sin antioxidante en luz.

Con respecto a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en las muestras con antioxidantes, se demostró que todos los días de almacenamiento (3, 6, 12, 20 y 30 días) presentaron diferencia significativa con respecto a la retención de licopeno, siendo la media estimada para los 30 días de 18.23 %. A medida que se incrementó el tiempo la retención de licopeno disminuyó. Este mismo comportamiento lo presentaron las muestras sin antioxidantes siendo la media estimada para los 30 días de 14.47 %.

Considerando la interacción iluminación*tiempo en el experimento IVa (muestras con antioxidantes) los días seis en oscuridad y tres en luz no presentaron

diferencia significativa entre sí con respecto a la retención del licopeno, fue el mismo caso para los días doce sin luz y seis con luz no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Este mismo comportamiento lo presentaron las muestras de aceite con pigmento sin antioxidantes. Para las muestras de aceite con pigmento y antioxidantes la media estimada para la retención del licopeno a los treinta días en oscuridad fue de 26.74 % mientras que en condiciones de luz fue de 9.73 % a temperatura de 20° C; para las muestras sin antioxidantes la media estimada fue de 22.12 % en oscuridad y en luz fue de 6.82 %. Con base a los resultados anteriores, la luz (4 186 lux) degrada el licopeno más rápidamente en ausencia de antioxidantes que en presencia de éstos. El medio de aceite rico en ácidos grasos insaturados y la ausencia de antioxidantes hace que se degrade más rápidamente el carotenoide al actuar como único antioxidante del aceite en presencia de luz (4 186 lux) a 20 °C.

En la figura 32 se muestra la degradación del licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad y luz a 20°C (IVa y IVb respectivamente). La reacción de degradación del carotenoide en aceite de canola siguió un modelo cinético de primer orden y es consistente con la degradación de primer orden que presentó el licopeno en linoleato de metilo a 37°C reportado por Anguelova y Warthesen (2000b). Las constantes de velocidad de degradación del licopeno con antioxidantes fueron de 0.260 d⁻¹ (A) y 0.435 d⁻¹ (B) en condiciones de oscuridad y luz respectivamente (Cuadro 21). Se comprobó con una prueba de t-Student que las pendientes o velocidades de decrecimiento fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$), siendo menor la constante de velocidad de degradación del licopeno en condiciones de oscuridad. El tiempo necesario para retener el 50% de licopeno fue de 2.67 días en oscuridad y 1.59 días en condiciones de luz. Es decir, el licopeno presentó reactividad al oxígeno singulete y radicales peróxido (actividad antioxidante) presentes en el medio de aceite rico en ácidos grasos insaturados. También la degradación del carotenoide en ausencia de antioxidantes siguió una reacción de primer orden a 20°C (IVb). La constante de velocidad de degradación del licopeno sin antioxidantes en oscuridad (A'; 0.314 d⁻¹) fue significativamente menor

que la constante de velocidad en condiciones de luz (B' ; 0.504 d^{-1}). El tiempo necesario para retener el 50% de licopeno fue de 2.19 días en oscuridad y 1.38 días en condiciones de luz. Es decir, el licopeno sin antioxidantes se degradó más rápidamente por lo que actuó como antioxidante en el medio de aceite rico en ácidos grasos insaturados (oxígeno singulete y radicales peróxido libres). En oscuridad, la constante de velocidad de degradación del pigmento con antioxidantes (A; 0.260 d^{-1}) fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a la constante de velocidad del pigmento sin antioxidantes (A' ; 0.314 d^{-1}). En condiciones de luz, con adición y sin adición de antioxidantes (B y B') las constantes de velocidad de degradación fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$), siendo menor la constante de velocidad para el licopeno con antioxidantes (0.435 d^{-1}) que la constante de velocidad para el pigmento sin antioxidantes (0.504 d^{-1}), con lo que se confirma que el BHA y BHT protegen el efecto inhibitorio del caroteno sobre el oxígeno singulete y radicales peróxido durante la fotooxidación mediante evitar la descomposición del carotenoide.

Cuadro 21. Modelos para la retención de licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad y luz a 20°C .

Caso	Antioxidantes	Iluminación	Modelo ajustado	R^2	Tiempo necesario para retener el 50% de licopeno (días)
A	Si	Oscuridad	% L = $100 \exp(-0.260t)$	0.990	2.67
B	Si	Luz	% L = $100 \exp(-0.435t)$	0.979	1.59
A'	No	Oscuridad	% L = $100 \exp(-0.314t)$	0.990	2.19
B'	No	Luz	% L = $100 \exp(-0.504t)$	0.978	1.38

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad de degradación.

A' con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad de degradación.

A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad de degradación.

B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad de degradación.

En todos los casos $p \leq 0.05$

En ausencia de antioxidantes y condiciones de luz la degradación del carotenoide fue más rápida. La actividad antioxidante del licopeno depende del tipo de oxidantes involucrados en la reacción de oxidación, presencia de otros antioxidantes ya sea sintético (BHA o BHT) o natural (γ o α -tocoferol) y condiciones

de iluminación. Es el caso de Haila y col. (1996) que reportaron que el licopeno y luteína fueron prooxidantes en la autooxidación de triglicéridos mientras que γ -tocoferol fue antioxidante. Por otra parte Lavelli y col. (2000) demostraron que la fracción lipofílica (licopeno y β -caroteno) de jitomates cv. Rita presentó elevada actividad antioxidante al inhibir la peroxidación lipídica inducida en un sistema modelo de ácido linoleico/ CuSO_4 .

La degradación del licopeno en aceite de canola siguió un modelo cinético de primer orden ya sea con adición de antioxidantes o en ausencia de ellos en condiciones de oscuridad y luz. Sin embargo, en ausencia de antioxidantes y en presencia de luz (4 186 lux) la degradación del carotenoide fue más rápida. Es decir, los antioxidantes BHA:BHT permiten que la degradación del pigmento sea más lenta y el efecto antioxidante sea más prolongado (Ver 2.6.5). La adición de antioxidantes con el licopeno en aceite en condiciones de luz permitió prolongar el efecto inhibitorio del caroteno sobre el oxígeno singulete y radicales peróxido durante la peroxidación lipídica, ya que retardó la descomposición del licopeno. Boon y col., (2009) reportaron que la luz tuvo poca influencia sobre la degradación del licopeno en emulsiones aceite/agua a pH de 3, 5 y 7, y almacenadas a 15°C. Posiblemente las gotas lipídicas en la emulsión dispersaron la luz o hubo ausencia del oxígeno singulete (generado por rivo flavina o clorofila), necesario para la fotodegradación del licopeno.

7.4.3 Experimentos Va y Vb (Cuadro 11): Cinéticas de degradación del licopeno con y sin adición de antioxidantes en aceite de canola en oscuridad durante el almacenamiento a 4, 20 y 60 °C.

La determinación del porcentaje de retención de licopeno se realizó en los experimentos: Para muestras de aceite con licopeno con antioxidantes (Va) y el segundo (Vb) para muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes. En ambos experimentos, los factores principales y la interacción temperatura*tiempo fueron significativos con respecto a la retención de licopeno ($p \leq 0.001$). Para ambos

experimentos, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró con respecto a la temperatura, que las tres medias fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) y que al incrementar la temperatura, la media de retención de licopeno disminuyó significativamente

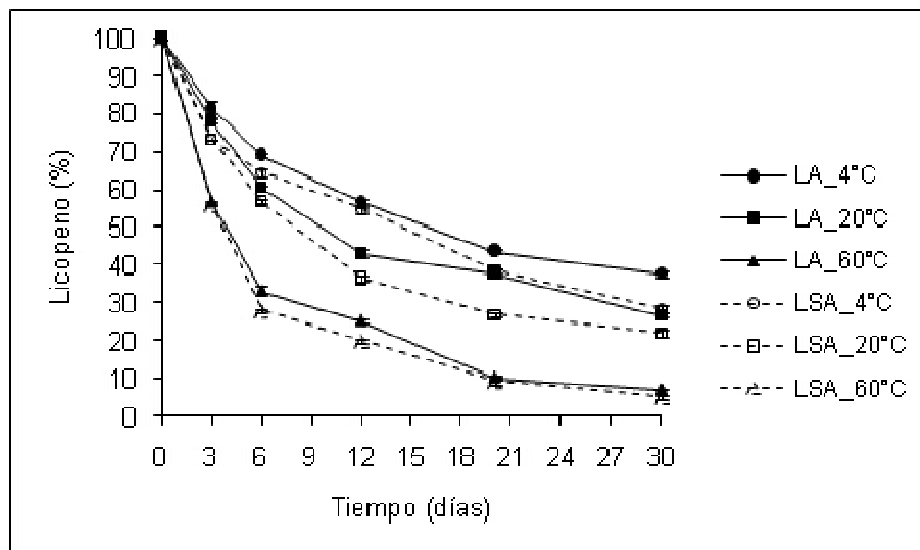


Figura 33. Cinéticas de degradación del licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C. Clave: -●- Licopeno con antioxidantes a 4 °C; -■- Licopeno con antioxidantes a 20 °C; -▲- Licopeno con antioxidantes a 60 °C; -○- Licopeno sin antioxidantes a 4 °C; -□- Licopeno sin antioxidantes a 20 °C; -△- Licopeno sin antioxidantes a 60 °C.

Para el experimento con antioxidantes las medias de retención del pigmento fueron 64.77, 57.75 y 38.75 % para 4, 20 y 60 °C, respectivamente. Respecto al tiempo ocurrió igual comportamiento, todas las medias fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) y al incrementar el tiempo las medias de retención de licopeno disminuyeron. En el caso del experimento sin antioxidantes, las medias de retención del pigmento fueron 59.85, 52.61 y 36.38 % para 4, 20 y 60 °C, respectivamente. Por

los resultados anteriores, los antioxidantes protegen al licopeno de la oxidación, permitiendo que la velocidad de degradación del mismo sea más lenta (Figura 33).

Con respecto a las interacciones (temperatura*tiempo) para el modelo con antioxidantes, la media más elevada de licopeno retenido fue de 81.39 % en el día 3 a 4 °C y presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás. La menor media que presentó diferencia significativa del resto fue 7.17 % y que correspondió al día 30 con 60 °C. Para el modelo sin antioxidantes la media más elevada de licopeno retenido fue de 73.35 % en el día 3 a 4 °C, la media significativamente ($p \leq 0.05$) menor fue de 5.13 % en el día 30 con 60 °C. Estas diferencias significativas son debido a la degradación del licopeno por autooxidación de los dobles enlaces insaturados (Lee y Chen, 2001). En el modelo con los antioxidantes los días 12 a 4°C y 3 a 60°C no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a la retención del licopeno; mientras que en el modelo sin antioxidantes los días 12 a 4 °C, 3 a 60 °C y 6 a 20 °C no presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$).

Para cada una de las tres temperaturas con y sin antioxidantes se ajustaron los modelos de la forma : $\% L = C_0(\exp(-k t))E$, corroborándose en cada uno de ellos que los errores tuvieron distribución normal. Los modelos estimados se indican en el cuadro 22.

En el modelo para las muestras de aceite con licopeno con antioxidantes (Va), la constante de velocidad de reacción fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a temperatura de 4 °C (A; 0.197 d^{-1} ; $R^2 = 0.994$) que a 20 °C (B; 0.259 d^{-1} ; $R^2 = 0.990$); igualmente a 60°C (A; 0.197 d^{-1} ; $R^2 = 0.994$ y C; 0.530 d^{-1} ; $R^2 = 0.984$), es decir la degradación del pigmento fue menor. Este mismo comportamiento fue presentado en los modelos para las muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes (Vb), las constantes de velocidad fueron 0.239 d^{-1} a 4 °C (A'; $R^2 = 0.975$) y 0.314 d^{-1} a 20 °C (B'; y $R^2 = 0.990$); 0.239 d^{-1} a 4 °C (A'; $R^2 = 0.975$) y 0.588 d^{-1} a 60°C (C'; $R^2 = 0.992$; Figura 33). A temperatura de 4°C, la constante de velocidad del licopeno con antioxidantes (A) fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) que para licopeno sin

antioxidantes (A') (0.197 d^{-1} y 0.239 d^{-1} , respectivamente), significando que la degradación del pigmento fue menor ($R^2 = 0.994$ y 0.975 , respectivamente). Este mismo comportamiento se presentó en los modelos ajustados para las muestras de aceite con licopeno con antioxidantes (B) y sin antioxidantes (B') a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y las muestras de aceite con licopeno con antioxidantes (C) y sin antioxidantes (C') a 60°C ; las constantes de velocidad a 20°C fueron 0.259 d^{-1} para el primer modelo y 0.314 d^{-1} para el segundo modelo ($R^2 = 0.990$ y 0.990 , respectivamente); a 60°C fueron 0.530 d^{-1} para el primer modelo (C) y 0.588 d^{-1} para el segundo modelo ($R^2 = 0.984$ y 0.992 , respectivamente) considerando una concentración inicial del 100 %.

Cuadro 22. Modelos para la retención de licopeno con y sin antioxidantes en aceite de canola en condiciones de oscuridad a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Caso	Antioxidantes	Temperatura $^\circ\text{C}$	Modelo ajustado	R^2	Tiempo de retención del 50 % del licopeno inicial (días)
A	Si	4	% L = $100 \exp(-0.197t)$	0.994	3.49
B	Si	20	% L = $100 \exp(-0.259t)$	0.990	2.68
C	Si	60	% L = $100 \exp(-0.530t)$	0.984	1.30
A'	No	4	% L = $100 \exp(-0.239t)$	0.975	2.91
B'	No	20	% L = $100 \exp(-0.314t)$	0.990	2.21
C'	No	60	% L = $100 \exp(-0.588t)$	0.992	1.17

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 A con C presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 B con C presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 A' con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 A' con C' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 B' con C' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 C con C' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.
 En todos los casos $p \leq 0.05$

Con base a estos resultados, los antioxidantes permiten que a 4°C (A) la velocidad de degradación del pigmento sea menor y por tanto conserve su efecto antioxidante en el sistema de aceite por más tiempo.

A 20°C y en ausencia de antioxidantes, la velocidad de degradación del licopeno fue mayor que a 4°C, este incremento en la degradación se debe a una mayor reactividad del pigmento hacia el oxígeno singulete y radicales peróxido, lo anterior es coincidente con lo reportado por Anguelova y Warthesen, (2000b) en un sistema de linoleato de metilo y licopeno a 37°C, en el cual a las 72 h el pigmento se había degradado del 74 al 84 %.

Por otra parte, la mayor pérdida de licopeno fue en las muestras de aceite con licopeno sin antioxidantes en oscuridad a 60 °C (2.5 veces más que a 4 °C y 1.9 veces más que a 20 °C). Es posible que la temperatura de 60 °C degradó al licopeno, por lo que no tuvo efecto antioxidante.

En general, al aumentar la temperatura y tiempo de almacenamiento, la retención de licopeno en las muestras de aceite disminuyó. La adición de antioxidantes y almacenamiento a bajas temperaturas en condiciones de oscuridad son factores determinantes para la retención del pigmento y conservar su efecto antioxidante en un sistema de aceite.

Poca información se encuentra sobre el mecanismo de oxidación del licopeno y sus productos. Khachik y col. (2002) reportaron que el licopeno en presencia de *m*-cloroperbenzoico, seguido de una hidrólisis ácida encontraron licopeno 1,2 epóxido y licopeno 5,6 epóxido, éste último sufre un re-arreglo para formar 2,6- ciclolicopeno-1,5-epoxidos A y B. Estos compuestos fueron convertidos a 2,6-ciclolicopeno-1,5-diol A y B por un ácido o enzima en el cuerpo humano, también estos productos se encontraron en el jitomate y sus productos procesados en pequeñas cantidades.

El licopeno también puede ser convertido en radicales peróxido capaces de actuar como prooxidantes y sufrir autooxidación: El oxígeno puede introducirse al menos en dos vías: a) oxidación de un metil o grupo metileno y b) adición a un doble

enlace carbono-carbono. La degradación oxidativa puede ocurrir en cualquiera de los dos extremos de la molécula (esqueleto carbono C₄₀; Shi y col., 2004; Ver 2.3.5).

7.5 Estabilidad de licopeno en emulsiones de aceite/agua en condiciones de oscuridad a 4°C.

El licopeno tiene un alto poder antioxidante y capacidad para inactivar radicales libres principalmente en fases lipídicas; presenta una alta velocidad de neutralización del oxígeno singulete (¹O₂) y es uno de los más eficientes antioxidantes dentro de los carotenoides (Di Mascio y col., 1989; Henry y col., 1998). Shi y Le Maguer (2000), reportaron que sólo una pequeña parte de los carotenoides es absorbida de frutas u hortalizas, mientras que los carotenoides disueltos en aceite vegetal presentan una alta biodisponibilidad. Por otra parte, Ribeiro y col. (2003) señalaron que los carotenoides no son solubles en agua y ligeramente solubles en aceite, pero la solubilidad aumenta al elevar la temperatura del aceite.

La biodisponibilidad del licopeno es limitada, depende de varios factores como es la co-ingestión con aceite, isomerización y procesamiento térmico. Para mejorar el consumo total y biodisponibilidad, el licopeno puede ser disuelto en la fase de aceite de emulsiones de aceite-en-agua y entonces adicionarlo a sistemas alimentarios basados en agua (Ax y col., 2003). Se puede formular una emulsión de aceite-en-agua (O/W), conteniendo el licopeno en las gotas de aceite (fase dispersa: Ver 2.7.2). Esta formulación del pigmento provee una adecuada biodisponibilidad en agua (fase continua), consecuentemente fácil de manipular. Para preparar estas emulsiones, el carotenoide se disuelve en aceite vegetal caliente y el paso siguiente es incorporarlo en la fase acuosa. Debido a las propiedades de las emulsiones aceite/agua como un sistema de transferencia de licopeno, resulta de interés aplicarlo en el procesado de alimentos, por ejemplo alimentos funcionales (Ribeiro y col., 2003). Debido a la degradación del licopeno en emulsiones aceite/agua (por su poder antioxidante en aceite), es necesario adicionar un antioxidante. Estos mismos investigadores han utilizado α- tocoferol con éxito. Para estabilizar la emulsión se

utilizan diversos emulsificantes como lecitina y tween 20 (surfactante). Boon y col. (2009) indicaron que los carotenoides solubles en lípidos y dispersos en las gotas de emulsiones aceite/agua presentan gran potencial para considerarlos ingredientes bioactivos (Ver 2.7.4). Estos sistemas de emulsiones pueden incorporarse a alimentos funcionales.

7.5.1 Estabilidad química: cinéticas de degradación del licopeno en emulsión.

Se realizaron dos experimentos, el primero para emulsiones aceite (carotenoide) en agua (O/W) con suero de leche (VIa; Cuadro 13) y el segundo para emulsiones O/W con goma arábica (VIb; Cuadro 13). Los factores principales del diseño dos factorial fueron tratamiento térmico (escaldado y no escaldado) y tiempo. En ambos experimentos, el tratamiento térmico, el tiempo y la interacción tratamiento térmico*tiempo fueron significativos en la retención de licopeno ($p \leq 0.001$).

El licopeno utilizado en la fase dispersa (aceite de canola/pigmento) fue proveniente de jitomates escaldados y no escaldados.

Los factores principales y la interacción tratamiento*tiempo fueron significativos. En el primer experimento (VIa) Las medias estimadas de retención de licopeno fue de 83.74 % para licopeno de jitomates escaldados y de 81.89 % para licopeno de jitomates no escaldados, mientras que en el segundo experimento donde el estabilizador fue goma arábica (VIb) las medias estimadas fueron de 79.10 % para licopeno de jitomates escaldados y 72.30 % para licopeno de jitomates no escaldados. De acuerdo a estos resultados, la mayor retención de licopeno fue en la emulsión estabilizada con suero de leche, el cual también se considera un emulsificante (Figura 34).

Como en los anteriores experimentos el licopeno proveniente de jitomates escaldados en hexano también en las emulsiones Aceite/Agua presentó menor

degradación durante el periodo de almacenamiento que el licopeno proveniente de jitomates sin escaldar.

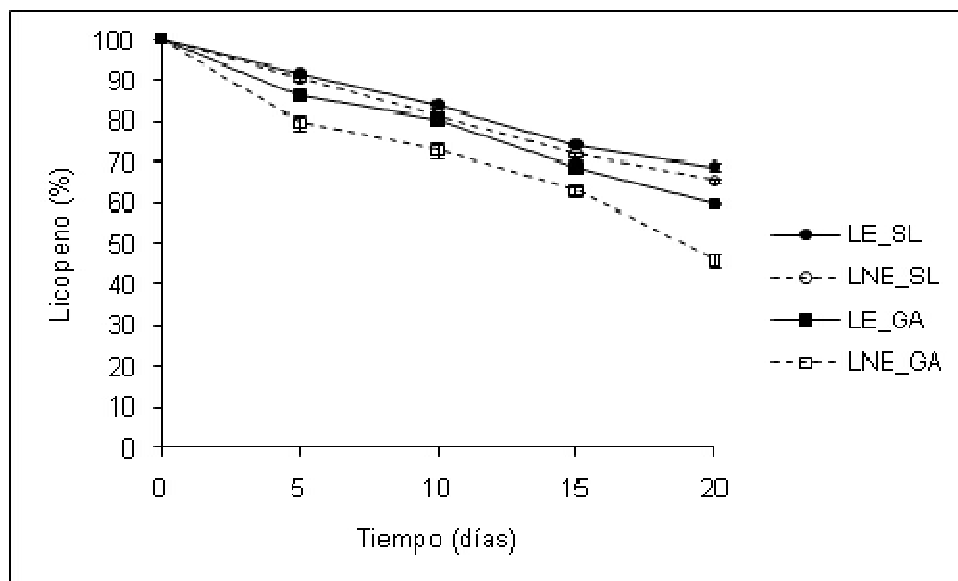


Figura 34. Cinéticas de degradación del licopeno (provenientes de tomates escaldados y no escaldados) en emulsiones de aceite/agua en condiciones de oscuridad a 4°C. Clave: -●- Licopeno escaldado en suero de leche; -○- Licopeno no escaldado en suero de leche; -■- Licopeno escaldado en goma arábica; -□- Licopeno no escaldado en goma arábica.

Con respecto a la prueba de comparación múltiple de Tukey, para ambos experimentos (VIa, suero de leche y VIb, goma arábica) todas las medias estimadas de retención de licopeno fueron significativamente diferentes durante los 20 días de almacenamiento a 4°C y α -tocoferol como antioxidante. Al incrementar los días de almacenamiento la retención de licopeno disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) para ambos experimentos, siendo la media estimada para el licopeno retenido a los 20 días de 67.24 % para suero de leche y de 53.0 % para goma arábica.

La interacción tratamiento térmico*tiempo, en la emulsión Aceite/Agua con suero de leche como estabilizador, en el día 5 las muestras de licopeno escaldado y licopeno no escaldado no presentaron diferencia significativa entre sí con relación a la retención de licopeno (90.64 – 91.65 %). Todos los demás días de muestreo fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). La menor retención de licopeno fue en la muestra de licopeno no escaldado en el día veinte con 65.56 %. En el caso de goma arábica como estabilizador, la muestra de licopeno escaldado en el día 10 y la muestra de licopeno no escaldado en el día 5 no presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) siendo el intervalo de pigmento retenido de 79.67 – 80.5 %. Todos los demás días de muestreo fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). La menor retención de licopeno fue en la muestra de licopeno no escaldado en el día veinte con 46.10 %. Con base a los resultados, se observó que la mayor retención de licopeno fue en las muestras del carotenoide proveniente de jitomates escaldados para ambas emulsiones estabilizadas con suero de leche y goma arábica. Sin embargo al comparar ambos experimentos la mayor retención de licopeno de jitomates escaldados fue en la emulsión donde el estabilizador fue suero de leche.

La mayor retención de licopeno en suero de leche en la emulsión Aceite/Agua es posible a que las proteínas del suero (estabilizador) actuaron como antioxidantes e inhibieron reacciones oxidativas, caso contrario ocurrió con la goma arábica, el cual es un polisacárido con una pequeña fracción proteica (2%; Dickinson, 2003; Ver 2.7.3.3.2). Mc Clements y Decker (2000) reportaron que las proteínas en emulsiones Aceite/Agua son antioxidantes e inhiben reacciones oxidativas por diversas vías: inactivación de especies reactivas de oxígeno, captura de radicales libres, quelante o secuestrante de metales de transición prooxidantes, reducción de hidroperóxidos y alteración de las propiedades físicas de sistemas alimentarios. Por otra parte, Ton y col. (2000); Hu y col. (2003a,b) y Elías y col. (2005) reportaron que las proteínas inhiben la oxidación lipídica en emulsiones de Aceite/Agua cuando están en la región de la interfase o en la fase continua (Ver 2.7.3.3.1).

Djordjevic y col (2008) reportaron que el limoneno (componente y sabor de los aceites de cítricos) soluble en lípidos fue más estable en emulsiones de Aceite/Agua cuando se utilizó proteína aislada de suero que goma arábiga como estabilizador. Estos mismos investigadores encontraron que la proteína aislada puede formar gotas catiónicas en la región de la interfase a pH 3, las cuales pueden repeler metales prooxidantes, además las proteínas aisladas de suero actuaron como atrapadores de radicales libres y como agentes quelantes o secuestrantes de metales.

Ax y col. (2003) reportaron que la degradación del licopeno en emulsiones Aceite/Agua en condiciones oxidativas y no oxidativas siguieron cinéticas de primer orden, por lo que para cada uno de los dos niveles de tratamiento térmico se ajustaron los modelos de la forma:

$$\% L = C_o(\exp(-k t))E$$

Se probó, con una prueba de t-Student si las pendientes o velocidades de degradación (β_1 y β_1') fueron significativamente distintas ($p \leq 0.05$). En el primer experimento donde el estabilizante fue suero de leche (VIa; Cuadro 13), la constante de velocidad de degradación del licopeno fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en las muestras de emulsión de licopeno proveniente de jitomates escaldados (A; 0.019 d^{-1}) que la constante de velocidad de emulsiones de pigmento proveniente de jitomates no escaldados (B; 0.021 d^{-1}). Es decir, la degradación del carotenoide fue más lenta cuando el licopeno fue proveniente de jitomates escaldados. Lo anterior se confirma al necesitar de 36.68 días para degradar el 50 % de licopeno proveniente de jitomates escaldados mientras que para el licopeno proveniente de jitomates no escaldados en las emulsión sólo fueron necesarios 33.19 días (Cuadro 23). En el segundo experimento donde el estabilizante fue goma arábiga, la constante de velocidad de degradación del licopeno fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en las muestras de emulsión de licopeno extraído de jitomates escaldados (A'; 0.125 d^{-1}) que la constante de velocidad de emulsiones de pigmento proveniente de jitomates

no escaldados (B' ; 0.178 d^{-1}). Al igual que en el primer experimento (suero de leche) la degradación del carotenoide fue más lenta cuando el licopeno fue proveniente de jitomates escaldados, lo que significa, que tratamiento térmico le proporcionó mayor estabilidad al carotenoide.

Al comparar los modelos A (suero de leche) y A' (goma arábica) se encontró que la constante de velocidad de degradación del licopeno escaldado proveniente de la emulsión estabilizada con suero de leche fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a la constante de velocidad del pigmento proveniente de la emulsión estabilizada con goma arábica (0.019 d^{-1} y 0.125 d^{-1} , respectivamente). En el caso de los modelos B y B' , se encontró que la constante de velocidad de degradación del licopeno no escaldado proveniente de la emulsión estabilizada con suero de leche (0.021 d^{-1}) fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) a la constante de velocidad del pigmento proveniente de la emulsión estabilizada con goma arábica (0.178 d^{-1}).

Cuadro 23. Modelos para la retención de licopeno (escaldado y no escaldado) en emulsiones Aceite/Agua estabilizadas con suero de leche y goma arábica en condiciones de oscuridad a 4°C .

Caso	Estabilizador	Tratamiento térmico	Modelo ajustado	R^2	Tiempo de retención del 50 % del licopeno inicial (días)
A	Suero de leche	Escaldado	% L = $100 \exp(-0.019t)$	0.992	36.68
B	Suero de leche	No escaldado	% L = $100 \exp(-0.021t)$	0.996	33.19
A'	Goma arábica	Escaldado	% L = $100 \exp(-0.125t)$	0.987	5.54
B'	Goma arábica	No escaldado	% L = $100 \exp(-0.178t)$	0.956	3.89

Diferencias estadísticas observadas entre casos:

A con B presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A' con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

A con A' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

B con B' presentaron diferencia significativa en las constantes de velocidad.

En todos los casos $p \leq 0.05$

De acuerdo a los resultados anteriores, la mayor retención de licopeno en una emulsión Aceite/Agua fue utilizando como estabilizante y emulsificante suero de leche y el carotenoide proveniente de jitomates escaldados.

Con base a los estudios realizados por Elias y col. (2005) y Djordjevic y col. (2008), es posible que la proteína del suero como estabilizante de la emulsión Aceite/Agua le proporcione mayor protección y estabilidad al licopeno debido a la habilidad de sus aminoácidos como metionina, cisteína, histidina y triptófano para atrapar radicales libres, por lo que se puede considerar un buen emulsificante y surfactante.

La goma arábica, es un hidrocoloide que se utiliza en las emulsiones Aceite/Agua; en la fase acuosa queda la parte hidrofílica, es decir el polisacárido queda disuelto en el agua y contribuye a la reducción de la degradación oxidativa a causa de la disminución de la solubilidad del oxígeno, incrementando la viscosidad de la fase acuosa, la cual disminuye la movilidad de las especies reactivas de oxígeno y actúa como un barrador de radicales libres (McClements y Decker, 2000). Sin embargo su efectividad como estabilizador y emulsificante fue menor que el suero de leche.

Por otra parte, el α -tocoferol (alta capacidad antioxidante y no polar) inhibió de manera drástica la degradación del licopeno. En una emulsión Aceite/Agua, el α -tocoferol como antioxidante lipofílico se distribuye en la fase del aceite y en la interfase aceite-agua, por lo que puede inhibir de manera más eficiente la oxidación lipídica que un antioxidante hidrofílico presente en la fase acuosa, además reacciona con los peróxidos y radicales libres de la peroxidación lipídica (McClements y Decker, 2000; Ribeiro y col., 2003).

Boon y col. (2008) reportaron que la estabilidad de los ácidos grasos y licopeno fue mayor en una emulsión Aceite/Agua estabilizada por un surfactante catiónico como DTAB (dodeciltrimetilbromuro de amonio). Estos mismos investigadores reportaron que las velocidades de degradación del licopeno fueron similares en emulsiones con y sin adición de ácidos grasos, lo que indica que la pérdida de licopeno es independiente de la presencia de ácidos grasos. Posiblemente se debe a

una alteración en la gota en la región interfacial de la emulsión. También reportaron que la estabilidad oxidativa en emulsiones de Aceite de maíz/Agua estabilizadas por SDS (aniónica dodecil sulfato de sodio) fue el siguiente orden: tocoferol < licopeno < ácidos grasos. Es decir, el licopeno se degradó más rápidamente que los ácidos grasos insaturados pero menos rápido que el tocoferol.

Ax y col. (2003) reportaron la formación de isómeros 15-*cis* licopeno, 13-*cis* licopeno y 9-*cis* licopeno durante el proceso de emulsificación.

Los productos de degradación del licopeno son probablemente una combinación de epóxidos, apocarotenales e isómeros (Henry y col., 1998). Khachik y col. (2002) reportaron que son epóxidos que sufren un re-arreglo y se transforman en 2,6- ciclolicopeno-1,5-epóxidos A y B, los cuales se han encontrado en el suero humano y en pequeñas cantidades en jitomates y en sus productos procesados (Ver 2.3.5).

7.5.2 Estabilidad física

La distribución del tamaño de la gota es un atributo importante para las emulsiones ya que influye en sus propiedades y estabilidad.

Cuadro 24. Propiedades físicas de las emulsiones de licopeno (pH y tamaño de gota).

Emulsión	pH	Diámetro externo (μm)	Diámetro interno (μm)
LE/SL	5.50	3.12	2.61
LSE/SL	5.48	3.07	2.58
LE/GA	4.42	3.59	3.02
LSE/GA	4.44	3.40	2.86

Sobre la estabilidad física, ambas emulsiones de licopeno no presentaron cambios en la distribución del tamaño de partícula (gota) con los dos tipos de emulsificantes. El diámetro Sauter $d_{3,2}$ de las partículas de ambas emulsiones no presentaron variación durante los 20 días de almacenamiento a 4°C. Lo anterior confirma que no hubo incremento del tamaño de partícula debido a la coalescencia o agregación.

El suero de leche fue más eficiente al producir gotas de lípido más pequeñas durante la homogeneización que la goma arábica (Cuadro 24). Este comportamiento también lo presentó el limoneno en emulsiones de aceite-en-agua utilizando proteína aislada de suero y goma arábica como estabilizantes (Djordjevic y col 2008). Estos mismos investigadores reportaron que la inestabilidad física (crecimiento de la gota o agregación) de la emulsión con goma arábica posiblemente se debe a la presencia de hidroperóxidos y hierro.

Con base a los resultados, el suero de leche (proteína) fue más eficiente para inhibir la degradación oxidativa del licopeno en las emulsiones Aceite/Agua. Lo anterior, posiblemente se deba a que se formen gotas catiónicas en la región interfacial de la emulsión a pHs bajos. Por tanto, el suero de leche proporcionó mayor estabilidad a la emulsión que la goma arábica (Ver 2.7.1.8).

La degradación de licopeno fue menor en las emulsiones (con α -tocoferol como antioxidante) que en el hexano y en el aceite de canola. Lo anterior es debido a la composición propia de la emulsión y además que el α -tocoferol como antioxidante lipofílico se distribuye principalmente en la fase lipídica y en la interfase aceite-agua, por lo que protege al licopeno de la degradación oxidativa.

Efecto de la etapa de madurez, almacenamiento a 4°C y tratamiento térmico en el jitomate Saladette

El tratamiento térmico (escaldado a 93.5°C por 50 segundos) aplicado a los jitomates Saladette no afectó los sólidos solubles totales, acidez titulable y azúcares reductores. Sin embargo, sí afectó el pH, ácido ascórbico y color.

En el caso del color, los jitomates no escaldados presentaron valores menores de tono o matiz que significa un color más rojo y por lo tanto mayor concentración de licopeno.

Extracción de licopeno en jitomates con maduración en etapa rojo

Después de la extracción, 752.5 µg y 792 µg de licopeno se recuperaron de 10 g de jitomate escaldado y no escaldado, respectivamente. Además en los cromatogramas del HPLC se identificaron otros picos que posiblemente correspondan a xantofilas e isómeros de *all-trans*-licopeno y β-caroteno.

Estabilidad del licopeno

La retención de licopeno (hexano) depende de la iluminación, temperatura y tiempo de almacenamiento, además si el pigmento es extraído de jitomates escaldados o no escaldados.

Las cinéticas de degradación del licopeno en solución siguieron una reacción de primer orden con una constante de velocidad de reacción que estuvo en función de la temperatura, adición de antioxidantes (BHA:BHT) e iluminación.

La degradación del pigmento fue mayor bajo condiciones de luz (4 186 lux) y 20°C que en oscuridad y 60°C durante el mismo tiempo de almacenamiento.

La concentración de licopeno de jitomates cv. Saladette fue mayor cuando el fruto fue escaldado previo a la extracción del pigmento, es decir, el tratamiento térmico le proporcionó mayor estabilidad al carotenoide en condiciones de oscuridad a 4°C y adición de antioxidantes.

Estabilidad y actividad antioxidante del licopeno en aceite de canola

Las cinéticas de degradación del licopeno en aceite de canola siguieron una reacción de primer orden con una constante de velocidad de reacción que estuvo en función de la temperatura, adición de antioxidantes (BHA:BHT) e iluminación.

En aceite de canola, la degradación del pigmento fue mayor bajo condiciones de oscuridad y 60°C que en condiciones de luz (4 186 lux) y 20°C durante el mismo tiempo de almacenamiento, por lo que la elevada temperatura degradó al pigmento, lo que ocasionó una elevada formación de hidroperóxidos.

Los antioxidantes (BHA:BHT), temperatura de 4°C y condiciones de oscuridad permitieron que el licopeno conservara su efecto antioxidante en el aceite de canola, por lo que la formación de hidroperóxidos fue menor.

Debido al efecto antioxidante del licopeno, la degradación de éste fue mayor en aceite de canola que en hexano.

El efecto antioxidante del licopeno en la peroxidación lipídica fue acompañado por la degradación del pigmento y pérdida de color.

Estabilidad de emulsiones de licopeno (aceite/agua)

Las cinéticas de degradación del licopeno en la emulsión aceite/agua siguieron una reacción de primer orden con una constante de velocidad de reacción que estuvo en función del tratamiento térmico y emulsificante.

En la emulsión, la degradación del pigmento fue mayor cuando se utilizó goma arábica como emulsificante y el pigmento proveniente de jitomates no escaldados.

El α -tocoferol como antioxidante inhibió la degradación del licopeno, por lo que presentó mayor poder antioxidante que el pigmento.

El carotenoide en las gotas de aceite de la emulsión aceite/agua puede ser la base de una formulación para incorporar licopeno en sistemas dispersos en agua o en alimentos funcionales. Ya que la degradación del pigmento fue menor, sobre todo utilizando suero de leche como emulsificante y α -tocoferol como antioxidante.

Debido a la alta producción de jitomate en México, además de su uso como alimento, puede ser una fuente de licopeno para su dispersión en emulsiones aceite/agua e incorporarlo como un ingrediente bioactivo en alimentos funcionales.

Se recomienda realizar estudios sobre la concentración de licopeno en diferentes etapas de maduración del jitomate cv Saladette y ver la relación que hay con los parámetros de color a, b y L y/o tono (Hue).

Es necesario continuar investigaciones acerca del mecanismo de conversión de all-*trans* licopeno en sus isómeros *cis* en sistemas alimentarios comerciales para jitomates cv Saladette.

Realizar estudios sobre la estabilidad y actividad antioxidante del licopeno en un una fase lipídica utilizando como antioxidante α -tocoferol.

Se recomienda realizar estudios sobre la formulación de emulsiones de licopeno con suero de leche en ausencia y presencia de α -tocoferol y factores como iluminación y temperatura.

Estas emulsiones de licopeno incorporarlas a alimentos como jugos, malteadas y yogurt con la finalidad de elaborar sistemas alimentarios funcionales. Estos sistemas alimentarios son también emulsiones, a las cuales se les deben realizar estudios físicos, químicos y toxicológicos.

- Abushita A.A., Daood H.G. y Biacs, P.A. 2000. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 48(6):2075-2081.
- Akanbi C.T. y Oludemi, F.O. 2004. Effect of processing and packaging on the lycopene content of tomato products. *Inter. J. Food Prop.* 7(1):139-152.
- Anese M., Falcone P., Fogliano V., Nicoli M.C. y Massini R. 2002. Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *J. Food Sci.* 67(9):3442-3446.
- Anguelova T. y Warthesen J. 2000a. Lycopene stability in tomato powders. *J. Food Sci.* 65(1):67-70.
- Anguelova T. y Warthesen J. 2000b. Degradation of lycopene, α -carotene. and β -carotene during lipid peroxidation. *J. Food Sci.* 65(1):71-75.
- AOAC. 1996. Official Methods of Analysis of AOAC International, sixteenth edition, Vol. II. Association of Official Analytical Chemists, USA. Chapter 37, Pp. 5-6.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of AOAC International, thirteenth edition, Association of Official Analytical Chemists, USA. Pp. 825.
- Arias, C.J. 1992. Situación actual del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. En: Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Santiago, Chile. 219-271.
- Ax K., Mayer-Miebach E., Link B., Schumann H. y Schubert H. 2003. Stability of Lycopene in oil-in-water emulsions. *Eng. Life Sci.* 3(4):199-201.
- Barringer S. 2004. Frozen tomatoes. En: Hui Y.H., Ghazala S., Graham D.M. and Nip W.K.,(eds). *Handbook of vegetable preservation and processing*. Marcel Dekker, Inc. New York. 293-308.
- Boileau T.W.M., Boileau A.C. y Erdman J.W. 2002. Bioavailability of all-trans and cis isomers of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227(10):914-919.
- Boon C.S., Xu Z., Yue X., Mc Clements D.J., Weiss J. y Decker, E.A. 2008. Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 56(4):1408-1414.
- Boon C.S., Mc Clements D.J., Weiss J. y Decker E.A. 2009. Role of iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 57(7):2993-2998.

- Bouvier F., Dogbo O. y Camara B. 2003. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300:2089-2091.
- Bramley P. M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53(377):2107-2113.
- Britton G. 1996. Carotenoids. En: *Natural food colorants*. Hendry G.F., Houghton J.D. eds. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland. 197-243.
- Bruno A.K. y Wetzal C.M. 2004. The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 55(408):2541-2548.
- Burdock G. A. 2003. The GRAS process. *Food Technol.* 57(5):17.
- Burns J., Fraser P.D. y Bramley P.M. 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62:939-947.
- Calvo M. M., Dado D. y Santa-María G. 2007. Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *Eur. Food Res. Technol.* 224:567-571.
- Candelas-Cadillo M.G., Alanís-Guzmán M.G.J., Bautista-Justo M., Del Río-Olague y García-Díaz, C. 2005. Contenido de licopeno en jugo de tomate secado por aspersión. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 4:299-307.
- Cano M.P., Sánchez-Moreno C., Pascual-Teresa S., Ancos B. 2005. Procesado mínimo y valor nutricional. En: González-Aguilar, G., Gardea, A.A., Cuamea-Navarro, F (eds.). *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. Logiprint Digital, S. de R.L. de C.V., Guadalajara, Jal. México. 121-123.
- Caris-Veyrat C., Schmid A., Carail M. y Böhm. 2003. Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations; Characterization and mechanisms of formation. *J. Agric. Food Chem.* 51(25):7318-7325.
- Chaiyasit W., Elias R. J., McClements J. y Decker E. A. 2007. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47:299-317.
- Choe E. y Min D.B. 2006. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:1-22.
- Cole E.R. y Kapur N.S. 1957a. The stability of Lycopene I: Degradation by oxygen. *J. Sci. Food Agric.* 8:360-365.

- Cole E.R. y Kapur N.S. 1957b. The stability of Lycopene II: Oxidation during heating of tomato pulps. *J. Sci. Food Agric.* 8:366-368.
- Cvetkovic D. y Markovic D. 2008. Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexane solution. *J. Serb. Chem. Soc.* 73(1):15-27.
- Del Villar-Martínez A. A., Serrato-Cruz M.A., Solano-Navarro A., Arenas-Ocampo M.L., Quintero-Gutiérrez A.G., Sánchez-Millán J.L., Evangelista-Lozano S., Jiménez-Aparicio A., García-Jiménez F.A. y Vanegas-Espinoza P.E. 2007. Carotenoides en *Tagetes erecta* L. la modificación genética como alternativa. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(2):109-118.
- Delgado-Vargas F. y Paredes-Lopez O. 2003. Carotenoids as food colors. En: Delgado-Vargas F. y Paredes-Lopez O. (ed.). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. Boca Raton, Fla:CRC Press. 143-153.
- Dey P.M. y Harborne J.B. 1997. Carotenoids. En: Day P.M. y Harborne J.B (ed.). *Plant Biochemistry*. Academic Press. Nueva York, EUA. 427-437.
- Di Mascio P., Sundquist A.R., Devasagayam P.A. y Sies H. 1992. Assay of lycopene and others carotenoids as singlet oxygen quenchers. *Meth. Enzymol.* 213: 429-438.
- Di Mascio P., Kaiser S., Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274:532-538.
- Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17:25-39.
- Djordjevic D., Cercaci L., Alamed J., Mc Clements D.J. y Decker E.A. 2008. Chemical and physical stability of protein-and gum Arabic-stabilized oil-in-water emulsions containing limonene. *J. Food Sci.* 73(3): C167-C172.
- Elias R.J., Mc Clements D.J. y Decker E.A. 2005. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions *J. Agric. Food Chem.* 53(26):10248-10253.
- Fellows, P. 2007. Propiedades de superficie; Escaldado. En: Fellows, P (ed.). *Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y práctica*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 16-17, 277-286.
- Ferreira J.E.M. y Rodriguez-Amaya D.B. 2008. Degradation of lycopene and β -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. *J. Food Sci.* 78(8): C589-C594.

- Francis F. J. 1999. Interpretation of data. En: Francis F. J. *Colorants*. Eagan Press, Minnesota, USA. 15-22.
- Galicia C. R.M. 2007. Tomato processing. En: Hui Y.H., Chandan R.C., Clark S., Cross N., Dobbs J., Hurts W.J., Nollet L.M.L., Shimoni E., Sinha N., Smith E.B., Surapat S., Titchenal A. y Toldrá F. (ed). *Handbook of Food Products Manufacturing*. Wiley-Interscience A.J. Wiley & Sons Inc. Publication, New Jersey, USA. 1091-1096.
- Garti N. y Reichman D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure* 12:411-426.
- Garti N. y Leser M.E. 2001. Emulsification properties of hydrocolloids. *Polym. Adv. Technol.* 12:123-135.
- Goula A.M., Adamopoulos K.G., Chatzitakis P.C. y Nikas V.A. 2006. Prediction of lycopene degradation during a drying process of tomato pulp. *J. Food Eng.* 74:37-46.
- Gouldson, M.J. y Warthesen, J.J. 1999. Stability and antioxidant activity of beta carotene in conventional and high oleic canola oil. *J. Food Sci.* 64(6):996-999.
- Graßmann J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. En: Begley T.P., Means A.R., O'Malley B.W., Riddiford L., y Tashjian A.H. (ed.). *Vitamins and Hormones*. Vol. 72. Elsevier Inc., New York, USA . 517-535.
- Hackett M.M., Lee J.H., Francis D. y Schwartz S.J. 2004. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. *J. Food Sci.* 69(7):536-541.
- Haila K.M., Lievonen M.S. y Heinonen M.I. 1996. Effects of lutein, lycopene, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. *J. Agric. Food Chem.* 44(8):2096-2100.
- Hakala S.H. y Heinonen M. 1994. Chromatographic purification of natural lycopene, *J. Agric. Food Chem.* 42(6):1314-1316.
- Hart D.J. y Scott J.K. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54:101-111.
- Heber D. y Lu Q.Y. 2002. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227:920-923.

- Henry L.K., Catignani, G.L. y Schwartz, S.J. 1998. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *JAOCS* 75(7):823-829.
- Hu M., Mc Clements D. J. y Decker E.A. 2003a. Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 51(5):1435-1439.
- Hu M., Mc Clements D. J. y Decker E.A. 2003b. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 51(6):1696-1700.
- Humphrey A.M. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.* 69(5):422-425
- Ishida B.K. y Chapman M.H. 2004. A comparison of carotenoid content and total antioxidant activity in catsup from several commercial sources in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52(26):8017-8020.
- Ishida B.K., Roberts J.S., Chapman M.H. y Burri B.J. 2007. Processing tangerine tomatoes: effects on lycopene-isomer concentrations and profile. *J. Food Sci.* 72(6):307-312.
- Javanmardi J. y Kubota, Ch. 2006. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids y weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41:151-155.
- Jiménez A. y Gutiérrez G. 2001. Color. En: Alvarado J.D. y Aguilera J. M. *Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos*, Editorial Acribia, Madrid, España. 325-346.
- Kaur Ch., Khurdiya D.S., Pal R.K. y Kapoor H. C. 1999. Effect of microwave heating and conventional processing on the nutritional qualities of tomato juice. *J. Food Sci. Technol.* 36(4):331-333.
- Kaur Ch., George B., Deepa N., Singh B. y Kapoor H.C. 2004. Antioxidant status of fresh and processed tomato – A review. *J. Food Sci. Technol.* 41(5):479-486.
- Khachik F., Goli M.B., Beecher G.R., Holden J., Lusby W.R., Tenorio M.D. y Barrera M.R. 1992. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40(3):390-398.
- Khachik F., Steck A., Niggli U.A. y Pfander H. 1998. Partial synthesis and structural elucidation of the oxidative metabolites of lycopene identified in tomato paste, tomato juice, and human serum. *Agric. Food Chem.* 46(12):4874-4884.

- Khachik F., Carvalho L., Bernstein P.S., Muir G.J., Zhao D.Y. and Katz N.B. 2002. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp. Biol. Med.* 227:845-851.
- Krinsky N.I. y Johnson E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 26(6):459-516.
- Lai A., Santangelo E., Soressi G. P., Fantoni R. 2007. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques. *Postharvest Biol. Technol.* 43:335-342.
- Lavelli V., Peri C. y Rizzolo A. 2000. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1442-1448.
- Lee M. T. y Chen B.H. 2001. Separation of lycopene and its cis isomers by liquid chromatography. *Chromatographia* 54:613-617.
- Lee M. T. y Chen B.H. 2002. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem.* 78:425-432.
- Lin C.H. y Chen B.H. 2005. Stability of carotenoids in tomato juice during processing. *Eur. Food Res. Technol.* 221:274-280.
- López-Hernández E., Ponce-Alquicira E., Cruz-Sosa F. y Guerrero-Legarreta I. 2001. Characterization and stability of pigments extracted from Terminalia catappa leaves. *J. Food Sci.* 66(6):832-836.
- Macrae R., Robinson R.K. y Sadler M.J. 1993. Colours. En: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, vol. 2. 1164-1180. Academic Press, London, England.
- Mancuso J.R., McClements D.J. y Decker E.A. 1999. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 47(10):4112-4116.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Provan G. y Chesson A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon sculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 82:323-330.
- Mayeaux M., Xu Z., King J.M. y Prinyawiwatkul W. 2006. Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *J. Food Sci.* 71(8): C461-C464.

- McClements D.J. 1999. Food emulsions. Principles, practice and techniques. CRC Press, Boca Raton, USA. 378 p.
- McClements D.J. y Decker E.A. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* 65(8):1270-1282.
- McClements D.J. Decker E.A. y Weiss J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72(8):109-124.
- Mencarelli F. y Saltveit, M. 1988. Ripening of mature-green tomato fruits slices. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(5):742-745.
- Moraru C. y Lee T.C. 2005. Kinetic studies of lycopene isomerization in a tributyrin model system at gastric pH. *J. Agric. Food Chem.* 53(23):8997-9004.
- Nawar W.W. 1993. Lípidos. En: Fennema O.R. (ed). Química de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 157-236.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucosa. *J. Biol. Chem.* 153(2):375-378.
- Nguyen M. L. y Schwartz S. J. 1998. Lycopene stability during food processing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218:101-105.
- Nguyen M.L. y Schwartz S.J. 1999. Lycopene: chemical and biological properties, *Food Technol.* 53(2):38-45.
- Nguyen M.L. y Schwartz S.J. 2000. Lycopene. En: Lauro J.G., Francis F.J., eds. *Natural food colorants*, Marcel Dekker, New York. 153-192.
- Periago M.J., Rincón F., Jacob K., García-Alonso J. y Ros G. 2007. Detection of key factors in the extraction and quantification of lycopene from tomato and tomato products. *J. Agric. Food Chem.* 55:8825-8829.
- Pomeranz Y. y Meloan C.E. 1994. Measurement of color. En: *Food analysis: Theory and practice*. Chapman & Hall, New York; USA. 87-98.
- Rao A.V., Ray M.R. y Rao L.G. 2006. Lycopene. *Adv. Food Nutr. Res.* 51:99-114.
- Re R., Bramley P.M. y Rice-Evans C. 2002. Effects of Food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. *Free Radic. Res.* 36(7):803-810.

- Ribeiro H.S., Ax K. y Schubert H. 2003. Stability of lycopene emulsions in food systems. *J. Food Sci.* 68(9):2730-2734.
- Ribeiro H. S. Gran Rico L., Badolato G. y Schubert H. 2005. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J. Food Sci.* 70(2):117-123.
- Robinson W.B. y Stotz E. (1954). The indophenol-xileno extraction method for ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 160:217- 221.
- Sadler, G., Davis, J. y Dezman, D. 1990. Rapid extraction of lycopene and β -caroteno from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. *J. Food Sci.* 55(5):1460-1461.
- Schwartz S.T. 1994. Pigment analysis. En: Nielsen, S. (ed.). *Introduction to the chemical analysis of food*. Jones and Bartlett Publishers International. New York. 261-271.
- SECOFI. 1997. Norma oficial mexicana para jitomate en estado fresco (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – especificaciones, NMX-FF-031-1997-SCFI, Dirección General de Normas, México. 20p.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2007. Anuario estadístico de la producción agrícola, 2005. Ciudad de México, México: SIAP-SAGARPA. p 63-66.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. Anuario estadístico de la producción agrícola, 2007. Ciudad de México, México: SIAP-SAGARPA. p 68-71.
- Shi J. y Le Maguer M. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 40(1):1-42.
- Shi J., Le Maguer M., Bryan M. y Kakúda Y. 2003. Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *J. Food Proc. Eng.* 25:485-498.
- Shi J., Qu Q., Kakúda Y., Yeung D. y Jiang Y. 2004. Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:559-573.
- Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM). 2007. Consumo nacional aparente de productos agrícolas seleccionados, 2007. Ciudad de México, México: SNIIM-SE. 3p.

- Spagna G., Barbagallo R. N., Chisari M., Branca F. 2005. Characterization of a tomato polyphenol oxidase and its role in browning and lycopene content. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):2032-2038.
- Stahl W. y Sies H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* 1740:101-107.
- Takeoka G. R., Dao L., Flessa S., Gillespie D.M., Jewell W.T., Huebner B., Bertow D. y Ebeler S.E. 2001. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 49(8):3713-3717.
- Tan B. 1988. Analytical and preparative chromatography of tomato paste carotenoids. *J. Food Sci.* 53(3):954-958.
- Thompson K.A., Marshall M.R., Sims C.A., Wei C.I., Sargent S.A. y Scott J.W. 2000. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *J. Food Sci.* 65(5):791-795.
- Ton L.M., Sasaki S., Mc Clements J.D. y Decker E.A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1473-1478.
- Tonucci L.H., Holden J.M., Beecher, G.R., Khachik F., Davis C.S. y Mulokozi G.J. 1995. Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *J. Agric. Food Chem.* 43:579-586.
- Wrolstad R. E. 2004. Anthocyanin pigments: Bioactivity and coloring properties. *J. Food Sci.* 69(5):419-421.
- Xianquan S., Shi J., Kakuda Y. y Yueming J. 2005. Stability of lycopene during food processing and storage. *J. Med. Food* 8(4):413-422.
- Yanishlieva N.V. y Marinova E.M. 2001. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103:752-767.

ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE pH, ACIDEZ TITULABLE (AT), SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST).

a.1 Determinación del pH

A 20 g del sobrenadante del homogeneizado de tejido vegetal se le determinó por triplicado el pH mediante un potenciómetro Beckman ϕ 50 pH-Meter (Beckman Fullerton, CA), previamente calibrado a pH de 4.0 y de 7.0 con soluciones buffers.

a.2 Determinación de acidez titulable (AT).

Porciones de 5 g del sobrenadante del homogeneizado con 50 mL de agua destilada se titularon con una solución de NaOH 0.1N hasta un pH de 8.2 con ayuda de un potenciómetro Beckman ϕ 50 pH-Meter (Beckman Fullerton, CA), previamente calibrado a pH de 4.0 y de 7.0. Los resultados se expresaron como por ciento de ácido cítrico (Mencarelli y Saltveit, 1988; Thompson y col., 2000).

a.3 Determinación de sólidos solubles totales (SST).

Los sólidos solubles totales del sobrenadante del homogeneizado se determinaron directamente con un refractómetro Atago (Atago, Tokyo, Japon), previamente calibrado con agua destilada a 20°C. Los resultados se expresaron como grados Brix (AOAC, 1996).

ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES SOLUBLES (MÉTODO DE NELSON-SOMOGYI).

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo por el método de Nelson-Somogyi (1944).

Este método es colorimétrico, mide los azúcares reductores utilizando el reactivo cobre/arsenomolibdato. El cobre es inicialmente reducido a la forma cuprosa por calentamiento con la solución de azúcar y el Cu^+ además reduce el arsenomolibdato a molibdeno (azul). La intensidad del color azul es relacionado con la concentración del azúcar y, por comparación con un estándar producido simultáneamente con la solución problema, la concentración de los azúcares reductores en la solución problema es determinada.

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra (sobrenadante) más 1 mL de reactivo I. Se incubó 20 min en baño de agua hirviendo, se enfrió, se adicionó 1 mL de reactivo II, se agitó vigorosamente en un vortex "Super-Mix" modelo 1290 (Lab-line, EUA), se adicionó 17 mL de agua destilada, se agitó y se midió la absorbencia a 520 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600 UV-vis (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Los datos obtenidos se correlacionaron en una curva patrón de glucosa de concentración de 0-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua y lectura a 520 nm.

Reactivo I

Disolución A

En 700 mL de agua destilada se disolvió en 25 g de carbonato de sodio anhidro (NaCO_3), 25 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de

bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y se aforó a un litro.

Disolución B

En 200 mL de agua destilada se adicionaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y se disolvieron 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

El reactivo I, se preparó mezclando 1 mL de la disolución B y 25 mL de la disolución A.

Reactivo II

Disolución A

En 450 mL de agua destilada se disolvieron 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Disolución B

Se disolvieron 3 g de arsenato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 25 mL de agua destilada.

El reactivo II, se preparó mezclando lentamente y con agitación las disoluciones A y B, se aforó a 500 mL y se calentó a 55°C por 30 min.

Cuadro 25. Valores de la concentración de azúcares reductores solubles y absorbencia (curva de calibración)

Conc. glucosa μ/mL	Absorbencia 520 nm
0	0
60	0.1432
120	0.2748
180	0.4051
240	0.5270
300	0.6613
360	0.7984
420	0.9058
480	0.9974
540	1.0658

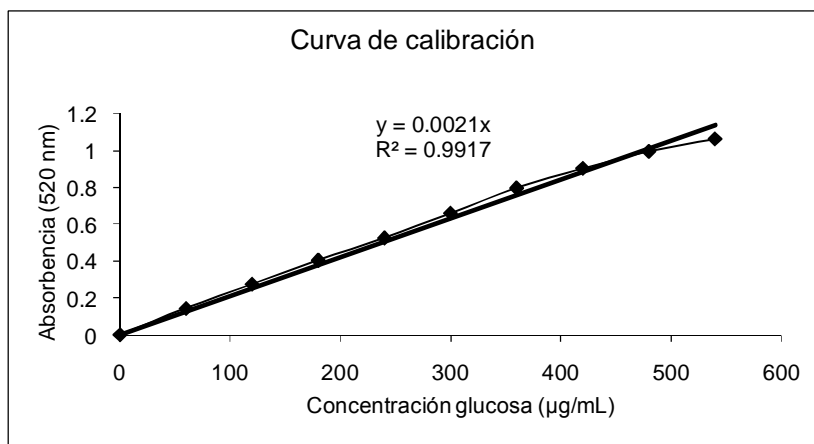


Figura 35. Curva de calibración de la variación de la absorbencia con respecto a la concentración de azúcares reductores solubles (glucosa).

$$Y = 0.0021X$$

$$Ab = 0.0021C(\mu\text{g/mL})$$

$$C(\mu\text{g/mL}) = Ab / 0.0021$$

ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (ROBINSON Y STOTZ, 1954 y AOAC, 1980).

Se siguió el método descrito por Robinson y Stotz, 1954 y AOAC, 1980.

Método colorimétrico

El contenido del ácido ascórbico en frutas y hortalizas se estima macerando la muestra de manera mecánica con agentes estabilizadores (como el ácido metafosfórico o el ácido tricloroacético al 5%), y realizando la medición con base en su poder reductor. El ácido ascórbico reduce el colorante 2,6 diclorofenol-indofenol. En el punto final del colorante en exceso (no reducido) es de color rosa en solución ácida (Robinson y Stotz, 1954 y AOAC, 1980).

Preparación de la muestra

Se pesaron 20 g de jitomate picado y se depositaron en un vaso de precipitados de 250 mL, se le adicionaron 100 mL de ácido metafosfórico al 3% y se homogeneizó en un homogeneizador de tejidos (M133/1281-O Biospec Products Inc. Bartlesville, OK) durante 60 segundos a 4°C, se filtró y del filtrado se tomó un mL para la cuantificación del ácido ascórbico.

En un tubo de ensayo de 50 mL con tapón, se adicionó 1 mL del filtrado, 1 mL del ácido metafosfórico al 3%, 2 mL de solución amortiguadora pH 4, 3 mL de 2,6 diclorofenol-indofenol y 15 mL de xileno, se agitó vigorosamente en un vortex "Super-Mix" modelo 1290 (Lab-line, EUA), para extraer el exceso de 2,6 diclorofenol-indofenol con xileno. Se dejó reposar por 15-20 segundos. Se separó la capa orgánica mediante una micropipeta y se le adicionaron cristales de sulfato de sodio anhidro para remover las trazas de humedad se dejó reposar por 10-15 segundos. Se midió la absorbencia a 520 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600 UV-vis

(Beckman Instruments, Fullerton, CA) y utilizando celdas de cuarzo y xileno como blanco.

Los datos obtenidos se correlacionaron en una curva patrón de ácido ascórbico de concentración de 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ácido metafosfórico y lectura de 520 nm.

Ácido metafosfórico 3% (solución extractora).

Se pesaron 15 g de ácido metafosfórico y se disolvieron en 40 mL de ácido acético glacial y 200 mL de agua destilada y se aforó a 500 mL y filtró. Se conservó en refrigeración (vida útil de 7 a 10 días).

Solución estándar

Se pesaron 20 mg de ácido ascórbico previamente secado y se aforó a 100 ml con la solución de ácido metafosfórico al 3% (solución extractora).

Solución amortiguadora pH 4

Se pesaron 62.5 g de acetato de sodio y disolvieron en 125 mL de agua destilada, se adicionaron 250 mL de ácido acético glacial y se mezcló uniformemente. Se conservó en refrigeración (vida útil de 7 días).

Solución de 2,6 diclorofenol-indofenol

Se pesaron 50 mg de 2,6 diclorofenol-indofenol (secado previamente) y disolvieron en 50 mL de agua destilada con 42 mg de carbonato de sodio y se agitó vigorosamente. Una vez que el colorante se disolvió, se diluyó a 200 mL con agua destilada. Se filtró y conservó en frasco ámbar (ausencia de luz) y en refrigeración.

Cuadro 26. Valores de la concentración de ácido ascórbico y absorbencia (curva de calibración)

Conc. ác. ascórbico μ/mL	Absorbencia 520 nm
0	0.5077
40	0.4
80	0.3480
100	0.304
120	0.2414
160	0.1704
200	0.0961

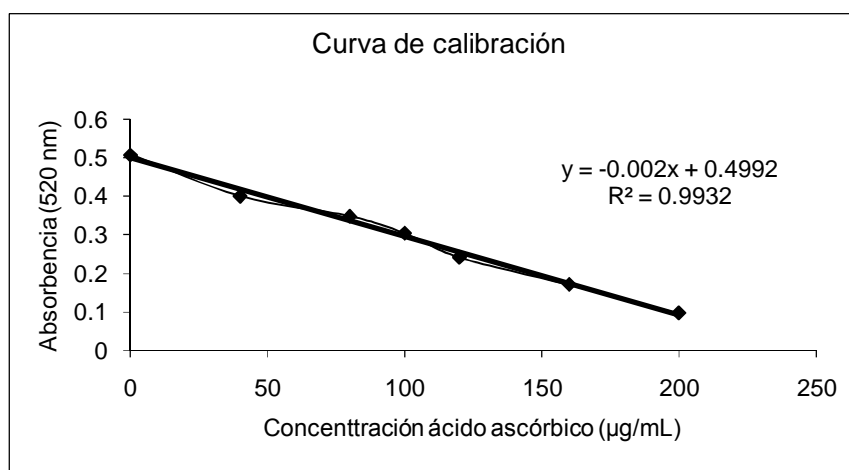


Figura 36. Curva de calibración de la variación de la absorbencia con respecto a la concentración de ácido ascórbico.

$$Y = -0.002X + 0.4992 \quad ; \quad -Y = 0.002X - 0.4992 \quad : \quad 0.002X - 0.4992 = -Y$$

$$X = (-Y + 0.4992) / 0.002 \quad : \quad X = (0.4992 - Y) / 0.002$$

$$C(\mu\text{g/mL}) = (0.4992 - Ab) / 0.002$$

ANEXO 4. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE PERÓXIDO EN ACEITES Y GRASAS (ISO 3960 e IUPAC 2.501).

En un matraz cónico de 250 mL seco con tapón, se adicionaron 2 g del aceite coloreado con licopeno y 10 mL de cloroformo, se disolvió la grasa por agitación vigorosa con ayuda de un agitador magnético, posteriormente se adicionó 15 mL de ácido acético glacial y 1 mL de solución de yoduro de potasio acuosa, fresca y saturada. Se tapo el matraz, se agitó durante un minuto y se coloca en condiciones de oscuridad y nuevamente se agitó por tres minutos. Posteriormente se adicionaron 75 mL de agua destilada, se mezcló y tituló el yoduro liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0.01M y solución de almidón al 1% como indicador. Se cuantificó también un testigo de reactivos.

$$\text{Valor de peróxido} = (V - V_0)T / M \times 10^3 \quad \text{mEq/kg}$$

M = muestra (g)

V = mL gastados de tiosulfato de sodio en la muestra

V₀ = mL gastados de tiosulfato de sodio en el testigo

T = molaridad del tiosulfato de sodio

Solución de yoduro de potasio saturado

Se disolvió yoduro de potasio en exceso en agua destilada hervida fresca. El exceso de sólido se eliminó. Se almacenó en un frasco ámbar y condiciones de refrigeración.

Solución de almidón al 1%

Se mezcló 1g de almidón soluble con bastante agua destilada para tener una pasta delgada y se adicionó 100 mL de agua hirviendo, posteriormente se sometió a ebullición por un minuto con agitación vigorosa.

Solución de tiosulfato de sodio 0.01M

Se disolvieron 2.4819 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada, se sometió a ebullición por cinco minutos y se paso en caliente a un frasco ámbar de un litro de capacidad. Se almacenó en oscuridad.

ANEXO 5. FORMULACIÓN DE EMULSIONES DE LICOPENO.

a.1 Emulsión de licopeno como suero de leche al 20% de fase dispersa.

Se prepararon 500 g de emulsión con 20% de fase dispersa y 3% de suero de leche.

A 15 g de suero de leche se le adicionaron 385 g de agua bidestilada en pequeñas porciones y simultáneamente homogeneizando con ayuda de un homogeneizador de tejidos (M 133/1281-O Biospec Products Inc. Bartlesville, OK) durante 60 segundos, posteriormente se adicionó 100 g de la fase lipídica con licopeno (8-10 ppm) y el antioxidante (7 mg de α -tocoferol/100 mL de aceite de canola, Ribeiro y col, 2003) en pequeñas porciones y simultáneamente homogeneizando. El tiempo total de homogeneización fue de cinco minutos de 4500-5000 rpm.

a.1 Emulsión de licopeno con goma arábica al 20% de fase dispersa.

Se prepararon 500 g de emulsión con 20% de fase dispersa y 10% de goma arábica como emulsificante

A 50 g de goma arábica se le adicionaron 350 g de agua bidestilada en pequeñas porciones y simultáneamente homogeneizando con ayuda de un homogeneizador de tejidos (M 133/1281-O Biospec Products Inc. Bartlesville, OK) durante 60 segundos, posteriormente se adicionó 100 g de la fase lipídica con licopeno (8-10 ppm) y el antioxidante (7 mg de α -tocoferol/100 mL de aceite de canola, Ribeiro y col., 2003) en pequeñas porciones y simultáneamente homogeneizando. El tiempo total de homogeneización fue de cinco minutos de 4500-5000 rpm.

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuadro 27. Análisis de varianza para las variables respuesta en los jitomates sometidos a tratamiento térmico.

Fuente de variación	pH	S.S.T.	Pr>F			
			Variables A.T.	respuesta		
				Ácido ascórbico	Azúcares reductores	Tono
T. térmico	0.0001	n.s.	n.s.	0.0001	n.s.	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Trat*tiempo	0.0001	0.0001	n.s	0.0001	0.0001	0.0001

Cuadro 28. Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en hexano con antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.

Iluminación	Jitomate escaldado	Jitomate no escaldado
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Oscuridad	81.00 ^a	66.78 ^a
Luz	65.39 ^b	59.42 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 29. Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en hexano con antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Jitomate escaldado	Jitomate no escaldado
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Iluminación	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Ilumin*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 30. Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.

Iluminación	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Oscuridad	81.07 ^a	65.28 ^a
Luz	66.92 ^b	55.05 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 31. Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Iluminación	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Ilumin*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 32. Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.

Temperatura °C	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
4	85.58 ^a	69.26 ^a
20	81.07 ^b	65.28 ^b
60	68.68 ^c	60.84 ^c

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 33. Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados) en hexano con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Temperatura	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Temp*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 34. Medias estimadas del valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.

Iluminación	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Valor de peróxido mEq/kg	Valor de peróxido mEq/kg
Oscuridad	5.00 ^a	5.40 ^a
Luz	12.00 ^b	12.93 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 35. Análisis de varianza para el valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz a 20°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg	Sin antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg
Iluminación	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Ilumin*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 36. Medias estimadas del valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.

Temperatura °C	Con antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg	Sin antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg
4	4.66 ^a	5.08 ^a
20	5.00 ^a	5.41 ^a
60	55.91 ^b	60.41 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 37. Análisis de varianza para el valor de peróxido en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg	Sin antioxidantes Valor de peróxido mEq/kg
Temperatura	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Temp*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 38. Medias estimadas de la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20 °C durante 30 días.

Iluminación	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Oscuridad	57.75 ^a	52.61 ^a
Luz	43.57 ^b	39.89 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 39. Análisis de varianza para la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad y luz (4186 lux) a 20°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Iluminación	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Ilumin*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 40. Medias estimadas de la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60 °C durante 30 días.

Temperatura °C	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
4	64.77 ^a	59.85 ^a
20	57.75 ^b	52.61 ^b
60	38.75 ^c	36.38 ^c

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 41. Análisis de varianza para la retención de licopeno en aceite de canola con y sin antioxidantes almacenado en condiciones de oscuridad a 4, 20 y 60°C durante 30 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Con antioxidantes	Sin antioxidantes
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Temperatura	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
Temp*tiempo	0.0001	0.0001

Cuadro 42. Medias estimadas de la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en las emulsiones aceite/agua con suero de leche y goma arábica almacenadas en condiciones de oscuridad y 4°C durante 20 días.

T. térmico	Suero de leche	Goma arábica
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
Escaldado	83.74 ^a	79.10 ^a
No escaldado	81.89 ^b	72.30 ^b

*Medias con diferente letra superíndice son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Cuadro 43. Análisis de varianza para la retención de licopeno (extraído de jitomates escaldados y no escaldados) en las emulsiones aceite/agua con suero de leche y goma arábica (emulsificantes) almacenadas en condiciones de oscuridad y 4°C durante 20 días.

Fuente de Variación	Pr > F	
	Suero de leche	Goma arábica
	Licopeno retenido %	Licopeno retenido %
T. térmico	0.0001	0.0001
Tiempo	0.0001	0.0001
T. térmico*tiempo	0.0001	0.0001

ANEXO 7. PRODUCTIVIDAD

Participación en congresos

R. M. Galicia Cabrera, C. Saucedo Veloz, R. Verde Calvo, E. Ponce Alquicira, e I. Guerrero Legarreta. 2004. "Effect of heat treatment on color changes and lycopene concentration in tomato cv. Saladette". Book of abstracts. 2004 Institute of Food Technologists Annual Meeting and Food Expo, Las Vegas, Nevada, Estados Unidos, July 12-16, 2004.

Galicia-Cabrera, R.M., Saucedo-Veloz, C., Verde-Calvo, R., Ponce-Alquicira, E. y Guerrero-Legarreta, I. 2004. "Efecto del tratamiento térmico en la estabilidad y actividad antioxidante del licopeno del tomate Saladette". Memoria. III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos. Pamplona, Navarra, España. 15-17 de septiembre, 2004.

R. M. Galicia Cabrera, C. Saucedo Veloz, R. Verde Calvo, E. Ponce Alquicira, e I. Guerrero Legarreta. 2005. "Effect of Stability and antioxidant effect of lycopene extracted from tomato cv Saladette on canola oil". Book of abstracts. 2005 Institute of Food Technologists Annual Meeting and Food Expo, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos, July 16-20, 2005.

Rosa María Galicia C., Crescenciano Saucedo V., Ramón Verde C., Edith Ponce A., Isabel Guerrero L. 2005. "Efecto del tratamiento térmico en las características fisicoquímicas y concentración de licopeno en jitomate cv. Saladette". Memoria. V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos. Puerto Vallarta, Jal. México. 4-7 de septiembre del 2005.

R. M. Galicia Cabrera, C. Saucedo Veloz, R. Verde Calvo, E. Ponce Alquicira, e I. Guerrero Legarreta. 2006. "Stability of lycopene from tomato cv. Saladette in oil-in-water emulsions". Book of abstracts. 2006 Institute of Food Technologists Annual Meeting and Food Expo, Orlando, Florida, Estados Unidos, June 24-28, 2006.

Artículo

R. M. Galicia, C., R. Verde C., E. Ponce A., R. O. González R., C. Saucedo, V. and I. Guerrero, L. 2008. Stability of lycopene in CV. Saladette tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) stored under different conditions. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 7 (3): 253-262. México.

ANEXO 8. COPIA DEL ARTÍCULO CIENTÍFICO RESULTADO DE LA TESIS DE DOCTORADO.

Stability of lycopene in cv. Saladette tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) stored under different conditions.

Revista Mexicana de Ingeniería Química
Vol. 7, No. 3 (2008) 253-262



**STABILITY OF LYCOPENE IN CV. SALADETTE TOMATOES
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) STORED UNDER DIFFERENT CONDITIONS**

**ESTABILIDAD DE LICOPENO EN TOMATES CV. SALADETTE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) SUJETOS A DISTINTAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

R.M. Galicia^{1*}, R. Verde¹, E. Ponce¹, R.O. González², C. Saucedo³ and I. Guerrero¹

¹ Departamento de Biotecnología

² Departamento de Matemáticas.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Apartado postal 55-535, C.P. 09340 México, D.F., México.

³ Programa de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5. 56230. Montecillo, Estado de México, México.

Received 4th of October 2007; Accepted 6th of November 2008

Abstract

The objectives of this study were to determine the concentration of lycopene in cv. Saladette tomato subjected to blanching (thermal treatment), to extract the carotenoid and to evaluate the stability of the pigment in solutions added with and without antioxidants, in conditions of darkness at 4, 20 and 60 °C, and in fluorescent light at 20 °C during 30 days. The concentration of lycopene in non blanched tomatoes was 79.20 µg/g, while in blanched tomatoes it was 75.25 µg/g, none presenting any significant difference. The degradation of lycopene in solution during storage in darkness, fluorescent light or different temperatures, followed a reaction of the first order. In conditions of darkened or lightened storing at 20 °C, the retention of the carotenoid in both experiments was greater for solutions containing lycopene extracted from blanched tomatoes than for solutions with pigment extracted from unblanched tomatoes after 30 days. When the pigment in solution with antioxidants added was stored at different temperatures, the greatest lycopene retention was in darkness at 4 °C. In contrast, pigment degradation was greater in conditions of light and 20 °C, than in darkness at 60 °C. The constant rate of lycopene degradation increased when elevating temperature.

Keywords: tomato, lycopene, blanching, storage stability, kinetics.

Resumen

Los objetivos de este estudio fueron determinar la concentración de licopeno en tomate cv. Saladette sometido a escaldado (tratamiento térmico), extraer el carotenoide y evaluar la estabilidad del pigmento en soluciones con y sin adición de antioxidantes, almacenadas en oscuridad a 4, 20 y 60 °C y en luz fluorescente a 20 °C durante 30 días. La concentración de licopeno en tomates sin escaldar fue de 79.20 µg/g mientras que para los tomates escaldados fue de 75.25 µg/g, no se presentó diferencia significativa. La degradación del licopeno en solución durante su almacenamiento en oscuridad, en luz fluorescente o a diferentes temperaturas siguió una reacción de primer orden. En condiciones de almacenamiento en oscuridad o en luz a 20 °C, la retención del carotenoide en ambos experimentos fue mayor para las soluciones con licopeno proveniente de tomates escaldados que para soluciones con pigmento de tomates no escaldados después de 30 días. Cuando el pigmento en solución con antioxidantes se almacenó a diferentes temperaturas, la mayor retención de licopeno fue en oscuridad a 4 °C. En condiciones de luz y 20 °C la degradación del pigmento fue mayor que en oscuridad y 60 °C. La constante de velocidad de degradación del licopeno se incrementó al elevar la temperatura.

Palabras clave: tomate, licopeno, escaldado, estabilidad en almacenamiento, cinéticas.

1. Introduction

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is the principal vegetable that Mexico exports to the United States, with Sinaloa being the main producing and exporting state. The states of Baja California,

Michoacán, San Luis Potosí, Baja California Sur and Sinaloa produced 68.5 % of the national production in 2005 (SIAP, 2007). Tomato exports were 683 and 668 thousand tons in 2004 and 2005, respectively (SNIIM, 2007). An increase in production of 5.2 % and 16.7 % was obtained during these two years

* Corresponding author. E-mail: rmgc@xanum.uam.mx
Tel: (55) 5804 4711, Fax: (55) 5804 4712

when compared with the reported production in 2003 (SIAP, 2007); however, this overproduction caused a decrease in price and economical losses for producers. Therefore, an alternative to take advantage of excess tomatoes is to obtain the carotenoid pigments. Lycopene comprises between 80 and 90 % of those carotenoids present in the fruit and can be used as a natural colorant or as a nutritional complement (Shi and Le Maguer, 2000).

Natural colorants have acquired great importance in the food and pharmaceutical industries within the last few years due to toxicological problems associated with the use of synthetic colorants. Some natural colorants used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries are anthocyanin, betanin, chlorophyll, curcumin and carotenoids such as bixin and crocetin (Bouvier *et al.*, 2003; Delgado-Vargas and Paredes-López, 2003; Humphrey, 2004; Wrolstad, 2004).

Recent research acknowledges other benefits of lycopene present in tomatoes and its processed products, such as being a micronutrient with nutraceutical properties related to cancer prevention in different organs such as prostate, digestive tract and lungs; as well as in the decrease of heart related diseases (Boileau *et al.*, 2002). These beneficial properties of this carotenoid are due to its acyclic polyene structure (eleven conjugated double bonds) which gives it the ability to protect against oxidative damage and to quench free radicals.

The all-*trans* isomer of lycopene, the most stable form, is most prevalent in fresh tomatoes. Nevertheless, it is liberated from the tissue matrix during its processing and spontaneously undergoes isomerization and oxidation which causes pigment degradation. A greater loss of lycopene occurs when various heat treatments such as blanching, sterilization and drying are applied (Bruno and Wetzel, 2004; Candelas-Cadillo *et al.*, 2005; Goula *et al.*, 2006).

Blanching is required to inactivate the pectinesterase and polygalacturonase enzymes, since these enzymes affect the quality of the processed tomato products and lycopene extraction (Schwartz, 1994; Takeoka *et al.*, 2001; Fellows, 2005). There are several blanching methods that differ in temperature, they can be applied either to the whole vegetable as well as to crushed tomatoes, such as the "hot break" (82-90 °C) or the "cold break" (60-65 °C) commonly used for tomatoes processing (Re *et al.*, 2002; Fellows, 2005). In relation to the lycopene stability, Shi and Le Maguer (2000) reported that heat induces isomerization of the all-*trans* to *cis* forms. The *cis*-isomers increase with the temperature and processing time. Boileau *et al.* (2002) also reported that the lycopene *cis* isomers are more bioavailable than the all-*trans* due to the higher solubility of the *cis* isomers in the micelles of bile acid and its lesser tendency to aggregate. Lycopene in processed tomato products is also sensible to high temperature, prolonged processing time, light,

oxygen, acids and some metallic ions such Cu²⁺ and Fe³⁺ that catalyze its oxidation (Shi and Le Maguer, 2000).

According to reported potential about the use of this carotenoid, the objectives of this study were to determine the concentration of lycopene in cv. Saladette tomato subjected to blanching (thermal treatment), to extract the carotenoid and to evaluate the stability of the pigment in solutions with and without antioxidants added in conditions of darkness at 4, 20 and 60 °C, and in fluorescent light at 20 °C during 30 days.

2. Materials and methods

'Saladette' tomatoes used for these experiments were harvested in the production area of Los Mochis, Sinaloa and purchased at the Central de Abasto main market in Mexico City. Tomatoes were ripe red (Hue 0.569 ± 0.04), uniform in size, firm and undamaged; with a reducing sugar content of 1.870 ± 0.09 %, total soluble solids of 4.90 ± 0.11 %, pH of 4.2 ± 0.02, containing 0.237 ± 0.06 % of citric acid and 36.78 ± 2.1 mg/100g of ascorbic acid. Samples were divided into two groups of 24 tomatoes each. One group was subjected to the blanching treatment, leaving a non-blanching set as control (8 tomatoes for each repetition). The blanching treatment consisted of submerging the tomatoes in water at 93.5 °C for 50 sec, followed by cooling under running water at room temperature. The blanched and unblanched tomatoes were cut and ground using a tissue homogenizer (M 133/1281-O Biospec Products Inc. Bartlesville, OK, USA) at 4 °C for 60 sec; the homogenized product was passed through a sieve after each repetition to remove peel and seeds. Color was immediately determined using a Hunter Lab colorimeter, CM 2002 (Hunter Associates Laboratory Inc. Reston, VA, USA), reporting the hue (Hue = tan⁻¹b/a); afterwards, lycopene extraction and quantification was performed.

2.1 Physicochemical analysis

In order to perform the physicochemical analysis, 100 g of the homogenate was centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 20 °C using a IEC Centra CL3/CL3R centrifuge (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). The supernatant was collected and subjected to pH, total soluble solids content and titratable acidity measurement; pH was measured using a Beckman φ 50 pH-Meter (Beckman Fullerton, CA).

Acidity was measured by titration to a final pH of 8.1-8.2 with NaOH 0.1N (Mencarelli and Saltveit, 1988). The total soluble solids content was measured directly in the supernatant with an Atago refractometer (Atago, Tokyo, Japan, AOAC, 1996). Reducing sugars content was determined by the Nelson-Somogy method (Nelson, 1944), using a

glucose concentration pattern curve of 0-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water and reading at 520 nm. Ascorbic acid was determined by the Robinson and Stotz method (1954) using an ascorbic acid concentration curve of 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in metaphosphoric acid and reading at 520 nm.

2.2 Lycopene extraction

Lycopene was extracted from blanched and unblanched tomato homogenates according to a modification of the method described by Sadler *et al.* (1990) and Thompson *et al.* (2000). Ten grams of the sample were mixed with 100 mL of the solvent system (hexane:acetone:ethanol, 50:25:25, v/v/v), in a 250 mL Erlenmeyer flask covered with aluminum foil to prevent photooxidation; and stirred for 15 min at 20 °C using an orbital shaker (Lab Line Instruments, Inc., Melrose Park, Ill). In order to study the effects of commercial antioxidants on lycopene retention, half of the samples (blanched and unblanched) were mixed with BHA:BHT at 0.025 % (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) (Takeoka *et al.*, 2001). Fifteen mL of water were added to all the samples and the mixture was stirred for 5 min to separate the upper layer of hexane which contains the lycopene from the water: ethanol lower layer. The lycopene hexane phase was collected with a pipette. The residual lycopene in the water:ethanol phase was separated using the same procedure. The two lycopene:hexane phases were mixed in a total volume of 100 mL per extraction flask. The pigment solution was concentrated in a vacuum steamer (Buchi, Geneva, Switzerland) at 35 °C. Hexane was later added for a total volume of 250 mL.

2.3. Lycopene analysis in HPLC

The pigment was identified in the lycopene-hexane samples which were previously filtered through 0.22 μm filters (Gelman Acrodis TM GHP No.13, Pall Corporation, Exton, PA). The lycopene concentration was determined by injecting filtered samples and pattern solutions prepared from a lycopene standard of 90 – 95 % (Sigma Chemical, St. Louis, MO), into an HPLC (Thermo Separation Products, ConstaMetric 3200Bio, Riviera Beach, FL) to relate the peak areas and retention times. The HPLC conditions were: isocratic runs, with a flow rate of 0.5 mL/min; an injection volume of 20 μL and a wave length detection of 470 nm. A 250 mm x 4.6 mm C_{18} reverse phase column (particle size was 5 μm , Spherisorb ODS, Waters Associates, Milford, MA) was used, the mobile phase consisted of acetonitrile:methanol:dichloromethane (43.3:43.3:13.4, v/v/v) previously degassed and filtered through a 0.45 μm nylon MilliporeTM (Millipore, Bedford, MA) solvent resistant membrane (Thompson *et al.*, 2000).

2.4 Lycopene stability

The stability of the pigment was studied in the carotenoid solutions obtained from the blanched and unblanched tomatoes under different conditions and levels: antioxidant (none and BHA/BHT at 0.025 %); storage in darkness and fluorescent light at a temperature of 20 °C. Temperature conditions of 4 °C, 20 °C and 60 °C were also applied to samples stored in darkness. The solutions were prepared under the following conditions: 10 mL portions of lycopene solution were placed in glass vials (50 % headspace), covered with aluminum foil and stored in darkness at 4 °C, 20 °C and 60 °C. Other samples were placed in transparent vials and stored at 20 °C under fluorescent light of 4186 lux, distance to luminous source was 30 cm (CIR LX-101 luxometer, Cole Parmer Instrument Company, Chicago, IL) to promote photooxidation (Gouldson and Warthesen, 1999). Storage times were of 0, 3, 6, 12, 20 and 30 days. After that, samples were stored at -20 °C until further analysis. The lycopene concentration was determined by using a HPLC, as previously mentioned. Six experiments with 3 replicates were made under conditions shown in Table 1.

Table 1. Design of experiments

Experiment	Experimental unit	Condition (levels)
Ia	Lycopene solutions (blanched tomatoes)	Illumination (light and darkness) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).
Ib	Lycopene solutions (unblanched tomatoes)	Illumination (light and darkness) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).
IIa	Lycopene solutions (blanched tomatoes) with antioxidants at 20 °C	Illumination (light and darkness) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).
IIb	Lycopene solutions (blanched tomatoes) without antioxidants at 20 °C	Illumination (light and darkness) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).
IIIa	Lycopene solutions (blanched tomatoes) with antioxidants	Temperature (4, 20 and 60 °C) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).
IIIb	Lycopene solutions (blanched tomatoes) without antioxidants	Temperature (4, 20 and 60 °C) and time (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days).

2.5 Statistical analysis

Lycopene retention data were statistically analyzed using ANOVA for two factors designs with three repetitions: blanching-time, illumination-time, temperature-time, and Tukey's multiple comparisons tests ($\alpha \leq 0.05$), corresponding the main factors and interaction.

Exponential models were adjusted to lycopene retention through time using curvilinear regression (equivalent to a model of simple linear regression applying natural logarithm to the exponential function) and the slopes or degradation rates were compared through the t-Student test. Times of 50 % lycopene retention were calculated in the adjusted models. The program was SPSS for Windows 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). NCSS for Windows 2001 software was used to substantiate errors normality (NCSS Inc., Kaysville, Ut.,USA).

3. Results and discussion

3.1. The effect of blanching on the lycopene content in whole tomatoes

This experiment considered the fact that a blanching treatment was necessary to inactivate the pectinesterase and polygalacturonase enzymes found in tomatoes since they affect the quality of the processed products causing a quick diminishment of viscosity; as well as other natural enzymes which might decompose pigments (Schwartz, 1994; Barringer, 2004). The heat treatment may be applied using different methods, and in this case the whole tomato was submerged in water at 93.5 °C for 50 sec. The intensity of the lycopene red color is used as a quality indicator of the tomato products and also when it is used as food colorant.

The mean lycopene concentration was higher ($79.20 \pm 1.94 \mu\text{g/g}$) in the unblanched samples than the mean pigment concentration for blanched samples ($75.25 \pm 2.09 \mu\text{g/g}$), the difference was not significant ($p \leq 0.05$); therefore, 95.01 % of the lycopene was retained after the tomatoes were blanched. It is possible that the blanching method applied to the whole fruit with skin reduced the autooxidation rate during heating. Reduction of lycopene during blanching was also reported by other researchers, for instance: Akanbi and Oludemi (2004), registered lycopene concentrations of 59.50 $\mu\text{g/g}$ and 47.60 $\mu\text{g/g}$ in Roma VF and lb local tomatoes that had not been treated with heat, but after steam blanching of the entire fruits, the lycopene concentrations were 58.40 $\mu\text{g/g}$ and 46.30 $\mu\text{g/g}$, in that order. However, other authors that applied severe heat treatments in combination with a mechanical disruption of the fruit observed greater pigment degradation. Thompson *et al.* (2000) reported higher lycopene variations between the concentration for cultivars FL7765 and FL7655 of

67.10 $\mu\text{g/g}$ and 57.12 $\mu\text{g/g}$, but after 4 min cooking time the lycopene concentration was 61.11 $\mu\text{g/g}$ and 57.17 $\mu\text{g/g}$, respectively. Mayeaux *et al.* (2006) demonstrated that the extend of lycopene degradation varies according to the heating temperature and time, as only 36.6 % and 35.5 % of lycopene was retained after frying at 145 °C and 165 °C for 1 min, respectively. However mild thermal processing could increase lycopene concentration in tomato products by increasing the free and bioaccessible lycopene form. Nevertheless, other researchers such as Lin and Chen (2005) reported higher lycopene concentrations in tomatoes that underwent "hot-break" (82 °C and 2 min, 57.7 $\mu\text{g/g}$) than in tomatoes that did not receive the heat treatment (51.2 $\mu\text{g/g}$). On the other hand, prolonged heating or high storage temperature has been reported to promote non-enzyme darkening, including Maillard reactions and ascorbic acid oxidation, even though these changes could be masked by the color of lycopene (Anese *et al.*, 2002). Nguyen and Schwartz (1999) reported that non-enzyme darkening and the loss of carotenoid color are the principal causes of the color changes in tomato products. This color change in lycopene is due to the isomerization of the pigment from the all-trans form into the cis form according to Anguelova and Warthesen (2000) and Hackett *et al.* (2004).

3.2. Experiments Ia and Ib (table 1): Kinetics of lycopene degradation (from blanched and unblanched tomatoes) in solutions under conditions of darkness and light during storage at 20 °C

Two experiments were made, the first for lycopene extracted from blanched tomatoes (Ia) and the second for lycopene extracted from unblanched tomatoes (Ib). The main factors to each two designs were illumination and time. In both designs illumination and time factors, as well as the interaction illumination*time were significant in lycopene retention ($p \leq 0.001$).

When comparing both designs, it was found that the greater lycopene retention was observed in darkness with a lycopene retention of 81.0 % for solutions from blanched tomatoes and 66.78 % for solutions made from unblanched tomatoes. In conditions of light, the mean was 65.39 % for lycopene solutions made from blanched tomatoes and 59.43 % for those from unblanched tomatoes.

Regarding the interactions illumination*time in both experiments, it was found that day 3 presented the greatest retention of lycopene in conditions of darkness (the mean was 90.33 % for lycopene solutions from blanched tomatoes and 77.85 % for lycopene solutions from unblanched tomatoes) and the significantly lesser than others mean was at 30 days in conditions of light (mean was 31.6 % for lycopene solutions from blanched tomatoes and 19.42 % for lycopene solutions from unblanched tomatoes). It must be pointed out that the

heat treatment (blanching) allowed greater pigment retention in solutions than in those with lycopene from unblanched tomatoes during storage period. It was also found that, in conditions of light, the pigment was degraded faster. It is possible that blanching affords greater stability to the pigment during storage due to the fact that this heat treatment inactivates the oxidative enzymes responsible of color deterioration and therefore allows pigment retention. This enzymes and oxygen accelerate pigment oxidation in the case of the unblanched samples (Macrae *et al.*, 1993; Schwartz, 1994; Britton, 1996; Ishida *et al.*, 2007). Because of the aforesaid, it is convenient to scald tomatoes when extracting lycopene and to store them under conditions of darkness.

On the other hand, Lee and Chen (2002) and Goula *et al.*, (2006) reported that kinetics of reaction of lycopene degradation followed a kinetic model of the first order:

$$C = C_0 \exp(-kt) \text{ equivalent to } \ln C = \ln C_0 - kt \quad (1)$$

Where C_0 is the initial lycopene concentration, C is lycopene concentration at time t ; k is the reaction rate constant. The adjustment to the exponential model for the % of lycopene retained (% L) through time for the experiments of the pigment solutions from blanched and unblanched tomatoes in conditions of darkness and light at 20 °C was made based on these criteria and considering that initial lycopene concentration was 100 %. The estimated models are indicated in Table 2.

In the adjusted models for lycopene solutions from blanched tomatoes (Ia), the reaction rate constant was significantly lower ($p \leq 0.05$) in conditions of darkness (A) than in light (B) (0.018 and 0.040), meaning that pigment degradation was lower during the 30 days of storage ($R^2 = 0.933$ and 0.933). This same behavior was observed in the models adjusted for lycopene solutions from unblanched tomatoes (Ib), the rate constants were 0.037 in darkness (A') and 0.055 in light (B') ($R^2 = 0.87$ and 0.98), (Fig. 1). Considering the lower reaction rate constant and that initial lycopene concentration as 100 %, the adequate storage conditions for the carotenoid were in lycopene

solutions from blanched tomatoes in darkness (A). This was confirmed as after 38 days half of the initial lycopene was retained (Table 2). Spagna *et al* (2005) reported that tomato polyphenol oxidase is responsible to the color changes, as darkening and lycopene degradation, thus it is highly recommended to inactivate the polyphenol oxidase in order to maintain the lycopene stability.

The following experiments were made with lycopene proceeding from blanched tomatoes.

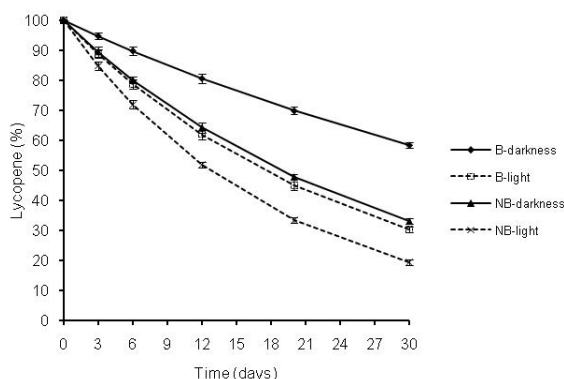


Fig. 1. Kinetics of lycopene degradation in solutions (from blanched and unblanched tomatoes) in conditions of darkness and light at 20 °C (adjusted models). Key: -◆- blanching-darkness; -□- blanching-light; -▲- non-blanching-darkness; -x- non-blanching-light.

3.3 Experiments Iia and Iib (table 1): Kinetics of lycopene degradation in solutions with and without antioxidants in darkness and light during storage at 20 °C

Physical and chemical factors such as high temperatures, light exposure, oxygen, extreme pH and acids degrade the carotenoids present in processed tomato products. In particular, lycopene is highly reactive to oxygen and light because of its double bond structure (Nguyen and Schwartz, 2000; Calvo *et al.*, 2007).

Table 2. Adjusted models for lycopene retention in solutions (from blanched and unblanched tomatoes) in conditions of darkness and light at 20 °C.

Case	Blanching	Illumination	Adjusted model	R ²	50 % lycopene retention time (days)
A	Yes	Darkness	% L = 100 exp (- 0.018t)	0.933	38
B	Yes	Light	% L = 100 exp (- 0.040t)	0.933	17
A'	No	Darkness	% L = 100 exp (- 0.037t)	0.873	15
B'	No	Light	% L = 100 exp (- 0.055t)	0.985	12

Statistical differences observed among cases:

- A with B presented significant difference in the rate constants.
- A' with B' presented significant difference in the rate constants.
- A with A' presented significant difference in the rate constants.
- B with B' presented significant difference in the rate constants.
- In all cases $p \leq 0.05$

Lycopene can convert itself into peroxy radicals capable of acting as prooxidants and undergo autooxidation just by the presence of oxygen in the air. Shi *et al.* (2004) proposed that the pathway towards oxidative degradation can take place by two mechanisms depending on how oxygen is introduced into lycopene: 1) Oxidation of a methyl or methylene group, and 2) Addition to a carbon-carbon double bond; the oxidative degradation can be present at either end of the carotenoid structure. The final products of lycopene degradation are the result of the direct oxidative scission within the double bonds present in the molecule (Shi and Le Maguer, 2000; Shi *et al.*, 2003).

Two experiments were made, the first for lycopene solutions added with antioxidants (IIa) and the second for lycopene solutions without antioxidants (IIb). The main factors for each two experiments design were illumination and time. In both experiments, the two main factors (illumination and time) and their interaction (illumination*time) were significant ($p \leq 0.001$) in lycopene retention.

When comparing both experiments, it was observed that, in conditions of darkness the greater lycopene retention was detected in lycopene solutions containing antioxidants, being of 81.07 % and 65.28 % the lycopene retention for solutions added with and without antioxidants, respectively. In conditions of light, the mean was 66.92 % for carotenoid solutions with antioxidants and 55.05 % for lycopene solutions not containing antioxidants.

Regarding illumination*time interactions, it was found in both experiments that lycopene retention in days 3 and 6 in conditions of darkness presented the highest means and did not present significant difference among them ($p \leq 0.05$). The pigment means with antioxidants in those days were 90.8 % and 85.4 % respectively and the means for lycopene without antioxidants were 70.41 % and 66.21 % respectively. The significantly lesser mean was in conditions of light at 30 days for lycopene solutions with antioxidants as well as for pigment solutions without antioxidants (31.10 % and 26.91 %

respectively). According to these results, the antioxidants allowed greater lycopene retention in solutions in both conditions of light and darkness. It was also found that light degrades the pigment quicker. These data demonstrate the sensitivity of the pigment to light, as it had been shown by other researchers (López-Hernández *et al.*, 2001; Lee and Chen, 2002; Shi *et al.*, 2003). Britton (1996) claims that this effect is mainly due to the combination of light and the presence of singlet oxygen (1O_2). Lee and Chen (2002) as well as Cvetkovic and Markovic (2008) reported a decrease of all-*trans* lycopene when light exposure time was increased. These researchers also pointed that lycopene and its *cis* isomers isomerization and degradation can proceed simultaneously. However, mild processing temperatures such as 50 °C, isomerization is followed by degradation, while at 100°C degradation proceeded faster than isomerization; the presence of light also induces isomerization as the main reaction. The autooxidation of lycopene is irreversible and will lead to fragmentation of the molecule, producing acetone, methylheptenone, laevulinic aldehyde and probably glyoxal, which cause apparent color loss (Xianquan *et al.*, 2005). Whereas, Anguelova and Warthesen (2000) have reported that the principal product of photooxidation is lycopene-5,6-diol (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrolycopene). Hackett *et al.* (2004) found that pigment stability decreased with time when stored under fluorescent light at 25 and 50 °C.

Considering that the kinetics of lycopene degradation reaction followed a kinetic model of the first order (equation 1) and considering that initial lycopene concentration was 100 %, the adjustment to the exponential model of the % of lycopene retained (% L) through time was made for the experiments with the pigment in solutions with and without antioxidants in conditions of darkness and light (IIa and IIb respectively). The estimated models are indicated in Table 3.

Table 3. Adjusted models for lycopene retention in solutions with and without antioxidants in conditions of darkness and light at 20 °C.

Case	Antioxidants	Illumination	Adjusted model	R ²	50 % lycopene retention time (days)
A	Yes	Darkness	% L = 100 exp (- 0.018t)	0.922	38
B	Yes	Light	% L = 100 exp (- 0.038t)	0.898	18
A'	No	Darkness	% L = 100 exp (- 0.037t)	0.579	19
B'	No	Light	% L = 100 exp (- 0.062t)	0.763	11

Statistical differences observed among cases:

A with B presented significant difference in the rate constants.

A' with B' presented significant difference in the rate constants.

A with A' presented significant difference in the rate constants.

B with B' presented significant difference in the rate constants.

In all cases $p \leq 0.05$

In the adjusted models for lycopene in solutions with antioxidants (IIa), the reaction rate constant was significantly lesser ($p \leq 0.05$) in conditions of darkness (A) than in light (B) (0.018 and 0.038), meaning that pigment degradation was lesser ($R^2 = 0.922$ and 0.898). This same behavior was presented in the adjusted models for lycopene in solutions without antioxidants (IIb), the rate constants were 0.037 in darkness (A') and 0.062 in light (B') ($R^2 = 0.579$ and 0.763) (Fig. 2). According to the lower reaction rate constant and considering that initial lycopene concentration was 100 %, the adequate conditions to store the carotenoid were lycopene in solutions with antioxidants in darkness at 20 °C (A). These data are similar to those data reported by Ferreira and Rodriguez-Amaya (2008), who studied lycopene model aqueous systems under darkness and light conditions under ambiental temperature. These researchers claimed that the carotenoid degradation under light and darkness conditions followed a first-order-kinetics, although the presence of light accelerates pigment degradation.

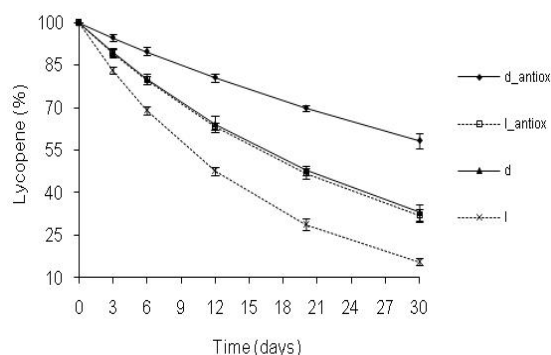


Fig. 2. Kinetics of lycopene degradation in solutions with and without antioxidants in conditions of darkness and light at 20 °C (adjusted models). Key: -♦- darkness with antioxidants; -□- light with antioxidants -▲-darkness; -x- light.

3.4 Experiments IIIa and IIIb (Table 1): Kinetics of lycopene degradation in solutions with and without antioxidants in darkness during storage at 4, 20 and 60 °C

Two experiments were made, the first for lycopene solutions with antioxidants (IIIa) and the second for lycopene solutions without antioxidants (IIIb). The main factors for each were temperature and time. In both experiments, the main factors and their interaction (temperature*time) were significant ($p \leq 0.001$) with respect to lycopene retention. For both experiments, Tukey's multiple comparisons test revealed, regarding temperature, that the three means were significantly different ($p \leq 0.05$) and that, by increasing temperature, the lycopene retention mean diminished significantly. For the experiment with antioxidants, the pigment retention means were

85.58, 81.07 and 68.68 % at 4, 20 y 60 °C respectively. Regarding time, the same behavior was shown, all means were significantly different ($p \leq 0.05$) and by increasing time lycopene retention means diminished. In the case of the experiment without antioxidants, pigment retention means were 69.26, 65.28 and 60.84 % at 4, 20 y 60 °C respectively.

Regarding the interactions (temperature*time) for the experiment with antioxidants, the highest lycopene retention mean was 98.57 % on day 3 at 4 °C and presented significant difference ($p \leq 0.05$) with respect to the others. The lesser mean that presented significant difference from the rest was 36.18 % and was that of day 30 at 60 °C. For the experiment without antioxidants the highest lycopene retention mean was 74.43 % on day 3 at 4 °C, the significantly lesser ($p \leq 0.05$) mean was 35.82 % on day 30 at 60 °C. These significant differences are due to lycopene degradation which involves two stages: isomerization, to *cis* form isomers, and autooxidation of the unsaturated double bonds (Lee and Chen, 2001). These researchers also reported that lycopene mono-isomers *cis* degradation was greater when heating time was increased at 50°C. The main *cis* isomers found in tomatoes subjected to various heat treatment methods are 5-*cis* lycopene, 13-*cis* lycopene, 9-*cis* lycopene, 15-*cis* lycopene and di-*cis* lycopene (Lee and Chen, 2001; Hackett *et al.*, 2004; Ishida and Chapman, 2004; Moraru and Lee, 2005).

For each of the three temperatures with and without antioxidants the models of the form: % L = $C_0 (\exp(-k t))E$ were adjusted, corroborating in each of them that the errors had normal distribution. The estimated models are indicated in Table 4.

In the models adjusted for lycopene in solutions with antioxidants (IIIa), the reaction rate constant was significantly lower ($p \leq 0.05$) at 4 °C (A) than at 60 °C (C) (0.014 and 0.033), meaning that pigment degradation was lesser ($R^2 = 0.946$ and 0.854). This same behavior was presented in the adjusted models for lycopene in solutions without antioxidants (IIIb), the rate constants were 0.030 at 4 °C (A') and 0.045 at 60 °C (C') ($R^2 = 0.562$ and 0.571), considering that initial lycopene concentration was 100 % (Fig. 3). In the case of 4 °C and 20 °C for solutions with antioxidants, the rate constant was significantly lower ($p \leq 0.05$) at 4 °C temperature (A) than at 20 °C (B) (0.014 and 0.018), meaning that pigment degradation was lesser ($R^2 = 0.946$ and 0.922). In the models adjusted for lycopene in solutions without antioxidants at 4 °C (A') and 20 °C (B') did not present significant difference either ($p \leq 0.05$). In the case of 4 °C for solutions with antioxidants (A) and without antioxidants (A'), the rate constant was significantly lesser ($p \leq 0.05$) for solutions with antioxidants than for solutions without antioxidants (0.014 and 0.030), meaning that pigment degradation was lesser ($R^2 = 0.946$ and 0.562). This same behavior was presented

Table 4. Adjusted models for lycopene retention in solutions with and without antioxidants in conditions of darkness at 4, 20 and 60 °C.

Case	Antioxidants	Temperature °C	Adjusted model	R ²	50 % lycopene retention time (days)
A	Yes	4	% L = 100 exp (- 0.014t)	0.946	48
B	Yes	20	% L = 100 exp (- 0.018t)	0.922	38
C	Yes	60	% L = 100 exp (- 0.033t)	0.854	21
A'	No	4	% L = 100 exp (- 0.030t)	0.562	23
B'	No	20	% L = 100 exp (- 0.037t)	0.576	19
C'	No	60	% L = 100 exp (- 0.045t)	0.571	15

Statistical differences observed among cases:

A with B presented significant difference in the reaction rate constants.

A with C presented significant difference in the reaction rate constants.

B with C presented significant difference in the reaction rate constants.

A' with B' did not present significant difference in the reaction rate constants.

A' with C' presented significant difference in the reaction rate constants.

B' with C' did not present significant difference in the reaction rate constants.

A with A' presented significant difference in the reaction rate constants.

B with B' presented significant difference in the reaction rate constants.

C with C' did not present significant difference in the reaction rate constants.

In all cases $p \leq 0.05$

in the adjusted models for lycopene in solutions with antioxidants (B) and solutions without antioxidants (B') at 20 °C, the rate constants were 0.018 for the first model and 0.037 for the second model ($R^2 = 0.922$ and 0.576), considering that initial lycopene concentration was 100 %. The solutions with antioxidants (C) and solutions without antioxidants (C') at 60 °C did not present significant difference either ($p \leq 0.05$). Based on these results, the lesser reaction rate constant and the initial lycopene concentration of 100 %, the adequate conditions to store the pigment were in lycopene solutions with antioxidants in darkness at 4 °C (A). This was confirmed by needing 48 days to retain half of the initial lycopene (Table 4). These results are similar to those reported by Nguyen and Schwartz (1998), where lycopene in solution stored at 4 °C decreased formation of isomers; also, addition of BHT as antioxidant reduced the rate of lycopene isomerization.

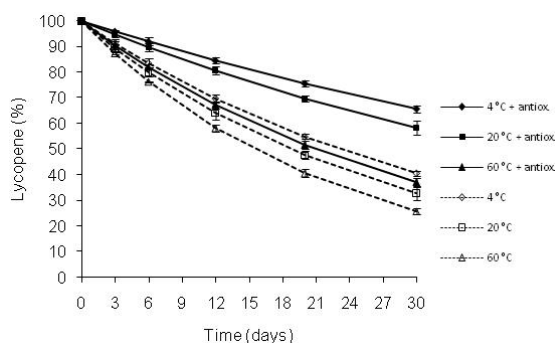


Fig. 3. Kinetics of lycopene degradation in solutions with and without antioxidants in conditions of darkness at 4, 20 and 60 °C (adjusted models). Key: -◆- 4 °C with antioxidants; -■- 20 °C with antioxidants; -▲- 60 °C with antioxidants; -◇- 4 °C; -□- 20 °C; -△- 60 °C.

The addition of antioxidants and storage under conditions of darkness are determining factors for pigment retention.

On the other hand, the greater lycopene loss was observed in lycopene solutions without antioxidants in darkness at 60 °C. In general, lycopene retention decreased as much as temperature and storage time were raised. This reduction is more probably due to oxidation than to isomerization since Lee and Chen (2002) reported that lycopene oxidation rate is higher than isomerization rate, when storage temperature is increased.

Conclusions

The retention of lycopene solutions depends on illumination, temperature and storage time, and whether the pigment is extracted from blanched or unblanched tomatoes.

The kinetics of lycopene degradation in solution follow a reaction of the first order with a reaction rate constant depending on temperature, addition of antioxidants and illumination.

The kinetic studies showed that pigment degradation was greater under light conditions and a temperature of 20 °C than under conditions of darkness at 60 °C during the same storage time.

Lycopene concentration from cv. Saladette tomatoes was greater when the fruit was blanched previous to the extraction since the heat treatment afforded greater pigment stability during storage at 4 °C in the dark with the addition of antioxidants.

Lycopene from cv. Saladette tomatoes presents an adequate concentration and can be extracted from the blanched fruit and stored in darkness at 4 °C with the purpose of usage as food additive or nutritious supplement once the toxicologic studies are carried out.

It is necessary to continue studies about the conversion mechanism of all-*trans* lycopene into its *cis* isomers in commercial foods systems for cv Saladette tomatoes.

Acknowledgment

The author, Galicia Cabrera, wishes to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) in Mexico for her scholarship for graduate studies.

References

- Akanbi, C.T. and Oludemi, F.O. (2004). Effect of processing and packaging on the lycopene content of tomato products. *International Journal of Food Properties* 7(1), 139-152.
- Anese, M., Falcone, P., Fogliano, V., Nicoli, M.C. and Massini, R. (2002). Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *Journal of Food Science* 67(9), 3442-3446.
- Anguelova T. and Warthesen, J. (2000). Lycopene stability in tomato powders. *Journal of Food Science* 65(1), 67-70.
- AOAC. (1996). *Official Methods of Analysis of AOAC International, sixteenth edition*, Vol. II. Association of Official Analytical Chemists, USA. Chapter 37, Pp. 5-6
- Barringer, S. (2004). Frozen tomatoes. In: *Handbook of vegetable preservation and processing*, (Hui, Y.H., Ghazala, S., Graham, D.M. and Nip, W.K., eds.). Pp. 293-308. Marcel Dekker, Inc. New York,
- Boileau, T.W.M., Boileau, A.C. and Erdman, J.W. (2002). Bioavailability of all-*trans* and *cis* isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine* 227(10), 914-919.
- Bouvier, F., Dogbo, O. and Camara, B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300, 2089-2091.
- Britton, G. (1996). Carotenoids. In: *Natural food colorants*, (Hendry GF Houghton JD, ed.). Pp. 197-243. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland.
- Bruno, A.K. and Wetzel, C.M. (2004). The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 55(408), 2541-2548.
- Calvo, M. M., Dado, D. and Santa-María, G. (2007). Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. *European Food Research and Technology* 224, 567-571.
- Candelas-Cadillo, M.G., Alanís-Guzmán, M.G.J., Bautista-Justo, M., Del Río-Olague and García-Díaz, C. (2005). Contenido de licopeno en jugo de tomate secado por aspersión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 299-307.
- Cvetkovic, D. and Markovic, D. (2008). Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexane solution. *Journal of the Serbian Chemical Society* 73(1), 15-27.
- Delgado-Vargas F. and Paredes-Lopez, O. (2003). Carotenoids as food colors. In: *Natural colorants for food and nutraceutical uses*, (Delgado-Vargas F, Paredes-Lopez O. editors). Pp. 143-153. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fellows, P. (2005). Blanching. In: *Food processing technology: principles and practice*, (Fellows, P. ed.). Pp. 201-209. Ellis Horwood Ltd., Publisher, London, England.
- Ferreira, J.E.M. and Rodriguez-Amaya, D.B. (2008). Degradation of lycopene and β -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. *Journal of Food Science* 78(8), C589-C594.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., Chatzitakis, P.C. and Nikas, V.A. (2006). Prediction of lycopene degradation during a drying process of tomato pulp. *Journal of Food Engineering* 74, 37-46.
- Gouldson, M.J. and Warthesen, J.J. (1999). Stability and antioxidant activity de beta carotene in conventional and high oleic canola oil. *Journal of Food Science* 64(6), 996-999.
- Hackett, M.M., Lee, J.H., Francis, D. and Schwartz, S.J. (2004). Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. *Journal of Food Science* 69(7), 536-541.
- Humphrey, A.M. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of Food Science* 69(5), 422-425.
- Ishida, B.K. and Chapman, M.H. (2004). A comparison of carotenoid content and total antioxidant activity in catsup from several commercial sources in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26), 8017-8020.
- Ishida, B.K., Roberts, J.S., Chapman, M.H. and Burri, B.J. (2007). Processing tangerine tomatoes: effects on lycopene-isomer concentrations and profile. *Journal of Food Science* 72(6), 307-312.
- Lee, M. T. and Chen B.H. (2001). Separation of lycopene and its *cis* isomers by liquid chromatography. *Chromatographia* 54, 613-617.
- Lee, M. T. and Chen B.H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry* 78, 425-432.

- Lin, C.H. and Chen, B.H. (2005). Stability of carotenoids in tomato juice during processing. *European Food Research and Technology* 221, 274-280.
- López-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Cruz-Sosa, F. and Guerrero-Legarreta, I. (2001). Characterization and stability of pigments extracted from *Terminalia catappa* leaves. *Journal of Food Science* 66(6), 832-836.
- Macrae, R., Robinson, R.K. and Sadler, M.J. (1993). Colours. In: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, vol. 2, Pp. 1164-1180. Academic Press, London, England.
- Mayeaux, M., Xu, Z., King, J.M. and Prinyawiwatkul, W. (2006). Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science* 71(8), C461-C464.
- Mencarelli F. and Saltveit, M. (1988). Ripening of mature-green tomato fruits slices. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113, 742-745.
- Moraru, C. and Lee, T.C. (2005). Kinetic studies of lycopene isomerization in a tributyrin model system at gastric pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(23), 8997-9004.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucosa. *Journal of Biological Chemistry* 153(2), 375-378.
- Nguyen, M. L. and Schwartz, S. J. (1998). Lycopene stability during food processing. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 218, 101-105.
- Nguyen, M.L. and Schwartz, S.J. (1999). Lycopene: chemical and biological properties, *Food Technology* 53(2), 38-45.
- Nguyen, M.L. and Schwartz, S.J. (2000). Lycopene. In: *Natural food colorants*, (Lauro, J.G., Francis, F.J., editors). Pp. 153-192. Marcel Dekker, New York.
- Re, R., Bramley, P.M. and Rice-Evans, C. (2002). Effects of Food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. *Free Radical Research* 36(7), 803-810.
- Robinson W.B. and Stotz E. (1954). The indophenol-xileno extraction method for ascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry* 160, 217-221.
- Sadler, G., Davis, J. and Dezman, D. (1990). Rapid extraction of lycopene and β -caroteno from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. *Journal of Food Science* 55(5), 1460-1461.
- Schwartz, S.T. (1994). *Pigment analysis*. In: Nielsen, S. *Introduction to the chemical analysis of food*. Pp. 261-271. Jones and Bartlett Publishers International. New York.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2007). Anuario estadístico de la producción agrícola, 2005. Ciudad de México, México: SIAP-SAGARPA. p 63-66.
- Shi, J. and Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(1), 1-42.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M. and Kakúda, Y. (2003). Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *Journal of Food Process Engineering* 25, 485-498.
- Shi, J., Qu, Q., Kakúda, Y., Yeung, D. and Jiang, Y. (2004). Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 559-573.
- Sistema Nacional de información e Integración de Mercados (SNIIM). (2007). Consumo nacional aparente de productos agrícolas seleccionados, 2007. Ciudad de México, México: SNIIM-SE. 3p.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Chisari, M. and Branca, F. 2005. Characterization of a tomato polyphenol oxidase and its role in browning and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2032-2038.
- Takeoka, G.R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D.M., Jewell, W.T., Huebner, B., Bertow, D. and Ebeler, S.E. (2001). Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8), 3713-3717.
- Thompson, K.A., Marshall, M.R., Sims, C.A., Wei, C.I., Sargent, S.A. and Scott, J.W. (2000). Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science* 65(5), 791-795.
- Wrolstad, R.E. (2004). Anthocyanin pigments: bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* 69(5), 419-421.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y. and Yueming, J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage. *Journal of medicinal food* 8(4), 413-422.

México D.F. a 25 de septiembre del 2009


El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Extracción de pigmentos carotenoides en jitomate (*Lycopersicon esculentum*
Mill.) y su aplicación en sistemas alimentarios modelo**

que presentó

M. en B. Rosa María Galicia Cabrera

Comité tutorial:

Director: Dra. Isabel Guerrero Legarreta 
Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Asesor: Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

Jurado:

Presidente: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana
Secretario: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana
Vocal: Dr. Crescenciano Saucedo Veloz
Colegio de Postgraduados
Vocal: Dra. Eloísa López Hernández
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

